



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^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana Chiéríci 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 Chiéríci 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 bençãos 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^a. Dr^a. 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^a Dr^a **Silvana** Regina Perez Orrico, Prof^a. Dr^a. **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 Profª. 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/cm²), 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 (μ 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/cm²- Joule por centímetro quadrado

DMSO- Dimetilsulfóxido

μ 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

¹O₂ - Oxigênio singleto

Sumário

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

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^{1,2}

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^{3,4}.

Smiley et al.⁵, 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^{1,3,6}. O sucesso da terapia por RAR é baseado no controle quantitativo e qualitativo da microbiota do biofilme subgengival, que resulta clinicamente na regressão dos sinais inflamatórios³.

No entanto, em exames de reavaliação, clinicamente se observa que muitos sítios parecem não ser capazes de recuperar e manter a saúde periodontal^{3,6}. 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 adequada⁷. 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 consequentemente danos teciduais¹⁴. 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 LEDs⁸.

Wilson⁹, 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 consequentemente 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 bacteriana¹⁰⁻¹⁷.

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 singleto¹⁸⁻²⁰. Estes subprodutos podem modificar as estruturas das membranas plasmáticas³⁹ e causar morte celular através de diversos mecanismos, incluindo: peroxidação lipídica, inibição do sistema enzimático e aglutinação proteica^{21,22}.

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^{18,22-25}.

A literatura comprova a eficácia do laser para acelerar a reparação tecidual em áreas normais ou infectadas, com ou sem o uso de fotossensibilizantes⁸. 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^{26,27}. Estes efeitos estão provavelmente relacionados com a capacidade do laser em promover angiogenese, proliferação celular e aceleração da síntese de colágeno^{26,28-30}.

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^{15,21,24}.

Braun et al.³², 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.⁶, 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.³¹, 2009, avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre espécies subgengivais 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.³³ e Theodoro et al.³⁴ 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*³³, 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 aPDT³⁴.

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

antissépticas, anti-infecciosas, antivirais, estimula a circulação sanguínea e elimina hematomas^{18,35-38}.

Na TFD, estudos têm mostrado o grande poder fototóxico da hipericina no tratamento da psoríase e outras doenças de pele³⁹, potente atividade anticâncer induzindo tanto apoptose quanto a necrose de células tumorais⁴⁰ e na aPDT, capacidade de promover a inativação de microrganismos⁴¹, sendo considerada como um dos mais potentes fotossensibilizadores encontrados na natureza^{16,42}

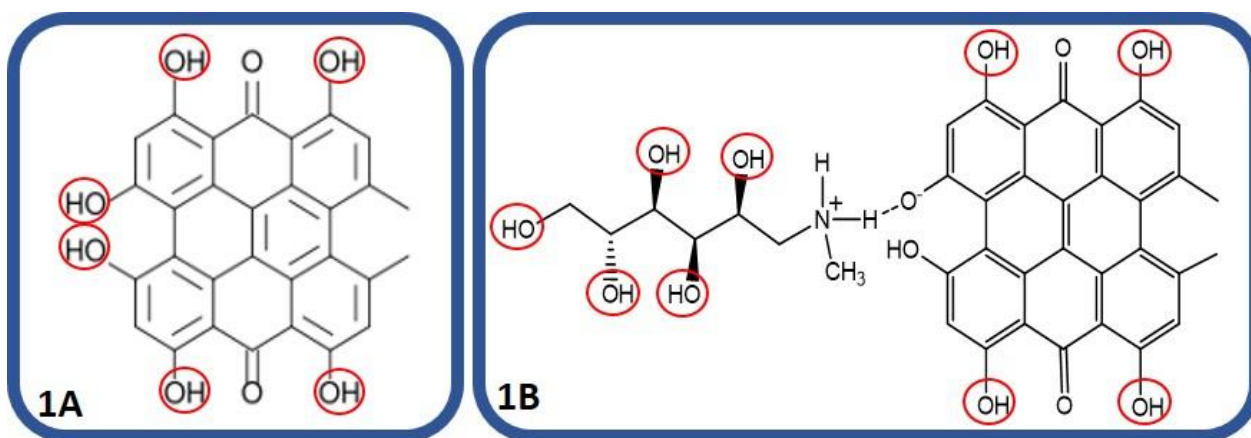
O princípio de ação da terapia fotodinâmica está na formação das “ROS” do inglês *Reactive Oxygen Species*, ou espécies reativas de oxigênio. A hipericina é uma quinona policíclica, que quando ativada reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio induzindo a produção do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Sendo assim, apresenta um alto rendimento quântico no estado tripleto e formação de oxigênio singleto, mesmo em baixas concentrações ($<0.1 \mu\text{g/mL}$), sendo considerada mais potente, e fotoestável que a maioria dos fotossensibilizadores^{35,36,43,44}.

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^{10,19}. 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 tripleto ou da produção de oxigênio singleto^{19,21,45}. 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 microrganismo⁴⁵.

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 aPDT³⁸. 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 funcionalidade⁴⁶. 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 hidrofiliidade.

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-negativas⁴¹.

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*^{13,47}. Além de ser capaz de reduzir fatores-chave de virulência como lipopolisacarídeos e proteases^{13,30,48,49}, e inativar citocinas inflamatórias do hospedeiro, tais como interleucina 1 β e TNF α ⁴⁸.

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.

2 PROPOSIÇÃO

Hipótese: A aPDT com o fotossensibilizador hipericina-glucamina, ativado por LED (34,10 J/cm²), interfere na progressão e possibilita melhores resultados no tratamento da doença periodontal.

Estudo 1

Objetivo: Avaliar *in vivo* a efetividade da aPDT, como tratamento principal ou adjuvante ao tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular, pelas análises: microtomográfica; histométrica; histológica, estereométrica.

Estudo 2

Objetivo: Avaliar *in vivo* as respostas inflamatórias e teciduais do emprego da aPDT, e de cada um de seus componentes (Hipericina-glucamina e LED Âmbar), isoladamente, na progressão da doença periodontal induzida em ratos, pelas análises: microtomográfica; histométrica, estereométrica e imuno-histoquímica para Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP).

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1

Evaluation of the effects of photodynamic therapy with hypericin-glucamine in the treatment of periodontal disease induced in rats*

Paula Delello Macedo (Macedo PD), PhD student in Periodontics¹; email: paula_mac2@yahoo.com.br

Sâmara Tfaile Corbi (SCT Corbi), PhD student in Periodontics¹; email: sa_tfaile@yahoo.com.br

Fernanda Ali Kitagawa (Kitgawa FA), Undergraduate student in Dentistry¹; email: fernandaakitagawa@foar.unesp.br

Janice Rodrigues Perussi (Perussi JR), Associate Professor in Chemistry²; e-mail: janice@iqsc.usp.br

Anderson Orzari Ribeiro (Ribeiro OA), Adjunct Professor from UFABC³, email: anderson.ribeiro@ufabc.edu.br

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio (Marcantonio RAC), Associate Professor in Periodontics¹; email: adriana@foar.unesp.br

¹ São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry Araraquara, Department of Diagnosis and Surgery, Araraquara, Brazil

² USP, São Paulo University, Chemistry and Molecular Physics Department, São Carlos, SP, Brazil

³UFABC, Federal University of ABC, Centre for Natural Sciences and Humanities, Santo André, SP, Brazil

*Formatado de acordo com as normas do periódico “Laser in Dental Sciences”, ao qual foi submetido.

Correspondence:

Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

São Paulo State University (Unesp), Department of Diagnosis and Surger, School of Dentistry, Araraquara, Rua Humaitá, 1680, Zip Code 14801-903, Araraquara, SP, Brazil. e-mail: adriana@foar.unesp.br

Acknowledgements

The authors would like to thank the technicians Leandro Alves dos Santos and Ana Claudia Gregolin Costa Miranda for their support. This study was financially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasilia, DF, Brazil) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasilia, DF, Brazil).

Conflict of Interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding:

This work was supported in part by a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR) - (AUXPG 655/2014) and by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) – (133436/2012-8).

Ethical approval:

Ethical board approval was obtained for this study by the Ethics in Animal Research Committee of the School of Dentistry of Araraquara (UNESP, Brazil CEEA/FOAr 07/2012).

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of a photosensitizer hypericin-glucamine, activated by LED amber (34.10 J/cm²) as an adjuvant to scaling and root planing (SRP), on the treatment of experimental periodontal disease (PD) in rats. **Methods:** In a 15-day period, PD was induced in the mandibular molars through ligature placement. The animals (n=60) were randomly divided into 4 groups: Control (with induction of periodontal disease); Scaling and root planing (SRP); Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT); and SRP + aPDT. At 7, 15, and 30 days after treatments, animals were euthanized. Digital microtomography, histometric and stereometric analyses were performed to calculate the bone loss of mandibular second molars, and the tissue repair was analysed histologically. The data were subjected to statistical analysis ($\alpha=5\%$). **Results:** Histologically, the Control group periodontium showed several morphological changes, but an evident gradual reduction in the inflammatory process was observed in the subsequent periods. The SRP, aPDT and SRP + aPDT groups presented the same, but in less intensity. The stereometric analysis showed a significantly higher proportion of fibroblasts in SRP group ($p < 0,001$) and SRP + aPDT group ($p < 0,0001$) compared to the Control group at 7 days post treatment. **Conclusions:** The scaling and root planing with or without photodynamic therapy with hypericin-glucamine increased density of the fibroblast and cell density. However, there is no statistically significant difference between SRP and SRP+aPDT.

Keywords: Phototherapy Periodontitis; Hypericum

Introduction

The most appropriate treatment for periodontal disease is scaling and root planing (SRP) [12]. However, in clinical evaluation exams, deep pocket or those involving furcation areas, invaginations, and root curvatures do not seem to be able to recover and maintain their periodontal health [12, 26, 31, 35]. For this reason, there is a constant commitment to developing treatments auxiliary to periodontal therapy.

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has shown a bactericidal effect against periodontopathogens such as *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* and *Streptococcus sanguis* [7, 15, 30]. In this light-based treatment, a photosensitizer is applied to the diseased site, left for a period of incubation in the dark and then a source of light with a specific wavelength activate it. The photosensitizer used in aPDT should be selected carefully since it is influenced by the site in which it will be deposited. The type, concentration, and mode of action of the photosensitizer are essential factors for the effectiveness of the therapy [10, 19].

Hypericin is a natural photosensitizer, present in herbaceous plants known as St. John's wort (genus *Hypericum perforatum*) [14]. It is used currently as an herbal medicine in psycho-vegetative disorders and depressive states and for fear and/or anxiety [1]. It has anti-inflammatory, antiseptic, anti-infective, and antiviral properties and stimulates blood circulation and eliminates bruising [30].

Studies have shown the great phototoxic power of hypericin in the treatment of psoriasis and other skin diseases [30] as well as in anticancer activity by inducing both apoptosis and necrosis of tumor

cells [13]. This photosensitizer has also the ability to inactivate microorganisms [8], making it one of the most powerful photo-agent found in nature [28, 33]. Nonetheless, the hypericin loses its photosensitizing action when submitted to a biological medium due to its hydrophobic characteristic. Its ability to generate singlet oxygen decreases as consequence to the auto-aggregation in an aqueous medium, thus affecting the effectiveness of the aPDT [22, 32].

A strategy proposed by chemical scholars is inducing the formation of supramolecular species, which are composed of two or more molecules joined by secondary molecular bonds to obtain a certain property or functionality. In the case of hypericin, a reaction is induced from the phenolic group of the molecule which yields the proton H^+ . The result is the formation of hypericin-glucamine. The presence of several hydroxyl groups in the hypericin-glucamine supramolecule provides sites where hydrogen bonds will be established, thus increasing its hydrophilicity [4].

The aPDT benefits mechanical treatment in residual pockets and reduces the indications of surgical debridement, and the risk of bacteremia during the treatment [23]. Given these benefits summed with the hypericin-glucamine properties [2, 5, 9, 10, 23] we aim at evaluating the influence of aPDT using the photosensitizer hypericin-glucamine activated by LED (34.10 J/cm²) in the treatment of periodontal disease induced in rats.

Methods

Experimental Periodontitis

This study was performed using 60 male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman). All experimental procedures involving the rats were performed under anesthesia, with a combination of ketamine chloridrate (0.08 mL/100 g; Syntec, Sao Paulo, Brazil) and xylazine chloridrate (0.04 mL/100 g; Syntec, Sao Paulo, Brazil). The experimental periodontal disease

model was randomly implemented by ligatures insertion (Corrente Algodão n° 24; Coats Corrente, São Paulo, SP, Brazil) around one of the upper second molars (randomly chosen) in the subgingival sulcus for a 15 days period. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (07/2012).

Photosensitizer (PH)

Hypericin-glucamine was obtained from a stock solution (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in polar aprotic solvent, dimethyl sulfoxide (DMSO), sterilized by filtration using a 0.22 μm membrane and kept out of the light). The working solution was prepared by diluting the stock solution in sodium phosphate buffer (pH 7.2) to a final concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$, where the final percentage of DMSO was less than 1%.

Light

An amber-colored LED (MM Opto, São Carlos / SP - Brazil) with 700 mA, the wavelength of 590 nm - coincident with the maximum absorption band of hypericin-glucamine and converted the power of 90 mW was used in this study. The LED was applied for 6 minutes at a dosage of 34.10 J/cm.

Experimental Groups

After a 15-days period, the ligatures were removed, and in a day after, the treatments were performed. The rats were randomly assigned into four groups of 5 animals to each period: Induction of Periodontal Disease (Control): No treatment was performed. Scaling and root planing (SRP): Supra and subgingival scaling and root planning (SRP) using manual curettes (n. 7–8/ mine five, 11–12/mine and 13–14/mine; Hu-Friedy, Co.) performed by a single operator. Mechanical removal

of mature plaque present on the free faces of the tooth was performed by repeated movements in the apical-coronal direction. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): Ten (10) μL of the photosensitizer, which was stored in light-protected falcons, transferred to a blunt tip syringe and coated cylinder. The tip of the needle was inserted between the tooth and gingival tissue and PH was deposited in the gingival sulcus. After incubating for ten minutes, the LED was applied for 6 minutes on the occlusal surface (34.10 J/cm^2), consequently, the transmucosal irradiation of all faces of the second molar was given in only one application. Scaling and root planing + Antimicrobial photodynamic therapy (SRP+ aPDT): both protocols were carried out, respectively. After the corresponding experimental period (7, 15 and 30 days after treatments), the animals were euthanized with an anesthetic overdose, and the maxilla were removed for the proposed analyses.

Microtomography of X-rays ($\mu\text{-CT}$)

The hemimaxilla were analyzed by X-ray beam scanning in a three-dimensional radiography system (computerized digital microtomography - MicroCT) [28]. The samples were scanned by the SkyScan microtome (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium, 2003) using cuts of $18 \mu\text{m}$ (50Kv and 500μ) and the area of interest was delimited by standardized dimensions (1.26 mm high x 0.56 mm wide) in the proximal (mesial and distal) areas of the second molar [21]. Next, the volume percentage of the bone tissue present in these areas was obtained with a threshold radiodensity of 55-250 Hounsfield units in the grayscale scale [6]. For the analysis, the mean values obtained for the mesial and distal areas were used. Measurements were performed by a blinded and calibrated examiner (SC).

Histological Analysis

After decalcification in 7% EDTA buffered, the samples were dehydrated embedded in paraffin and histological serial sagittal sections (thickness of 4 μm) were stained with hematoxylin-eosin (HE) technique. The images were captured using an optical microscope (DIASTAR Microscope, Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Hessen, Germany). Evaluations were performed by a trained, calibrated, and blinded examiner (SC). The following parameters were evaluated: the inflammatory reactions of the connective tissue, bone resorption processes, and tissue neoformation.

Histometric Analysis

To perform the histometry, a blinded and calibrated examiner selected 2 slides of each animal considering the presence of the central portion of the pulp (SC). The furca region was delimited according to the methodology of Cesar Neto et al. 2006 using a software (Image J Launcher 1.42q, Bethesda, MD, USA) [7]. The measurements values of bone loss in the proximal area were obtained from images with a 10-fold increase, in which lines were drawn between the height part of the cementum-enamel junction and the height of the bone crest.

Stereometry Analysis

The microscopic stereologic point-counting technique was employed on sections stained with HE to the experimental periods of 7 and 15 days. The images were captured in an optical microscope (DIASTAR Microscope, Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Hessen, Germany) at X10 magnification. A square-lattice grid micrometer was positioned over two regions of interest: A-interproximal and B-furca. For each grid, 50 coincident points were counted on the histological structures, which indicated the relative volume density of the following tissue components: bone,

fibroblasts, inflammatory cells and blood vessels. A percentage analysis of each tissue component was carried out considering the total number of points counted per experimental period [27]. Evaluations were performed by a trained, calibrated, and blinded examiner (FK)

Statistical Analyzes

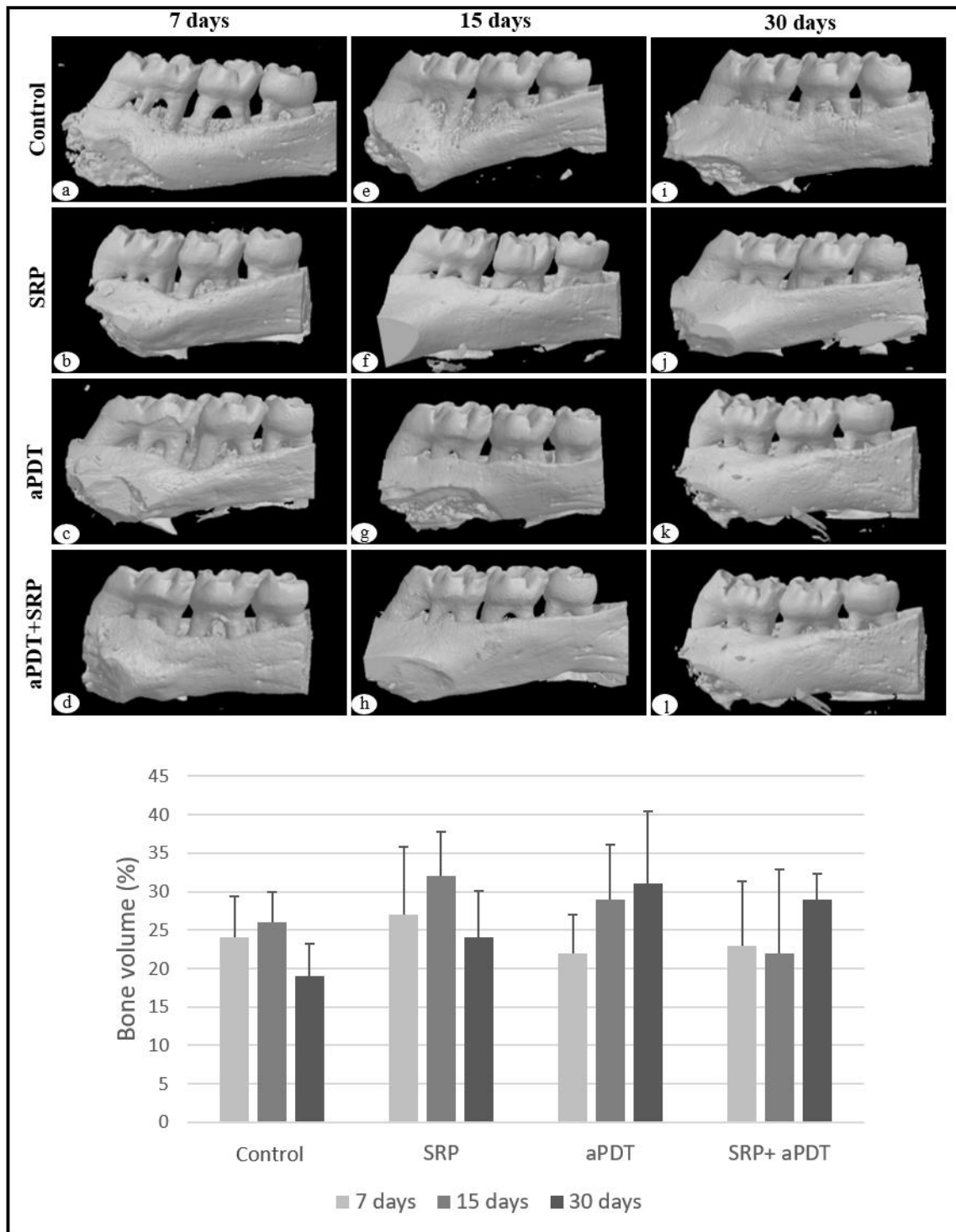
A software (Graphpad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA) was used for statistical analysis. The Shapiro-Wilk normality test was applied and ANOVA test was used, followed by Tukey's post-test for the intra and inter-groups analysis. A significance level of 95% was applied to all analysis.

Results

Microtomography of X-rays (μ CT)

The comparison between the experimental groups showed no statistical differences when observed a the percentage of bone volume (Table 1). Fig 1 shows the representative diagram of the samples.

Fig 1- Representative diagram of the samples in 3D generated by X-ray Microtomy. Images of the rat maxillas from the Control (a, e, i), SRP (b, f, j), aPDT (c, g, k) and SRP + aPDT (d, h, l) groups at 7 (a - d), 15 (e – h) and 30 (i - l) days. Graph -Area of bone tissue present in the proximal region of the first maxillary molar, referring to the different groups and experimental periods evaluated. Data expressed as bone volume percentage measured $\pm$ standard deviation.

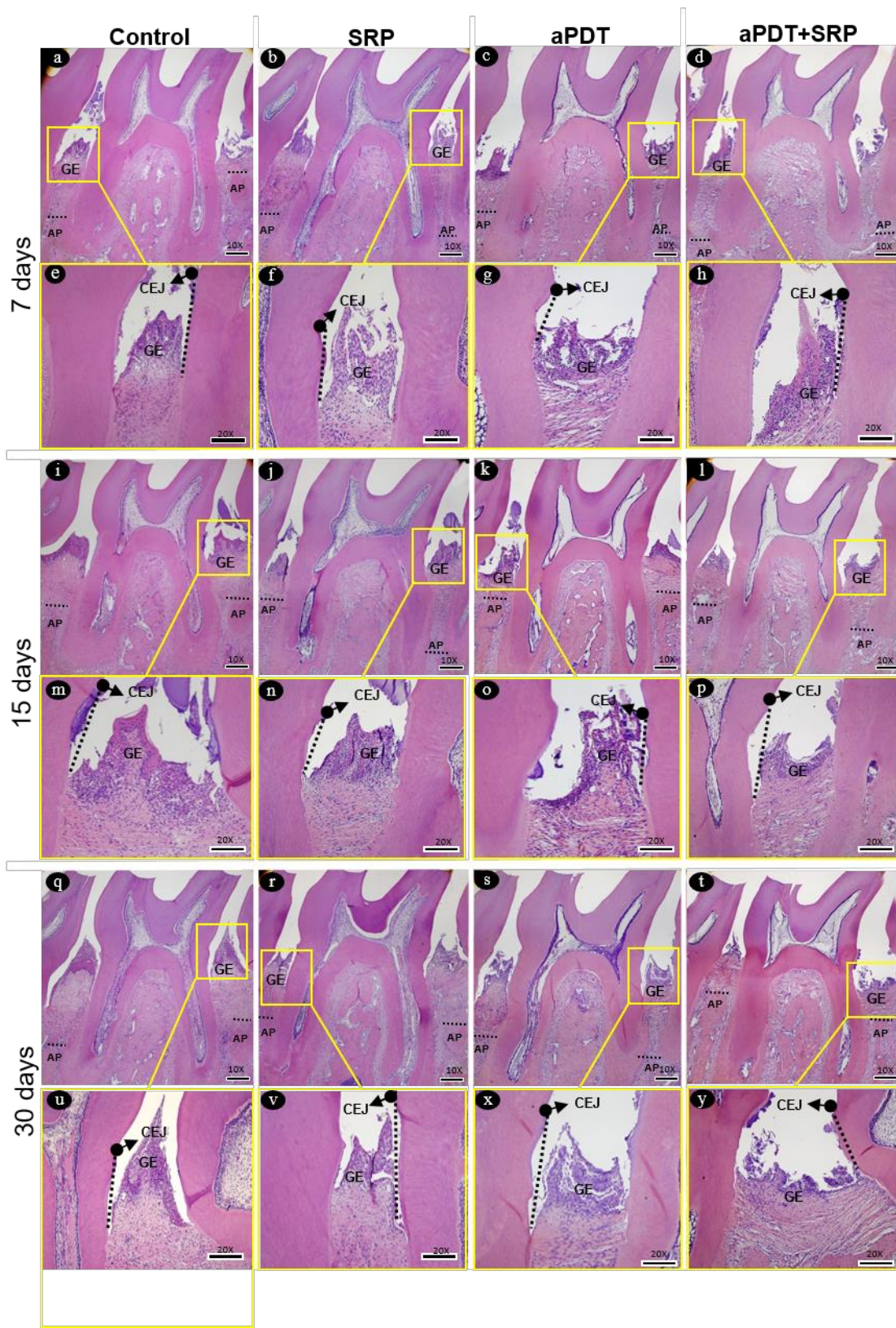


Descriptive Histological Analysis

The periodontium of the animals of the Control group (Fig 2) showed several morphological changes. After 7 days, an intense inflammatory process was observed in the lamina propria of the interdental gingiva. The interdental papilla often presented ulceration. The gingival epithelium was adjacent to the surface of the acellular cement, i.e apically to the cemento-enamel junction. An evident gradual reduction in the inflammatory process was observed in the subsequent periods.

Analysis of the SRP, aPDT and SRP + aPDT groups (Fig 2) presented the same, but in less intensity, histological characteristics found for the Control group. Thereby, the histological descriptions were similar for all experimental groups. The images illustrate the periodontal tissues after each treatment in different periods.

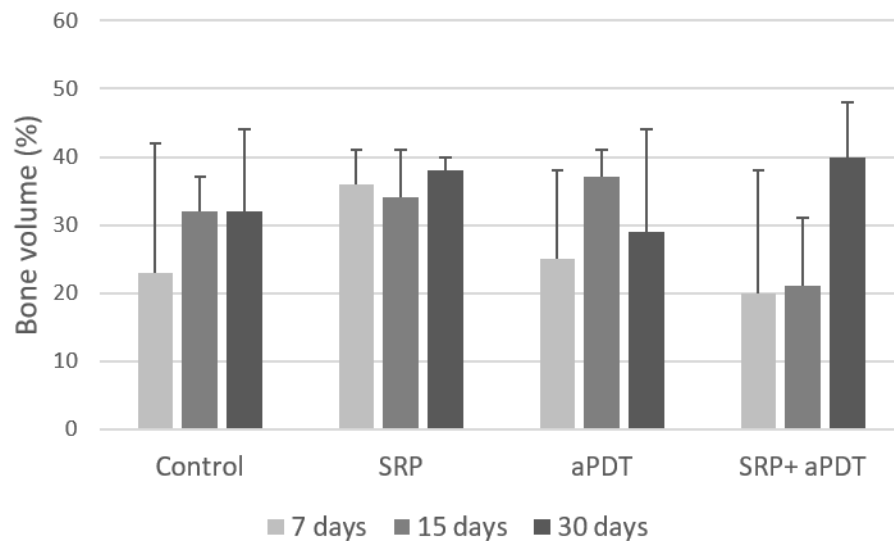
Fig. 2 - Photomicrographs of axial sections of the rat maxillas from the Control (a, e, i, m, q, u), SRP (b, f, j, n, r, v), aPDT (c, g, k, o, s, x) and SRP + aPDT (d, h, l, p, t, y) groups at 7 (a - h), 15 (i - p) and 30 (q - y) days, which presented similar characteristics; for the initial period without treatment (Control - 7 days) the inflammatory profile is exacerbated. At 20x magnification, observed the alveolar process (AP) formed by irregular bone trabeculae, located between the 1st and 2nd and the 2nd and 3rd molars. The cervical portion of the alveolar process (AP) lies near the apical third of the 2nd molars roots. Resorption of the alveolar bone was observed in the furca region. At 40x (e - h, m - p, u - y) magnification, the gingival epithelium (GE) is located apically at the cemento-enamel junction where the gingival mucosa exhibits an inflammatory process and the interdental papilla was destroyed.



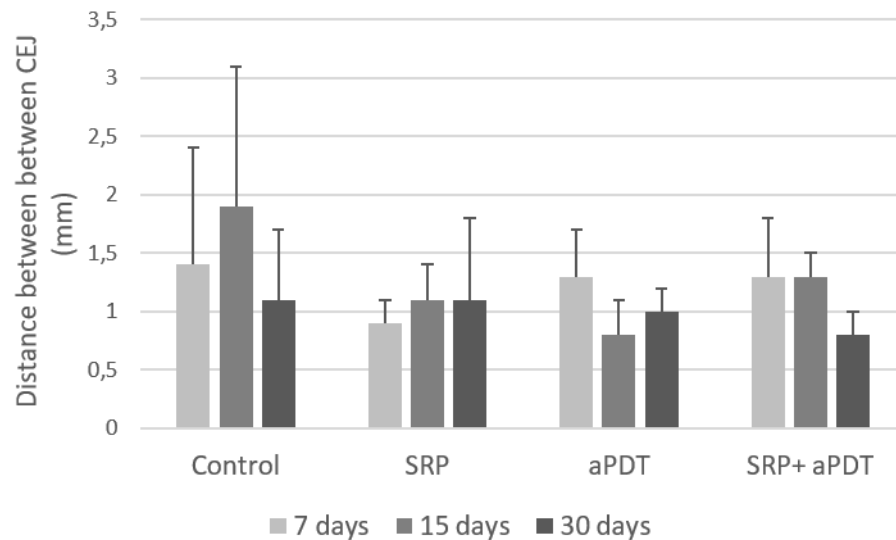
Histometric Analysis

The comparison between the experimental groups showed no significant differences ($p > 0.05$) in the volume of bone present in the furcation area (Graph 1). Regarding the mean distance between cementum-enamel junction and bone crest of the proximal areas of each tooth, no statistically significant differences were found among the groups, in as shown in Graph 2.

Graph 1 - Percentage of bone volume in the furcation region of the upper second molar, referring to the different groups and experimental periods evaluated. Data expressed as the mean (percentage) $\pm$ standard deviation.



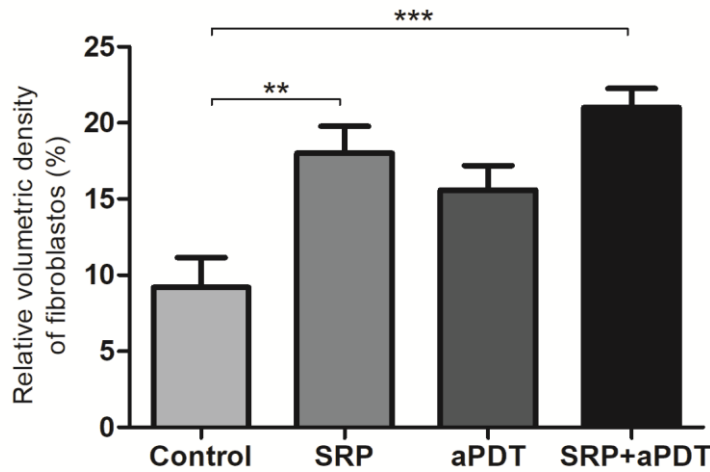
Graph 2 - Distance between cementum-enamel junction (CEJ) and the proximal and mesial regions of the bone crest in relation to the different groups and experimental periods evaluated. Data expressed as the mean (percentage) $\pm$ standard deviation.



Stereometry Analysis

On a 7-days period after the treatment, a significantly ($p < 0,001$) higher proportion of fibroblasts was observed for the SRP group compared to the Control group. The difference showed more significant ($p < 0,0001$) when the aPDT treatment was combined to scaling and root planing in aPDT+ SRP group (Graph 3).

Graph 3 - The relative volumetric density of fibroblasts at 7 days.



Discussion

This study aims at evaluating the efficacy of photodynamic therapy using the photosensitizer hypericin-glucamine as an adjuvant to scaling and root planing (SRP) in the treatment of periodontal disease. The mechanical treatment of scaling and root planing with the application of photodynamic therapy showed promising results in the treatment of periodontal disease [2, 5, 9, 10, 14, 34].

The scaling and root planning (SRP) model, although frequently used, has some limitations to fully represent the clinical reality. There is a lack of clinical instruments suitable for reduced size of the animal tooth and, consequently, the treatment is restricted to removing the mature biofilm in the accessible regions. Nonetheless, the mechanical treatment in clinical practice cannot always reach hard-accessible regions of patient's teeth, which compensate in part those limitations mentioned before."

As already described previously [18], the rats show a rapid tissue repair, therefore we evaluated its inflammatory profile by Stereometry analysis only for the periods of 7 and 15 days after removing the ligatures and treating the animals. Seven days after the treatment, the SRP and aPDT + SRP groups had a significantly higher proportion of fibroblasts than the Control group. Fibroblasts are able to modulate connective tissue response since they synthesize proteins such as collagen and elastin [20, 27], and their increased density indicates the connective tissue repair in the post-treatment period.

The histological, histometric and X-ray microtomography findings did not show a statistically significant difference between the experimental groups. The groups in which treatment with photodynamic therapy (aPDT and SRP + aPDT) were applied had similar results to those obtained in the group where only scaling and root planing (SRP) were performed. These results demonstrate that the hypericin-glucamine photosensitizer did not cause any damage to the periodontal tissues. On the other hand, Melo et al. [25] evaluated hypericin in relation to hypericin-glucamine in cultures of epithelial cells and the results demonstrated that hydrophilicity increases the efficiency of the photosensitizer, preserving its selectivity. Another justification for these results is the photosensitizer time of action where the singlet oxygen formed in the reaction during the activation of hypericin with light has a short action time and therefore a limited range of action (20 nm), which means that it will only act where hypericin-glucamine is exposed to light. This is due to the high selectivity of photodynamic therapy with hypericin-glucamine that avoids interactions with adjacent tissues.

The principle of photodynamic therapy action is the formation of reactive oxygen species. Hypericin is a polycyclic quinone that reacts with neighboring molecules when activated by transferring energy to oxygen, inducing the production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) even at low

concentrations ($<0.1 \mu\text{g} / \text{mL}$), thus, it is considered more powerful [37] and photostable than most photosensitizers [4, 24, 36]. The hypericin-glucamine photosensitizer used in our study shows that hypericin has the advantage of being effective at lower concentrations due to its hydrophilic characteristics, allowing the photosensitizer to penetrate the target cell easierly and with less aggregation [17, 25]. Since hypericin-glucamine is a modification of the hypericin photosensitizer, we maintained the 10 mcg/mL consensus for hypericin-glucamine used in this study.

In 2014, Melo et al. [25] assessed the action of hypericin in comparison to hypericin-glucamine accounting its most water-soluble derivative in the selective inactivation of *S. aureus* and *E. coli* bacteria. The study concluded that hydrophilicity increases the photodynamic efficiency of the photosensitizers, suggesting that this inactivation is related to the greater intracellular accumulation of the hydrophilic photosensitizer by the bacteria. This fact could be observed in the photoinactivation assays of *E. coli* and *S. aureus* since hypericin-glucamine caused greater inhibition of the bacteria than hypericin without prejudice to the selectivity of the photosensitizer.

Although the results from the digital microtomography and histometry for the groups treated with photodynamic therapy were similar to the SRP group, some factors should be discussed. The methodology used in this study consisted of only one section of aPDT. Although other studies claim positive results with one application [9, 14], most aPDT reports in dentistry and in cancer treatments presented a gradual improvement only after consecutive sections were performed [11]. Other factors include the concentration of the photosensitizer and the expected incubation time for light application. The periodontal disease occurs locally as a chronic inflammatory process. Thereby, the photosensitizer may have interacted with the hemoglobin from the gingival sulcus before it could react with the microorganisms in the site. In other words, the time-span of one day

between removing the ligature and treating the rats with the LED lights may have affected the effectiveness of the aPDT [3].

No significant differences were found in the analysis by computerized microtomography; however, we observed that the Control group had a tendency toward lower bone volume. The SRP and aPDT groups showed similar results for the three experimental periods. A trend towards a higher percentage of bone volume in the proximal groups of the SRP-treated after 7 and 15 days was observed. This same trend occurred the aPDT group at 30 days.

The differences in the results between the histometric analysis and microCT may be related to the characteristics of the evaluations. Microtomography promotes a 3D scan of the entire sample, obtaining a total bone volume around the tooth while, in the histometric evaluation, two slides were chosen to represent the entire tooth, which may not represent what was occurring throughout the furca [29].

Finally, the results corroborate the literature and show the importance of the mechanical treatment for periodontal disease. The aPDT with hypericin-glucamine could accentuate the repair response of the connective tissue. The method is promising and indeed there is a plenty of space for more studies, such as changing the concentration and the incubation time of the photosensitizer as well as the dose of light employed.

Conclusion

We conclude that scaling and root planing with or without photodynamic therapy with hypericin-glucamine increased density of the fibroblast and cell density. However, there is no statistically

significant difference between SRP and SRP+aPDT. Additional studies are needed to better understand the mechanisms involved in the process of recovering and improve the therapy routine.

References

1. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 221-41. doi: 10.1016/S1357-2725(01)00126-1
2. Atieh MA (2010) Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci* 25: 605-13. doi: 10.1007/s10103-009-0744-6
3. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB (2010) The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 81: 4-14. doi: 10.1902/jop.2009.090285
4. Bernal C, Tominagal TT, Ribeiro AO, Imasato H, Perussi JR (2011) Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 8: 190. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.03.225
5. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S (2008) Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 35: 877-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01303.x
6. Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Reid RC, Fairlie DP, Wyszynski RN, Zilm PS, Haynes DR (2009) The use of live-animal micro-computed tomography to determine the

- effect of a novel phospholipase A2 inhibitor on alveolar bone loss in an in vivo mouse model of periodontitis. *J Periodontal Res* 44:317-22. doi: doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01132.x
7. César Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr FH (2006) The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodont Res* 41: 118-23. 10.1111/j.1600-0765.2005.00844.x
 8. Checchi L, Montevicchi M, Gatto RM, Moreschi A, Checchi V (2007) Clinical efficacy of two toothbrushes with different bristles. *Int J Dent Hyg* 5: 242-6. Doi:_10.1111/j.1601-5037.2007.00258.x
 9. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rossler R, Gutknecht N, Sculean A (2009) Photodynamic therapy as adjunct to nonsurgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 24: 681-8. doi: 10.1007/s10103-008-0565-z
 10. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, et al.(2008) Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 79: 1638-44. doi: 10.1902/jop.2008.070652
 11. Dai T, Huang YY, Hamblin MR (2009) Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 6: 170-88. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008
 12. Drisko CH (1998) The use of locally-delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin Periodontol* 25: 947-52. doi:_10.1111/j.1600-051X.1998.tb02396.x

13. Franzò D, Philpotts CJ, Cox TF, Joiner A (2010) The effect of toothpaste concentration on enamel and dentine wear in vitro. *J Dent* 38: 974-9. doi: 10.1016/j.jdent.2010.08.010
14. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, Santinoni Cdos S, Bosco AF, et al. (2013) Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 28: 143-50. doi: 10.1007/s10103-012-1099-y
15. Hayek RRA, Araújo NS, Gloso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. (2005) Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* 76: 1275-81. doi: 10.1902/jop.2005.76.8.1275
16. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 38: 468-81. doi: 10.1002/lsm.20361
17. Karioti A, Bilia AR (2010) Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci* 11(2): 562-94. doi: 10.3390/ijms11020562
18. Klausen B (1991) Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 62:59–73. doi: 10.1902/jop.1991.62.1.59
19. Komerik N, Wilson M, and Poole S (2000) The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram negative bacteria. *Photochem Photobiol* 72: 676-80. doi: 10.1562/0031-8655(2000)0720676TEOPAO2.0.CO2

20. Lodish H, ABERK A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. In: Molecular Cell Biology. 4rd edn. W. H. Freeman, New York, pp 230-270
21. Macedo PD, Tsurumaki JN, Rossa-Junior C, Marcantonio RAC (2013) Quantificação de volume ósseo em microtomografia computadorizada: comparação entre diferentes áreas de interesse (ROI). Proceedings of the 30 th SBPqO Annual Meeting; 2013. Braz Oral Res 27(Suppl. 1) :294
22. Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C (2005) Photodynamic effects of Novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. Antimicrob Agents Chemother 49: 1542-52. doi:10.1128/AAC.49.4.1542–1552.2005
23. Malgikar S, Reddy SH, Sagar SV, Satyanarayana D, Reddy GV, Josephin JJ (2016) Clinical effects of photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to scaling and root planing of chronic periodontitis: A split-mouth randomized controlled clinical trial. Indian J Dent Res 27:121-6. doi: 10.4103/0970-9290.183130
24. Meisel P, Kocher T (2005) Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. J Photochem Photobiol B 79: 159-70. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2004.11.023
25. Melo WCMA (2014) Fotoativação seletiva dos microrganismos: Escherichia coli e Staphylococcus aureus. Dissertation, Universidade de São Paulo.
26. Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RS, Graciano AX, et al. (2012) Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. Photodiag Photodyn Ther 9: 122-31. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.11.006.

27. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D (1996) Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol* 27:896-903. doi:10.1016/S0046-8177(96)90215-4
28. Oliveira Sampaio SC, de C Monteiro JS, Cangussú MC, Pires Santos GM, dos Santos MA, dos Santos JN, et al. (2013) 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* 28: 799-806. doi: 10.1007/s10103-012-1161-9.
29. Park CH, Abramson ZR, Taba M, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein AS, Giannobile WV (2007) Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol* 78:273–281. doi: 10.1902/jop.2007.060252
30. Perussi, JR (2007) Inativação fotodinâmica de microorganismos. *Quim Nova* 30: 988-94. doi: 10.1590/S0100-40422007000400039.
31. Pfitzner A, Sigush BH, Albrecht V, Glockmann E (2004) Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol Res* 75: 1343-9. doi: doi:10.1902/jop.2004.75.10.1343
32. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E (2005) Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 76: 1100-5. doi:10.1902/jop.2005.76.7.1100
33. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N (2002) Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova* 25: 801-7. doi: 10.1590/S0100-40422002000500016

34. Stupáková V, Varinská L, Mirossay A, Sarisský M, Mojzis J, Dankovčík R, et al. (2009) Photodynamic effect of hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. *Phytother Res* 23: 827-32. doi: 10.1002/ptr.2681
35. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I (2004) Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol* 2000 36: 98-120. doi: 10.1111/j.1600-0757.2004.03675.x
36. Vuong TT, Vever-Bizet C, Bonneau S, Bourg-Heckly G (2011) Hypericin incorporation and localization in fixed HeLa cells for various conditions of fixation and incubation. *Photochem Photobiol Sci* 10: 561-8. doi: 10.1039/c0pp00324g
37. Walsh LJ (1997) The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Austr Dental J* 42: 247-54. doi:10.1111/j.1834-7819.1997.tb00129.x
38. Zanolli P (2004) Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev* 10: 203-18. doi: 10.1111/j.1527-3458.2004.tb00022.x

3.2 Publicação 2

Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats *.

Paula Delello Macedo (Macedo PD), PhD student in Periodontics¹; email: paula_mac2@yahoo.com.br

Sâmara Tfaile Corbi (SCT Corbi), PhD student in Periodontics¹; email: sa_tfaile@yahoo.com.br

Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira (Oliveira GJPL), Assistant Professor of Periodontology/Implantology²; email: guioliveiraodonto@hotmail.com

Janice Rodrigues Perussi (Perussi JR), Associate Professor in Chemistry³; e-mail: janice@iqsc.usp.br

Anderson Orzari Ribeiro (Ribeiro OA), Adjunct Professor from UFABC⁴, email: anderson.ribeiro@ufabc.edu.br

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio (Marcantonio RAC), Associate Professor in Periodontics¹; email: adriana@foar.unesp.br

¹ São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry Araraquara, Department of Diagnosis and Surgery, Araraquara, Brazil

² Federal University of Uberlândia, Dental School, Department of Periodontology, Uberlândia, MG, Brazil

³ USP, São Paulo University, Chemistry and Molecular Physics Department, São Carlos, SP, Brazil

⁴ UFABC, Federal University of ABC, Centre for Natural Sciences and Humanities, Santo André, SP, Brazil

*Formatado de acordo com as normas do periódico “Photodiagnosis and Photodynamic Therapy”, ao qual foi submetido.

Corresponding author:

Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Araraquara, Rua Humaitá, 1680, CEP 14801-903, Araraquara, SP, Brasil. Email: adriana@foar.unesp.br

Acknowledgments:

The authors would like to thank technicians Leandro Alves dos Santos and Ana Claudia Gregolin Costa Miranda for their support in the laboratory phases of this study. This study was funded by the Coordination of Personal Improvement of Higher Education (CAPES, Brasilia, DF, Brazil) and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasilia, DF, Brazil) and FAPESP (2016/00275-8).

Conflicts of interest:

The authors declare no conflicts of interest

Support:

This work received financial support from the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (BR) - (AUX PG 655/2014), the National Council for Scientific and Technological Development (BR) - (133436 / 2012-8) and FAPESP (2016 / 00275-8).

Ethical Approval

Ethical approval was granted by the Araraquara Faculty of Dentistry Ethics Committee on Animal Use (UNESP, Brazil CEUA / FOAr 07/2012).

Abstract

Objective: To evaluate the effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) using the photosensitizer hypericin-glucamine, in the progression of experimentally induced periodontal disease (PD) in rats. **Materials and methods:** Subgingival ligatures were inserted around the upper second molars of 30 rats. After 7 days (Baseline), the animals were randomly distributed into 3 experimental (n = 5) groups: Hypericin-glucamine; LED (amber LED, 700mA, 590nm, 90mW, 34.10 J/cm²) and aPDT (hypericin-glucamine + LED). The hemimaxil that received the treatment was randomly chosen, with the opposite hemimaxil used as the negative control of each animal, in which the progression of the periodontal disease was observed without treatment interference. Animal euthanasia was programmed according to each experimental period, 7 or 15 days after the Baseline. Microtomographic, histometric and Tartarate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) immunohistochemistry analyses were performed. **Results:** Computerized microtomography analyses indicate that the aPDT group presented a significantly higher percentage of bone tissue than the other groups in the 7-day experiment, corroborated by the histometric evaluation of the furcal area. During the 15-day period, the LED treated group presented the highest percentages of bone volume, significantly higher than the groups treated with Hy-g and aPDT. The histometric analysis demonstrated that the control groups presented significantly greater bone loss in the proximal regions compared to the treated groups. aPDT treatment led to lower osteoclast activity at both 7 and 15 days. aPDT, thus, exhibits positive effects in PD treatment, promoting favorable conditions for periodontal repair.

Keywords: Hypericum; Phototherapy; Periodontitis

Introduction

Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), increasingly, been applied in in periodontic research. The representativeness of the scientific publications that approach the subject suggest its importance and the imminent need for new studies that aim to understand aPDT mechanisms and its action during periodontal disease development.

aPDT action and effectiveness vary according to the chosen photosensitizer (PS) and light source. Thus, these parameters should to be discussed in order to better understand aPDT mode of action, as well as better standardize the technique, in order to achieve results that bring real benefits to the clinical practice.

aPDT action arises through the interaction between its components (light and PS) with the site of action in which they will be applied. The results depend on the intensity, exposure time, mode of operation and wavelength of the light source, whether it be a laser or light emitting diodes (LEDs) [1].

The effectiveness of aPDT varies with the type, concentration and mode of action of the PS, which in turn is influenced by the site of action to which it is assigned. The site of action influences the physical-chemical characteristics of the microorganism-PS interaction, which means that tissue color, bleeding or fluids, thermal conductivity and pH must be considered, among other local factors [1–3].

Important PS parameters regarding this interaction include relative solubility in water and lipids, ionization constant, specific factors, such as light absorption characteristics, and the formation efficiency of a triplet excited state or singlet oxygen production [1,4]. Therefore, for greater microorganism inactivation efficiency, these differences must be overcome by modifying the PS concerning its hydrophobicity and charge, according to the cellular characteristic of each microorganism [5–8].

Hypericin-glucamine (Hy-g) exhibits several desirable properties as a PS to be allied in aPDT, including a high quantum yield of singlet oxygen generation, high extinction

coefficient close to 600 nm and relatively low dark toxicity [9,10]. Studies have demonstrated significant phototoxic hypericin power in the PDT treatment of psoriasis and other skin diseases [11,12], as well as potent anti-cancer activity, inducing both apoptosis and tumor cell necrosis [13], and the ability to promote microorganism inactivation [10,14–16], thus, being considered one of the most potent PS found in nature [17–19].

In this context, the present study aims to evaluate the action of hypericine-glucamine aPDT, activated by an amber LED source (34.10 J/cm²) in the progression and development of experimentally induced periodontal disease (PD) in rats.

Material and methods

Animals

The present study used 30 male adult rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing between 300-330 grams. The animals were kept in plastic boxes with a maximum of 3 animals per box, in a controlled light, humidity and temperature environment. The study was submitted to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA n ° 07/2012).

Periodontal disease induction

The animals were anesthetized with a combination of Xanthine (Virilaxine Hydrochloride - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.) and Ketamine (Ketamine Hydrochloride - Francotar 3% - Virbac do Brasil Ind. And Com.), at 0.08 mL/100g and 0.04 mL/100g body weight, respectively. No. 24 cotton strands (Cotton Chain, Coats Corrente Ltda., São Paulo, SP, Brazil) were inserted into the subgingival region around both upper second molars for PD induction and maintained throughout the experimental period until animal euthanasia.

Experimental groups

The treatments for each experimental group were applied after 7 days of ligature insertion (Baseline). The hemimaxil that received the treatment (right or left) was randomly chosen, with the contralateral hemimaxil used as negative control. The animals were randomly distributed between the groups (n = 5):

For animals belonging to the aPDT group, irradiation was applied after 10 minutes of PS incubation. At the time of application, 1 mL, approximately 0.2 mg of PS ointment, was deposited in the groove to be treated and kept in the dark for 10 minutes (incubation time).

- **Hy-g (Hypericin-glucamine) Group:** At the time of application, 1 mL, approximately 0.2 mg of the PS ointment was deposited in the groove to be treated, kept in the dark for 10 minutes (incubation time) and removed with the aid of a cotton swab;
- **LED Group:** An amber-colored LED was used, at a current of 700mA, diameter 11mm, wavelength 590 nm (equivalent to the maximum absorption band of hypericin, which does not change for hypericin-glucamine) and converted power of 90 Mw (MM Optics, São Carlos/SP - Brazil). The tip diameter was adequate to simultaneously cover all the faces of the evaluated tooth, so an amber LED transmucosal application was performed for 6 minutes, resulting in a 34.10 J/cm² dosage.
- **aPDT Group (Hy-g +LED):** PS application, as described for the "Hy-g" group, followed by LED activation as described for the "LED" group.

Animal euthanasia was programmed according to the experimental period of 7 or 15 days after the Baseline. Animals were euthanized with an anesthetic overdose and the

hemimaxillae were removed and fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours, washed in running water for 24 hours and stored in 70% alcohol.

Standards used for Hypericin-glucamine aPDT

The PS preparation was carried out 15 days before its use, at the Photosensitizer Laboratory of the São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo (IQSC-USP). Manipulation of the hypericin-glucamine ointment was carried out from a stock solution, synthesized by Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro, at the Federal University of ABC. The hypericin-glucamine PS stock solution ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) was prepared in a polar aprotic solvent, dimethyl sulfoxide (DMSO), sterilized by filtration through a $0.22 \mu\text{m}$ membrane and kept in the dark. The working solution was prepared by diluting the stock solution in sodium phosphate buffer (pH 7.2), resulting in a semi-solid, with final concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, where the DMSO percentage was less than 1%

Digital Microtomography Evaluation (μCT)

After the fixation period in paraformaldehyde, the hemimaxillae were stored in 70% alcohol and submitted to X-ray beam scanning in a computerized digital microtomography system, which evaluates the percentage of bone volume present in the upper second molar region, for bone tissue quantification. The pieces were scanned in a SkyScan microtomograph (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium, 2003), at Al 0.5mm filter; voxel size: 17.48 micrometers, voltage of 50 KV and 500 microamper electric current. After the fixation period, the images obtained by X-ray projection in the samples were stored and reconstituted by the NRecon software, rotated and repositioned in a standard orientation using the DataViewer software and saved in the coronal plane. The CTAnalyser - CTAn software was then used to define the region of interest

(ROI)[20,21]. Two ROIs were defined: the first comprising the second molar in the coronoid/apical sense of the furcation ceiling region up to 1,000 micrometers in the apical direction until its proximal limitations with neighboring teeth, and the second with the same anatomical delimitation of the first, but circling and covering only the roots of the second molar. To obtain the percentage of bone volume, the second ROI was subtracted from the first.

Histological processing

After the computerized microtomography analysis, the hemimaxillae were washed in running water for 24 hours and submitted to a decalcification process, followed by routine histological processing. Briefly, the hemimaxillae were embedded in paraffin in the mesio-distal direction along the axis of the tooth. Four micrometres were cut and placed on three slides each, totaling 10 slides. Slides 1, 3, 4, 5 and 7 were stained by hematoxylin-eosin (HE) and used in the histometric analyses, while slides 2, 6 and 10 were reserved for the immunohistochemical analyses.

Histometric Analyses

Furca and proximal area

The second molar images were captured using a DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) 40X magnification optical microscope, and sent to a microcomputer with the aid of a DXC-1107A/107AP video camera (Sony Electronics Inc, Japan).

Measurements were performed by a trained and blind examiner, who selected three histological images from each animal, corresponding to the beginning, middle and end of each sample. The ImageJ - Launcher software version 1.48b (National Institutes

of Health, USA) was used. The analyzed area was defined by measuring 1000 μm in the apical sense, from the furca ceiling and limited horizontally by the roots of the second molar [22,23]. Photomicrographs at a 10-fold magnification were used to evaluate bone loss extension values of the proximal area,. Horizontal lines were drawn at the height of the cementum-enamel junction up to the height of the bone crest. The distance between the lines was measured with the aid of the software Image J, initially in micrometers and later transformed to millimeters.

Immunohistochemistry for Tartarate Resistant Acid Phosphatase (TRAP)

Immunohistochemical analyses were performed to identify and locate the expression of the tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) protein. The sections were subjected to blocking of nonspecific epitopes by the application of 3% hydrogen peroxide for 30 minutes and 3% bovine albumin protein (BSA) for 2 hours. Immediately after, the cuts were incubated for 16 hours with the primary antibody at a 1:100 ratio (Abcam, Inc. Cambridge, MA, USA). Negative controls comprised histological sections treated by normal IgG (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), replacing the primary antibody, at the same dilution. Subsequently, the cuts were treated by the avidin-biotin-peroxidase (ABC) complex method using the ABC Staining System kit (ABC kit DAKO A/S, Copenhagen, Denmark) according to the manufacturer's instructions. The sections were counterstained with a Carrazi hematoxylin solution for visualization of cell nuclei. The TRAP analysis was performed by counting the stained osteoclasts in contact with the bone tissue of the furcation region and around the second molar [23]. The result of each sample was given as the sum of the osteoclast values present in the region of interest. All analyses were performed by a blind and trained examiner.

Statistical analyses

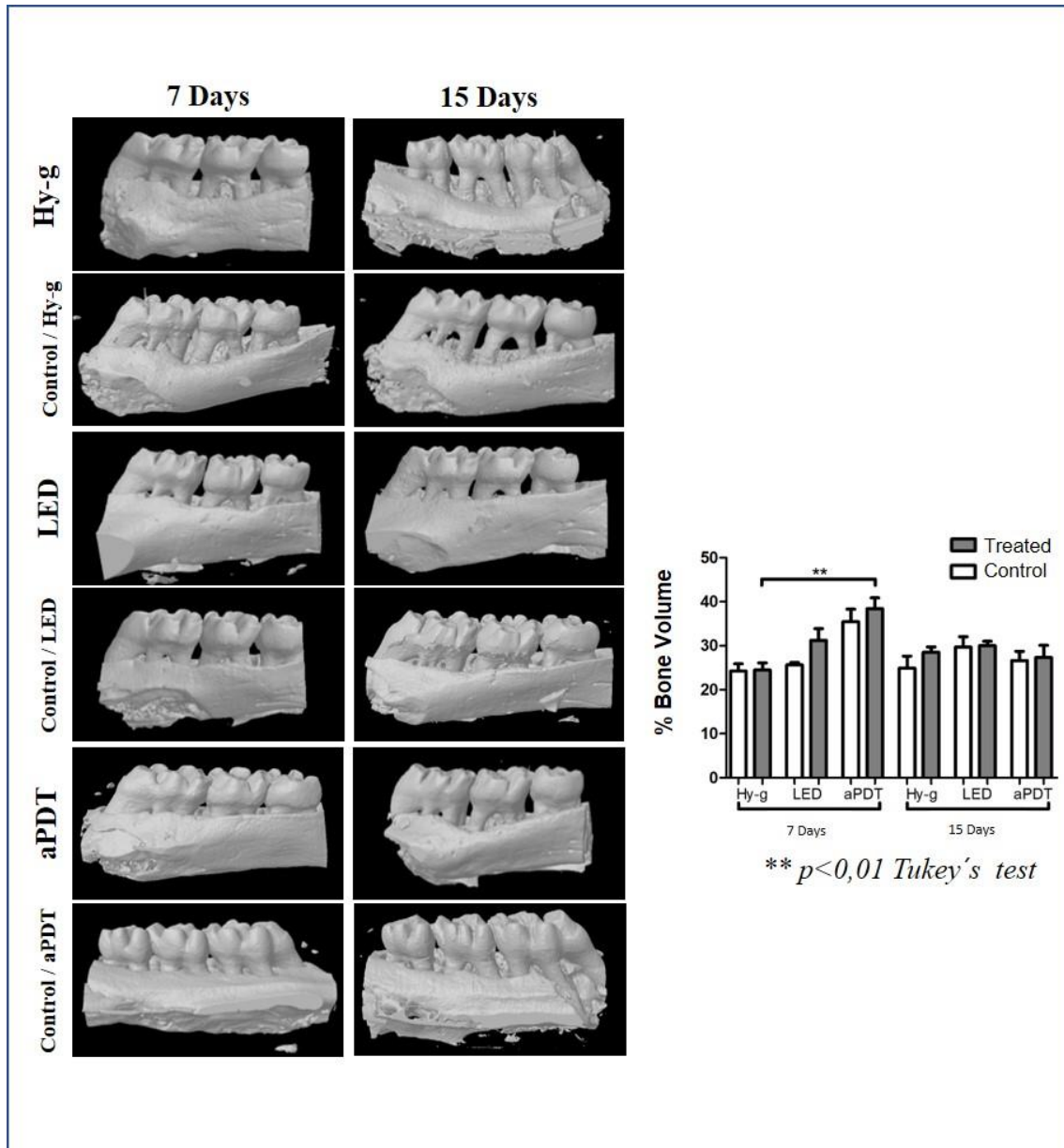
The power of the study was 95% for a 5-animal sample ($p < 0.05$). The Graphpad 5.0 software (Graphpad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA) was used for the statistical analyses. The data were statistically evaluated using the Shapiro-Wilk normality test. The data concerning the analyses between the treated hemimaxillae and their negative controls were submitted to the paired Student's t-test, and comparisons between the treated groups were carried out by the Anova parametric test complemented by the Tukey test. All analyses were applied at a significance level of 95%.

Results

Computerized microtomography (μ CT)

The X-ray micrograph analysis assessed the percentage of bone tissue present in the second molar region. No significant difference was observed between the hemimaxil that received the proposed treatment in relation to the control side for both experimental periods, although the treated groups exhibited a trend of higher percentage of bone tissue (Graph 1). Hemimaxills treated with aPDT showed a significantly higher percentage of bone tissue than those treated only with Hypericin-glucamine only for the 7 day-experiment ($p < 0.01$).

Figure 1 – Panel exhibiting representative 3D images, generated by computerized microtomography. The representation of the bone tissue percentage present in the region of interest (proximal and furca) of the second upper molar is displayed for the experimental groups and periods.



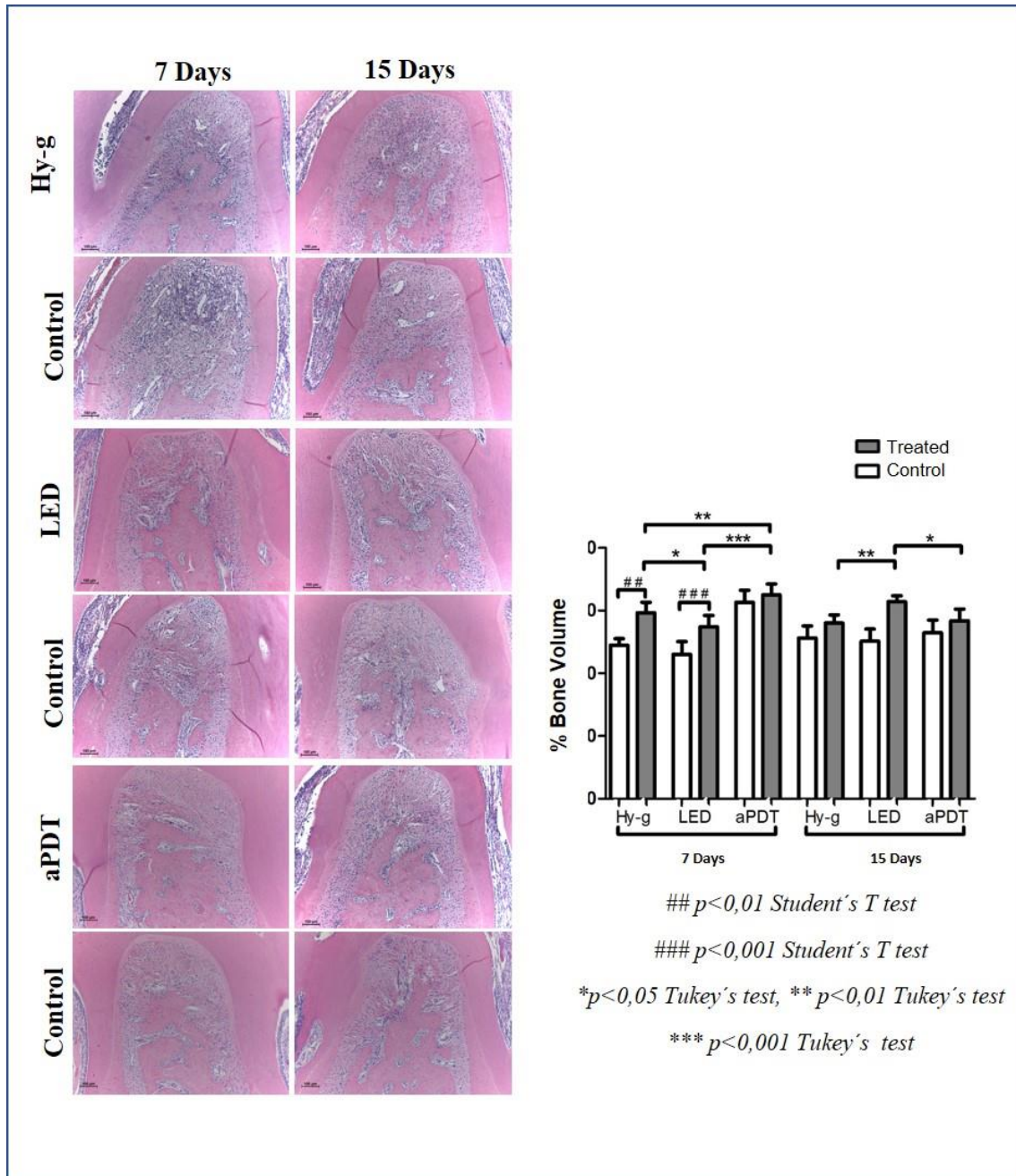
Histometric analyses

Furca region

For the 7-day period experiment, the hemimaxillae treated with hypericin-glucamine ($p < 0.01$) and LED ($p < 0.001$) presented significantly higher bone volume percentages in the furcation region compared to the control side. All groups showed a trend for higher bone volume percentage in the treated hemimaxillae. Hypericin-glucamine treated hemimaxillae from the 7-day experimental presented a significantly higher bone volume percentage compared to LED-treated hemimaxillae ($p < 0.05$), while those treated with aPDT presented higher bone tissue percentage compared to those treated with hypericin-glucamine ($p < 0.01$) and LED ($p < 0.001$) (Graph inlay in Figure 2).

For the 15-day period experiment, the group treated with LED presented the highest bone volume percentage, significantly higher than the groups treated with hypericin-glucamine ($p < 0.001$) and with aPDT ($p < 0.05$) (Graph inlay in Figure 2).

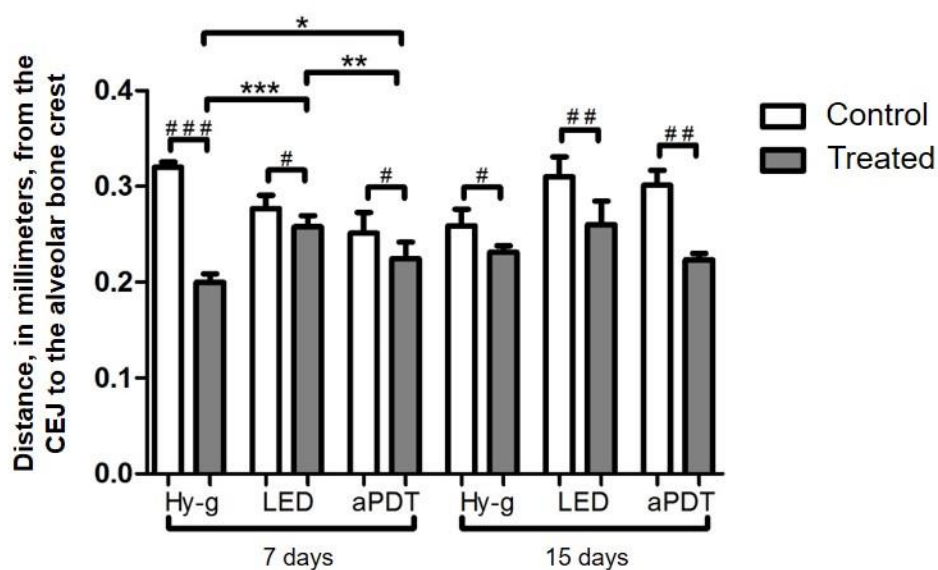
Figure 2 – Photomicrograph panel exhibiting the furcation region of all experimental groups, and their respective controls, for the 7 and 15-day experimental periods. HE, 100x. The graph inlay indicates the mean percentages and standard deviations of bone tissue present in the furcation region of the upper second molar, referring to the different groups and experimental periods evaluated by histometry.



Interproximal region

All control groups exhibited significantly greater bone tissue loss compared to the treated groups (Graph 1). Regarding the 7-day treatment, the LED-treated group exhibited significantly higher interproximal bone loss compared to the aPDT group ($p < 0.01$) and the Hypericin-glucamine group ($p < 0.001$), while the aPDT group presented higher bone loss than the group treated only with Hypericin-glucamine ($p < 0.01$). No significant differences were detected between the proposed treatments for the 15-day experiments.

Graph 1 - Representation of the mean distance, in millimeters, from the cementum enamel junction (CEJ) to the alveolar bone crest, in the interproximal region of the upper second molar, referring to the evaluated groups and experimental periods.



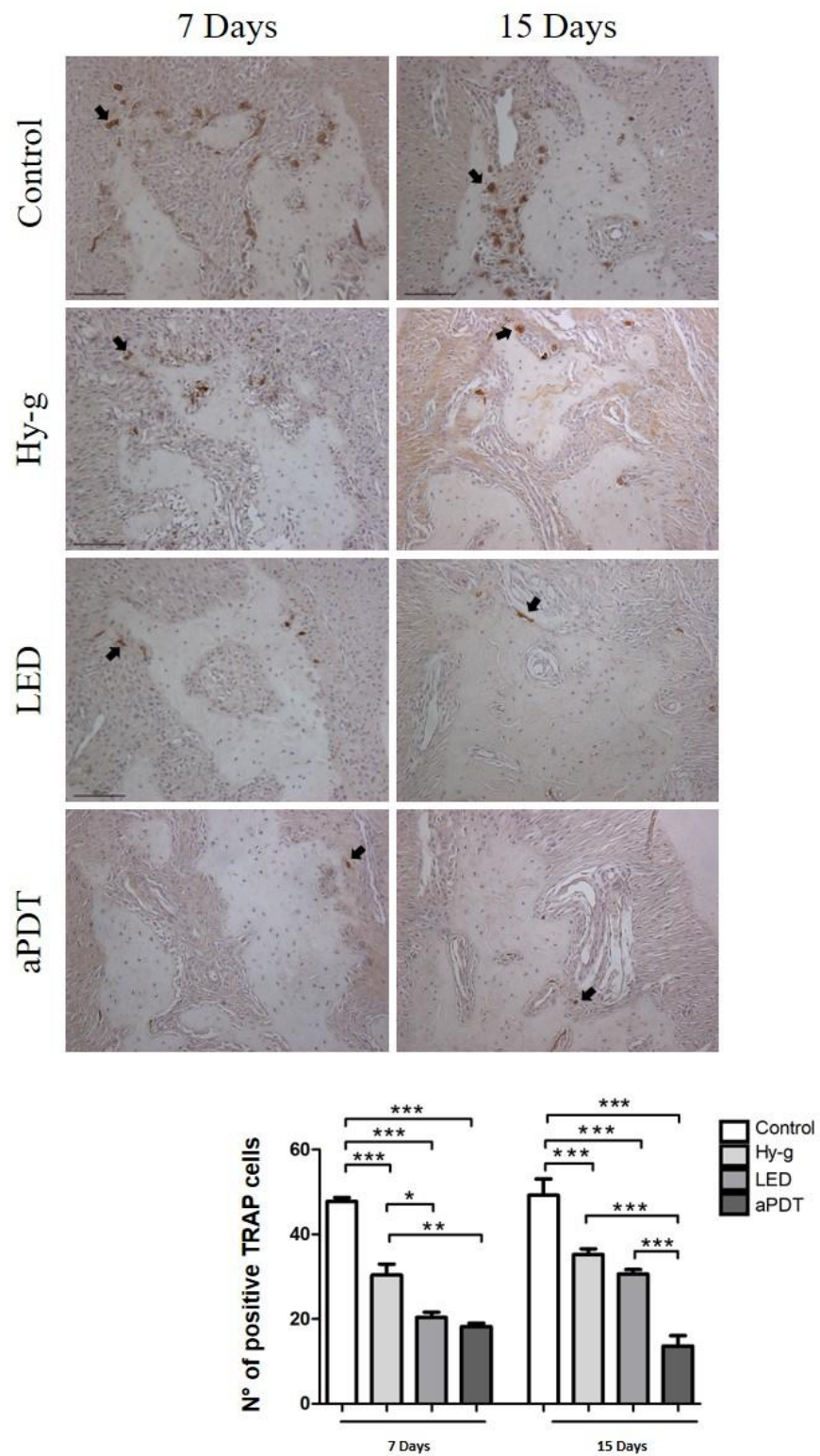
$p < 0.05$ Student's *t* test / ## $p < 0.01$ Student's *t* test / ### $p < 0.001$ Student's *t* test

* $p < 0.05$ Tukey test / ** $p < 0.01$ Tukey test / *** $p < 0.001$ Tukey test

Immunohistochemistry for Tartarate Resistant Acid Phosphatase (TRAP)

The groups with highest TRAP staining were the control groups, with a trend for greater staining in the longer ligature period (Graph 2). Significantly fewer positive TRAP cells for the aPDT group were observed within 7 days after treatment, relative to controls for all periods. In the 15-day period, lower staining was observed in relation to the control, aPDT ($p < 0.01$) and LEDs ($p < 0.01$) groups.

Figure 3 – Representative photomicrograph panel of the immunohistochemical analyses. HE, 100x. The arrows point to positively labeled TRAP cells. The graph indicates the mean percentages and standard deviations of the number of cells positively labeled for TRAP in the upper second molar region, referring to the different experimental groups and their respective controls, at 7 and 15 days.



Discussion

In the present study, the effects of aPDT and its components, Hy-g and an amber LED source, were evaluated concerning the progression and development of PD. When the isolated effect of Hypericin-glucamine was evaluated 7 days after treatment, a significantly higher bone tissue percentage in the furcation area was detected, as well as less bone loss in the interproximal region compared to the controls, that received no treatment. These results were better explained by the immunohistochemical analyses, which presented lower osteoclast cell staining in the Hy-g treated hemimaxillae compared to the controls. The results are consistent with the literature, where Hypericin effects as a drug and not as a PS are reported, and therapeutic action, such as anti-inflammatory and biomodulating properties were detected [24–26].

Previous studies [10,27–29], evaluated the best conditions for the photoinactivation of *S. aureus* and *E. coli*, testing hypericin and its hydrophilic derivative, hypericin-glucamine, activated by amber LED, similar to the present study. The authors concluded that, due to Hy-g hydrophilicity, greater intracellular PS accumulation in the microorganisms was possible without, however, harming their selectivity. In the present study, the lowest bone loss was observed in the aPDT-treated group, while the highest bone tissue percentage was detected by digital microtomography for the 7-day period, in the aPDT-treated group. This can be explained by the results of the osteoclast activity analyses, which was significantly lower for this experimental group, for both experimental periods.

The effectiveness of Photodynamic Therapy treatment depends on factors such as light length, intensity, exposure time and operation mode of the light source, which may be a laser or light emitting diodes (LEDs)[1]. An amber colored LED was applied herein, and after 7 days, less osteoclastic activation was observed, leading to higher bone tissue

percentages in the furcation region and lower bone loss in the interproximal regions compared to the control hemimaxillae. Other studies corroborate these findings, evidencing the biomodulating role of LED sources in periodontal tissue. Choi et al.[30], evaluated LED application (635nm) on human gingival fibroblasts treated with or without *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides (LPS), and observed inhibition of proinflammatory cytokine activation, demonstrating that LED irradiation may be clinically useful as an anti-inflammatory. Fonseca et al. [31], in 2013, analyzed the effects of a LED source application (940nm) on periodontal healing after experimental orthodontic traction in rats, observing a lower number of osteoclasts and inflammatory cells, as well as increased blood vessels, suggesting a decrease in inflammation and root resorption.

Both histometric evaluations in the furca area and computerized microtomography, which allows for a comprehensive reading of the entire second molar region, indicated no significant differences between the bone tissue percentages present in the treated groups and their respective controls for the 15-day experiment. Although it was necessary for the objectives of this study, continuous induction led to sufficient time for site recolonization and significantly higher development of PD. However, the model applied herein mimics the disease process in areas of difficult access for mechanical treatment [23,32,33].

The individualized study of aPDT components demonstrated that both the employed LED and PS do not cause damage to periodontal tissue and bring benefits to the treatment of periodontitis, with more expressive results when they act together in aPDT. Thus, the understanding of the mechanisms of action of both the LED source and hypericin-glucamine should be better elucidated, in order to allow for more adequate technique standards for the periodontal site, in order to produce more expressive results.

Conclusions

Both hypericin-glucamine and LED exhibit therapeutic properties and contribute to the biomodulation of periodontal tissue, with the aPDT technique, when applied as proposed, demonstrating promising results. However, for a greater expressiveness of the findings reported herein, further studies should be performed, evaluating the effectiveness of more than one therapy application session and the investigation of its mode of action.

References

- [1] C.M. Cassidy, M.M. Tunney, P.A. McCarron, R.F. Donnelly, Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 95 (2009) 71–80. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.01.005.
- [2] W.C. de Melo, P. Avci, M.N. de Oliveira, A. Gupta, D. Vecchio, M. Sadasivam, R. Chandran, Y.-Y. Huang, R. Yin, L.R. Perussi, G.P. Tegos, J.R. Perussi, T. Dai, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 11 (2013) 669–693. doi:10.1586/14787210.2013.811861.
- [3] L. Huang, Y. Xuan, Y. Koide, T. Zhiyentayev, M. Tanaka, M.R. Hamblin, Type i and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria, *Lasers Surg. Med.* 44 (2012) 490–499. doi:10.1002/lsm.22045.
- [4] V. Kussovski, V. Mantareva, I. Angelov, P. Orozova, D. Wöhrle, G. Schnurpfeil, E. Borisova, L. Avramov, Photodynamic inactivation of aeromonas hydrophila by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity, *FEMS Microbiol. Lett.* 294 (2009) 133–140. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01555.x.
- [5] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy targeted to pathogens., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 17 (2011) 245–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190896>.
- [6] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2329–2335. doi:10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.
- [7] T. Maisch, A New Strategy to Destroy Antibiotic Resistant Microorganisms: Antimicrobial Photodynamic Treatment, *Mini-Reviews Med. Chem.* 9 (2009) 974–983.

doi:10.2174/138955709788681582.

- [8] T. Maisch, C. Bosl, R.M. Szeimies, N. Lehn, C. Abels, Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1542–1552. doi:10.1128/AAC.49.4.1542-1552.2005.
- [9] C. Bernal, T.T. Tominaga, A.O. Ribeiro, H. Imasato, J.R. Perussi, Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 8 (2017) 190. doi:10.1016/j.pdpdt.2011.03.226.
- [10] C. Bernal, J. a. O. Rodrigues, a. P.P. Guimarães, a. O. Ribeiro, K.T. Oliveira, H. Imasato, J.R. Perussi, Selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin, *Laser Phys.* 21 (2010) 245–249. doi:10.1134/S1054660X1101004X.
- [11] A.R. Kamuhabwa, R. Roelandts, P.A. De Witte, Skin photosensitization with topical hypericin in hairless mice, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 53 (1999) 110–114. doi:10.1016/S1011-1344(99)00135-9.
- [12] B. Krammer, T. Verwanger, Molecular Response to Hypericin-Induced Photodamage, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 793–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22214453>.
- [13] F.E. Fox, Z. Niu, A. Tobia, A.H. Rook, 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.* 111 (1998) 327–332. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00278.x.
- [14] V. Engelhardt, B. Krammer, K. Plaetzer, Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*., *Photochem. Photobiol. Sci.* 9 (2010) 365–9. doi:10.1039/b9pp00144a.
- [15] C.M.N. Yow, H.M. Tang, E.S.M. Chu, Z. Huang, Hypericin-mediated photodynamic

- antimicrobial effect on clinically isolated pathogens., *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 626–32. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01085.x.
- [16] A. Rezusta, P. López-Chicón, M.P. Paz-Cristobal, M. Alemany-Ribes, D. Royo-Díez, M. Agut, C. Semino, S. Nonell, M.J. Revillo, C. Aspiroz, Y. Gilaberte, In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species., *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 613–9. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01053.x.
- [17] J.R. Perussi, I. De Química, D.S. Carlos, U.D.S. Paulo, S.C. Sp, *Divulgação*, 30 (2007) 988–994.
- [18] V. Stupáková, L. Varinská, A. Mirossay, M. Sarisský, J. Mojzis, R. Dankovčík, P. Urdzík, A. Ostró, L. Mirossay, Photodynamic effect of hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines., *Phytother. Res.* 23 (2009) 827–32. doi:10.1002/ptr.2681.
- [19] W. de C.M.A. de Melo, J.R. Perussi, Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos, *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* 33 (2012) 331–340.
- [20] M.D. Cantley, P.M. Bartold, V. Marino, R.C. Reid, D.P. Fairlie, R.N. Wyszynski, P.S. Zilm, D.R. Haynes, The use of live-animal micro-computed tomography to determine the effect of a novel phospholipase A2 inhibitor on alveolar bone loss in an in vivo mouse model of periodontitis, *J. Periodontal Res.* 44 (2009) 317–322. doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01132.x.
- [21] M.L. Boussein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Mu, Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro – Computed Tomography, *J. Bone Miner. Res.* 25 (2010) 1468–1486. doi:10.1002/jbmr.141.
- [22] J.B. César-Neto, B.B. Benatti, E.A. Sallum, M.Z. Casati, F.H. Nociti, The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: A

- histometric study in rats, *J. Periodontal Res.* 41 (2006) 118–123. doi:10.1111/j.1600-0765.2005.00844.x.
- [23] C. Pavone, A. Vilas, B. Nogueira, P.S. Cerri, E.M. Jr, R. Adriana, C. Marcantonio, Treatment of periodontal disease with an Er , Cr : YSGG laser in rats exposed to cigarette smoke inhalation, (2015) 2095–2103. doi:10.1007/s10103-015-1731-8.
- [24] P. Zanolli, Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort., *CNS Drug Rev.* 10 (2004) 203–218. doi:10.1111/j.1527-3458.2004.tb00022.x.
- [25] B. Martínez-Poveda, A.R. Quesada, M.Á. Medina, Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process, *Int. J. Cancer.* 117 (2005) 775–780. doi:10.1002/ijc.21246.
- [26] U. Wölflle, G. Seelinger, C.M. Schempp, Topical Application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), *Planta Med.* 80 (2014) 109–120. doi:10.1055/s-0033-1351019.
- [27] W. de Melo, Fotoinativação seletiva dos microrganismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, USP, 2014.
- [28] W.C.M. a Melo, L.F. Castro, R.M.M.T.S.D. Mas, J.R. Perussi, Effectiveness of photodynamic therapy on Gram-negative bacteria, (2011) 662–667.
- [29] W. de C.M.A. de Melo, A.N. Lee, J.R. Perussi, M.R. Hamblin, Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10 (2013) 647–650. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.08.001.
- [30] C.H.W.I.J.Y.H.S.K.X.O.Y.S. O, Inflammatory cytokines are suppressed by light-emitting diode irradiation of *P.gingivalis* LPS-treated human gingival fibroblasts: inflammatory cytokine changes by LED irradiation., *Lasers Med Sci.* 27 (2012) 459–467.
- [31] P. D'Andrea Fonseca, F.M. De Lima, D.T. Higashi, D.F.V. Koyama, D. De Oliveira

- Toginho Filho, I.F.L. Dias, S. De Paula Ramos, Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats, *Lasers Med. Sci.* 28 (2013) 49–55. doi:10.1007/s10103-012-1061-z.
- [32] J. Dai, Y. Ma, M. Shi, Z. Cao, Y. Zhang, Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis, (2016) 581–588. doi:10.1007/s00784-015-1531-3.
- [33] P.M. Duarte, K.R. Tezolin, L.C. Figueiredo, M. Feres, M.F. Bastos, Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats., *Arch. Oral Biol.* 55 (2010) 142–7. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.10.006.

4 DISCUSSÃO

No primeiro estudo, avaliamos o papel da aPDT como terapia isolada ou adjunta ao tratamento básico de raspagem e alisamento radicular, para o tratamento da doença periodontal induzida em ratos. Os achados histológicos, histométricos, e microtomografia digital, não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, entretanto foi observada maior tendência à reparo tecidual nos grupos tratados com a aPDT. Como parte da metodologia do primeiro estudo, as ligaduras foram removidas no dia anterior à aplicação dos tratamentos, para viabilizar a instrumentação mecânica e para que não houvesse interferência de exsudado ou sangue no sulco gengival. Entretanto, acreditamos que isso possa ter mascarado os resultados, dada a reconhecida reparação tecidual que ocorre quando são removidas as ligaduras^{33,50}.

Os resultados obtidos nos grupos com a terapia fotodinâmica foram comparáveis ao grupo RAR, e sempre superiores a ausência de tratamento. A análise estereométrica deu suporte a estes achados, mostrando maior densidade de fibroblastos nos grupos tratados pela aPDT, indicando um maior reparo periodontal. Assim como grande parte dos estudos que utilizam a aPDT como terapia adjuvante no tratamento da doença periodontal, nossos resultados foram promissores, mas não conclusivos^{34,51-55}.

A aPDT se dá, pela ação de um dado fotossensibilizador, ao ser ativado por uma fonte de luz com comprimento de onda adequado, interagindo com o sítio de ação e gerando oxigênio singlete e outros subprodutos metabólicos tóxicos a determinados microorganismos⁴⁸. As características do fotossensibilizador, da fonte de luz utilizada, e do sítio de ação no qual a aPDT será aplicada, são variáveis que devem ser entendidas e corretamente combinadas, para que se alcance o máximo aproveitamento da técnica no tratamento.

O Photofrin® foi o primeiro FS a ser comercializado e é utilizado até hoje, no tratamento de câncer de pulmão, colo do útero, bexiga e esôfago^{56,57}. Ele faz parte da primeira geração de fotossensibilizadores, e apesar do êxito obtido nos tratamentos, possui algumas desvantagens, implicando na necessidade de grandes quantidades de fármaco para se obter o efeito desejado, e devido ao seu tempo e eliminação do organismo ser muito alto, os pacientes tem que evitar exposição à luz solar por até oito semanas⁵⁸. A maioria dos estudos que aplicam a aPDT como terapia adjuvante para o tratamento da doença periodontal, utilizam o azul de metileno (MB) como fotossensibilizador⁵⁹⁻⁶¹. Estudos em animais tem mostrado bons resultados,^{60,62} entretanto, em ensaios clínicos a eficácia da aPDT com MB ainda apresenta resultados inconclusivos^{59,63}

A maioria dos estudos que aplicam a aPDT como terapia adjuvante para o tratamento da doença periodontal, utilizam o azul de metileno (MB) como fotossensibilizador^{59-61,64}. Estudos em animais tem mostrado bons resultados,^{62,65} entretanto, em ensaios clínicos a eficácia da aPDT com MB ainda apresenta resultados inconclusivos^{59,63}.

A Hipericina, faz parte da segunda geração de fotossensibilizadores, que apresentam melhorias nas características farmacocinéticas e físico-químicas, acarretando em maior formação de oxigênio singleto⁴⁴. Yow³⁷, determinou o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica com hipericina em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e observou que a eficácia da terapia foi fortemente afetada pela estrutura celular e absorção do fotossensibilizador. A combinação da hipericina com a irradiação de luz induziu morte celular de *S. aureus* (G-positivas), mas não foi efetiva para as células de *E. coli* (G-negativas). A autora atribuiu tal resultado as diferenças estruturais de parede celular/membrana, que afetaram a captação celular da hipericina. Deste modo, em nossos estudos, foi utilizada a Hipericina-glucamina, na qual a presença de vários grupos

hidroxila na supramolécula Hy-G, fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio são estabelecidas, aumentando sua hidrofilicidade⁴³.

Deste modo, para melhor elucidar os efeitos de cada componente da aPDT, o segundo estudo se propôs a avaliar a ação da hipericina-glucamina e do LED na progressão e desenvolvimento da doença periodontal, mantendo a ligadura como meio de indução da doença periodontal durante todo o período experimental. Devido a presença da ligadura, que dificulta o acesso ao sulco gengival, para o segundo estudo o fotossensibilizador foi manipulado na consistência de pomade, para que permanecesse depositado sobre a ligadura e tecido gengival ao redor do segundo molar durante o período de incubação.

As hemi-maxilas tratadas com Hipericina-glucamina, LED ou aPDT (Hy-g +aPDT) foram comparadas às suas contra-laterais, nas quais a progressão da periodontite experimental não sofreu a ação de nenhum tratamento. Os resultados obtidos demonstraram que tanto a Hipericina-glucamina quanto o LED interferem na progressão da doença periodontal, possivelmente por suas características biomoduladoras e anti-inflamatórias, resultando em menor ativação de osteoclóstos e consequentemente maior volume ósseo na região de furca e menores perdas ósseas nas cristas proximais. E a aPDT (Hy-g+LED), demonstrou ser a somatória dos efeitos positivos da combinação do FS com o LED, tendo não somente melhores resultados com relação as hemi-maxilas não tratadas, mas entre todos os grupos experimentais.

Embora haja diferenças explícitas nas metodologias dos dois trabalhos desenvolvidos, os resultados do segundo estudo reforçam a aPDT com hipericina-glucamina ativada por LED âmbar como terapia promissora para o tratamento da doença periodontal. Tendo em vista que a terapia com aPDT interferiu positivamente nos mecanismos de reabsorção, inibindo a progressão da doença periodontal, acreditamos que mais estudos devam ser realizados para elucidar sua ação na

microbiota específica da periodontite, testando diferentes concentrações e tempos de incubação do fotossensibilizador, além da terapêutica com sucessivas aplicações de aPDT.

5 CONCLUSÃO

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

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 $(34,10 \text{ J/cm}^2)$, 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, Coppelotti 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 [O₂(¹DELTA.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>
 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 Toginho 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,* 'ucia 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.

6 APÊNDICE A

Material e Método Publicação 1

Comitê de Ética

O estudo foi submetido ao Conselho de Ética no Uso de Animal da FOAr-UNESP (CEUA) e aprovado em 09/05/2012. Proc. CEUA nº 07/2012.

Amostra

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus Holtzman*, adultos, com peso variando entre 300-350g, sendo mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP, com luz e temperatura controladas, e tratados com ração e água *ad libitum* antes e durante todo o período experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em caixas plásticas coletivas, resultando em 5 animais por caixa.

Preparo do Fotossensibilizador

O preparo do fotossensibilizador foi realizado no Laboratório de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos, na Universidade de São Paulo (IQSC-USP). A hipericina-glucamina foi obtida a partir de uma solução de estoque sintetizada pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC. A solução estoque do FS (200 µmol L⁻¹) foi obtida em solvente aprótico polar, dimetil sulfóxido (DMSO), esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm e mantida ao abrigo da luz. A solução de trabalho foi preparada, diluindo-se a solução de estoque em tampão fosfato de sódio (pH 7,2), obtendo-se a concentração final de 10 µg/mL, onde a porcentagem final de DMSO foi inferior a 1%.

Fonte de Luz

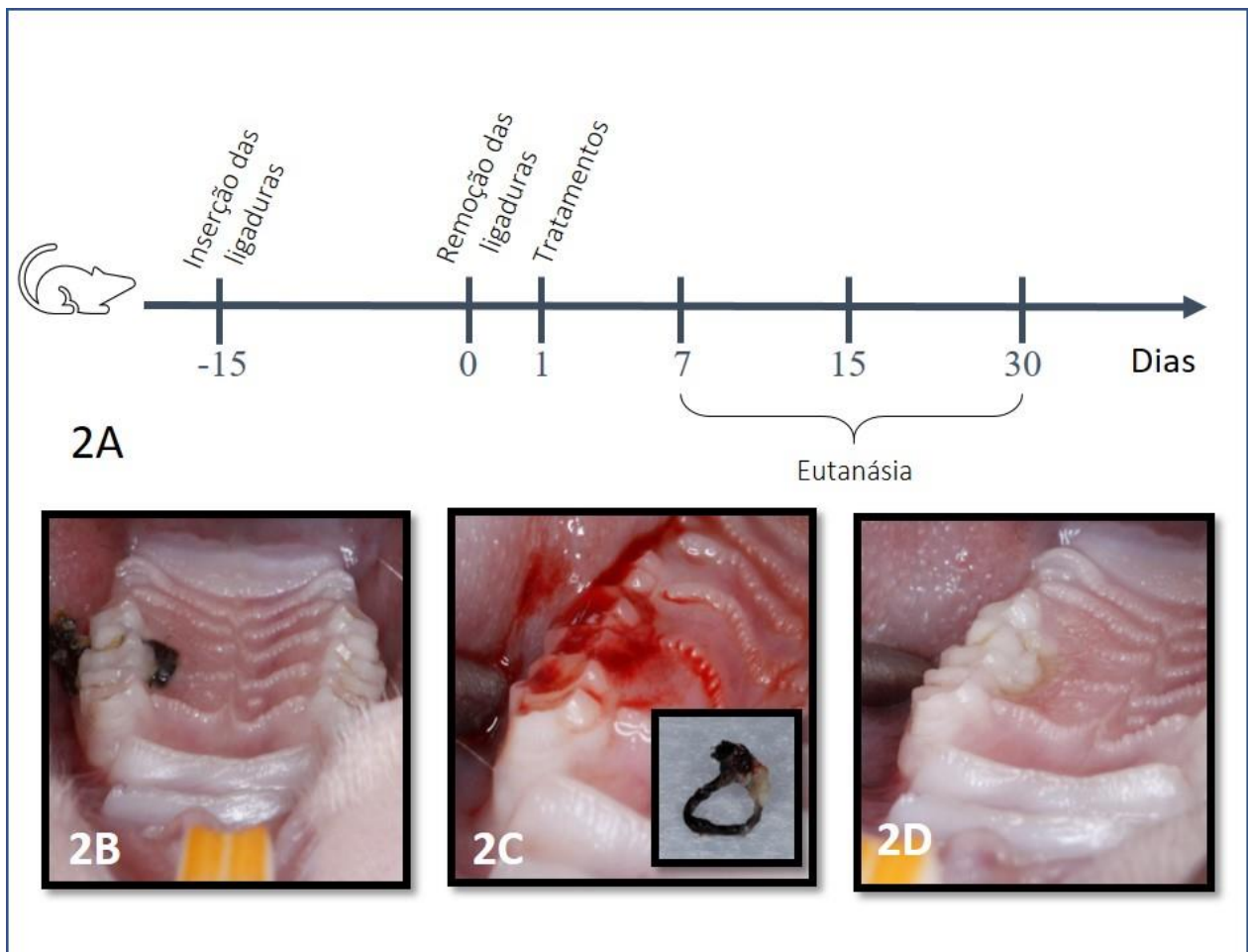
A fonte de luz necessária para ativar o fotossensibilizador Hipericina-glucamina deve ter comprimento de onda 590nm, coincidindo com a banda de absorção máxima da Hipericina. Para a realização deste estudo, foi desenvolvido um LED de cor âmbar, corrente de 700mA, comprimento de onda 590nm (coincidindo com a banda de absorção máxima da hipericina, que não se altera para a hipericina-glucamina) e potência convertida de 90Mw (MM Optics, São Carlos/SP – Brasil).

O LED desenvolvido possui um diâmetro de ponta adequado para abranger simultaneamente todas as faces do dente, deste modo, foi realizada uma aplicação transmucosa de LED âmbar, por 6 minutos, resultando na dosagem de 34,10 J/cm². Para os animais do grupo aPDT, a irradiação ocorreu após os 10 minutos de incubação do FS.

Preparo dos animais

Cada animal foi pesado e em seguida anestesiado por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina, Cetamin, Syntec) e 0,04ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina, Xilazin, Syntec). Posteriormente, cada rato foi colocado em posição supina na mesa operatória. Para facilitar a abertura bucal e acesso a região posterior da maxila foi utilizado um retrator que afasta queixo e língua. As ligaduras (fios de algodão nº24) foram inseridas na região subgengival, em volta de um dos segundos molares superiores, escolhido de forma randômica. O tempo de indução da doença (permanência da ligadura) foi de 15 dias, como mostra a Figura A.

Figura 2 - Em 2A, temos o Desenho experimental do estudo 1. Na Figura 2B observamos a ligadura em posição. Em 2C, observamos a inflamação gengival presente no dia da remoção das ligaduras e, no detalhe, o acúmulo de substrato decorrente dos 15 dias de indução. Um dia após a remoção das ligaduras (Figura 2D), os animais foram novamente anestesiados para a realização dos tratamentos de acordo com o protocolo proposto para cada grupo.



Fonte: Elaboração própria

Grupos Experimentais

Individualmente, cada animal foi acomodado em posição supina na mesa operatória. Os tratamentos foram aplicados de acordo com o grupo (n=5) ao qual o animal havia sido randomicamente destinado, descrito abaixo:

Indução da Doença Periodontal (IDP): Somente indução da doença periodontal, não houve tratamento.

Raspagem e Alisamento Radiular (RAR): Os animais foram submetidos à raspagem e alisamento radicular com curetas específicas (Gracey mine Five 5-6, HuFriedy), executada por um único operador. Foi realizada a remoção mecânica de placa bacteriana madura, presente nas faces livres do dente.

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT): Dez (10) μL do fotossensibilizador, que se encontrava em falcons protegido da luz, foi transferido à uma seringa com agulha de ponta romba e cilindro revestido. A ponta da agulha foi inserida entre dente e tecido gengival e o FS foi depositado no sulco gengival. Foram aguardados 10 minutos de incubação e o LED na cor âmbar (Figura 4) foi aplicado por 6 minutos. ($34,10 \text{ J/cm}^2$). No caso, a aplicação da ponta do LED sobre a superfície oclusal, permitiu a irradiação transmucosa de todas as faces do segundo molar em apenas uma aplicação, o que padronizou a metodologia para todas as faces.

RAR + aPDT: Raspagem e alisamento radicular (seguindo protocolo do Grupo RAR) e, em seguida, aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (seguindo protocolo do Grupo aPDT).

Obtenção das peças cirúrgicas

Após o período experimental correspondente, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. As mandíbulas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% pelo período de 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e armazenadas em álcool 70%, em recipientes codificados.

Microtomografia de raios X (μ -CT)

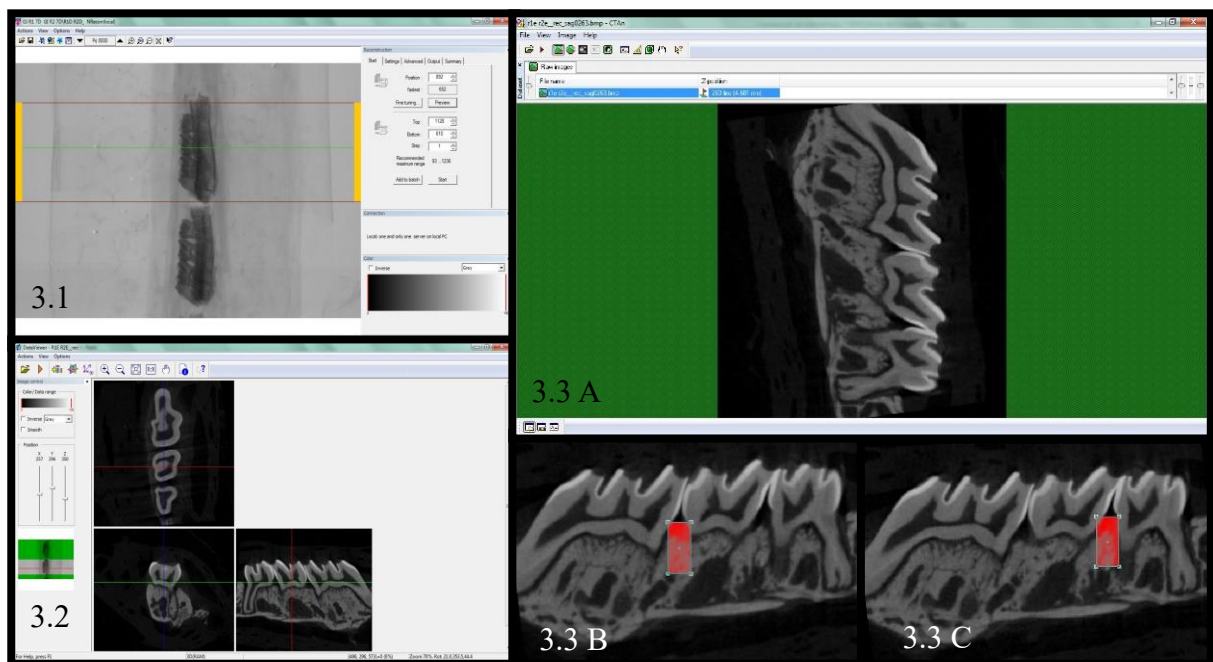
As hemimaxilas, armazenadas em álcool 70%, foram primeiramente submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de radiografia tridimensional (microtomografia digital computadorizada – MicroCt). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 18 μ m (50Kv e 500 μ), as imagens obtidas pela projeção dos raios X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon (Figura 3.1).

Em seguida, por meio do software DataViewer (Figura 3.2), com a peça escaneada em imagens reconstruídas e reorientadas, delimitou-se uma área de interesse “ROI” com dimensões padronizadas de 1,26mm de altura por 0,56mm de largura nas áreas proximais (mesial e distal) do segundo molar, (Figuras 3.3 B e 3.3 C). As medições foram realizadas por um examinador cego e calibrado.

O software CTAn (Figura 3.3 A), a partir da delimitação da região de interesse em 2D, promoveu a análise em 3D da mesma, pela soma coletiva de todos os “ROI”s de um conjunto contíguo de fatias de imagens transversais^{66,67}. Deste modo, com o threshold 55-250 na escala de tons de cinza, foi obtido o percentual de volume do tecido ósseo presente nas áreas de interesse

previamente delimitadas (ROIs). Para a análise, foi utilizado o valor médio entre ROI mesial e distal.

Figura 3.1 - Software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). 3.2 - Software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit). 3.3 A - Software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0). 3.3 B - ROI posicionado na face mesial do 2º molar. 3.3 C - ROI posicionado na face distal do 2º molar.



Fonte: Elaboração própria

Processamento Histológico

Após o período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 24h e submersas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) para descalcificação por um período de 11 semanas, com 3 trocas semanais. Posteriormente, as peças foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados da face vestibular para a palatina, ao longo do eixo do dente com 4 µm de espessura. As cortes começaram a ser

montados em lâmina assim que fosse possível visualizar o primeiro terço das raízes do segundo molar. Foram obtidas para cada bloco, 10 lâminas com 3 cortes cada. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

Análise Histológica

As lâminas foram posicionadas no microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes, através do qual as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Electronics Inc, Japão). Para a avaliação histométrica, a determinação de valores foi feita pelo software ImageJ (Sigma ProScan, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). As avaliações foram realizadas por um examinador treinado, calibrado e cego para os grupos experimentais. Na análise histológica foram observadas as reações inflamatórias do tecido conjuntivo em cada grupo experimental, processos de reabsorção óssea e neoformação tecidual.

Análise Histométrica

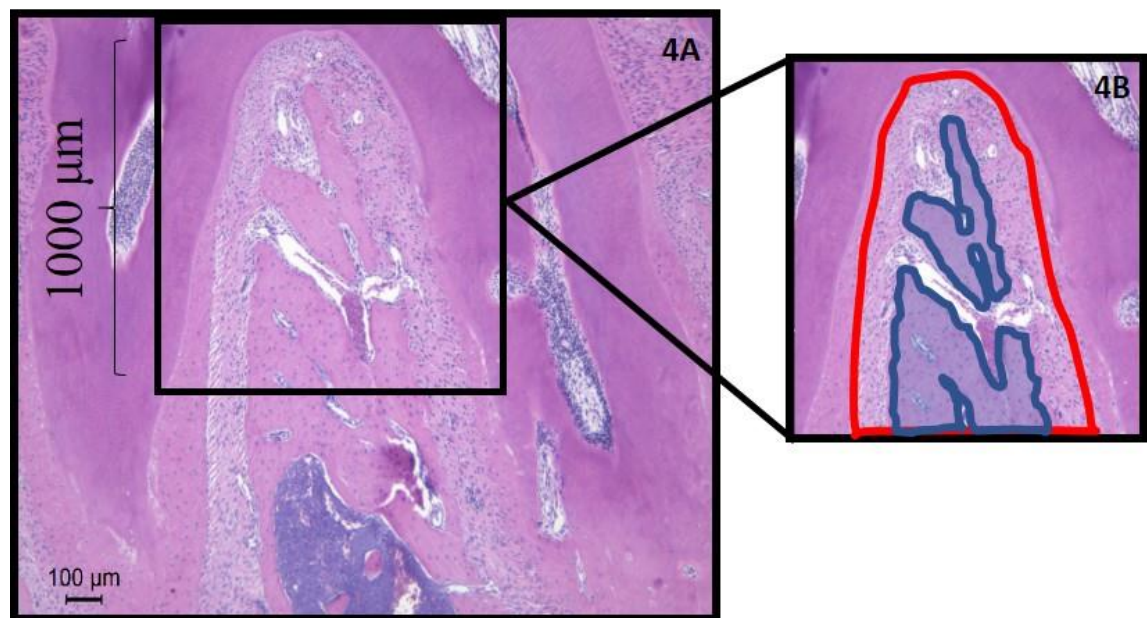
Área de furca

Utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com magnificação de 40X, as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Electronics Inc, Japão).

Para realização da histometria, um examinador cego e calibrado selecionou 3 lâminas de cada grupo, equidistantes 50 μ m entre si. As mensurações foram feitas utilizando o software de imagens ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA). Inicialmente, foi

delimitada a área total da furca (Figura 4A), e em seguida, somente o osso presente na furca (Figura 4B)⁶⁸⁻⁷⁰, como exemplificado na Figura 4.

Figura 4 – Esquema representativo da delimitação da área de furca para análise de porcentagem de perda óssea. Em 4A temos a delimitação da área de furca, 1000µm abaixo do teto da furca, e em 4B, as delimitações de área total de furca (vermelho) e de osso presente (azul).

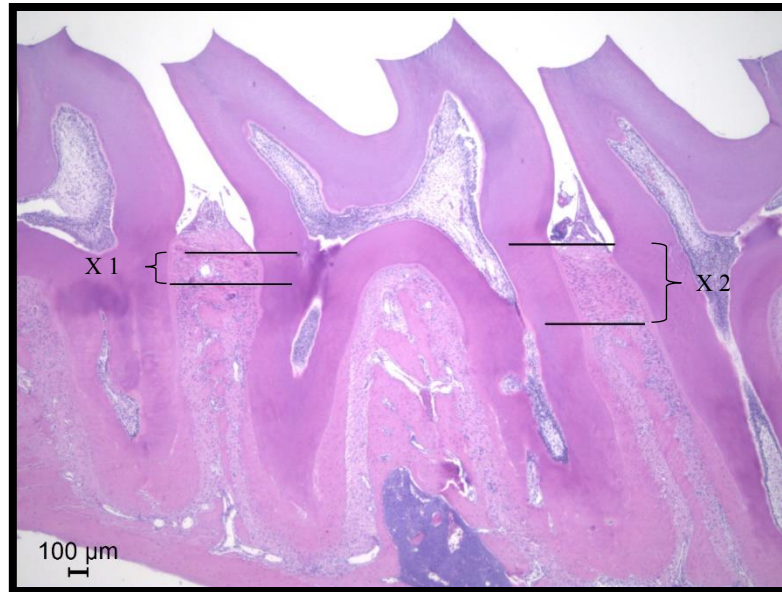


Fonte: Elaboração própria

Área proximal

Os valores da extensão da perda óssea para a área proximal foram obtidos de imagens com aumento de 10 vezes. Foram traçadas linhas na altura da junção cimento-esmalte, e na altura da crista óssea, como demonstrado na Figura 5. Com a ajuda do software Image J a distância entre elas foi medida, inicialmente em micrometros e posteriormente transformados em milímetros. Para os cálculos foi extraída a medida média entre X1 e X2.

Figura 5 – Imagem representativa para as medidas de perda óssea interproximal mesial e distal.



Fonte: Elaboração própria

Análise Estereométrica

Foi realizada por um examinador cego e treinado, com o auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) com magnitude de 40X. Utilizando o software FIJI - ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA), uma grade foi confeccionada com 30.000 μm^2 de área, apresentando 50 pontos coincidentes das intersecções das linhas horizontais e verticais. Esta grade foi posicionada sobre as áreas: A- Regiões proximais mesial e distal do segundo molar e B- Furca. As células presentes em sobre cada intersecção foi definida. Em seguida, foi executada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental, de acordo com Odze et al.⁷¹. Dessa forma, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: osso, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos.

Análises Estatísticas

Os resultados demonstraram que com uma amostra de 5 animais ($p < 0,05$), o poder do estudo seria de 95%. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Graphpad 5.0* (Graphpad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA. Todas as análises foram aplicadas com nível de significância de 95%.

7 APÊNDICE B

Material e Método Publicação 2

Comitê de Ética

O estudo foi submetido ao Conselho de Ética no Uso de Animais da FOAr-UNESP (CEUA) e aprovado em 09/05/2012. Proc. CEUA nº 07/2012.

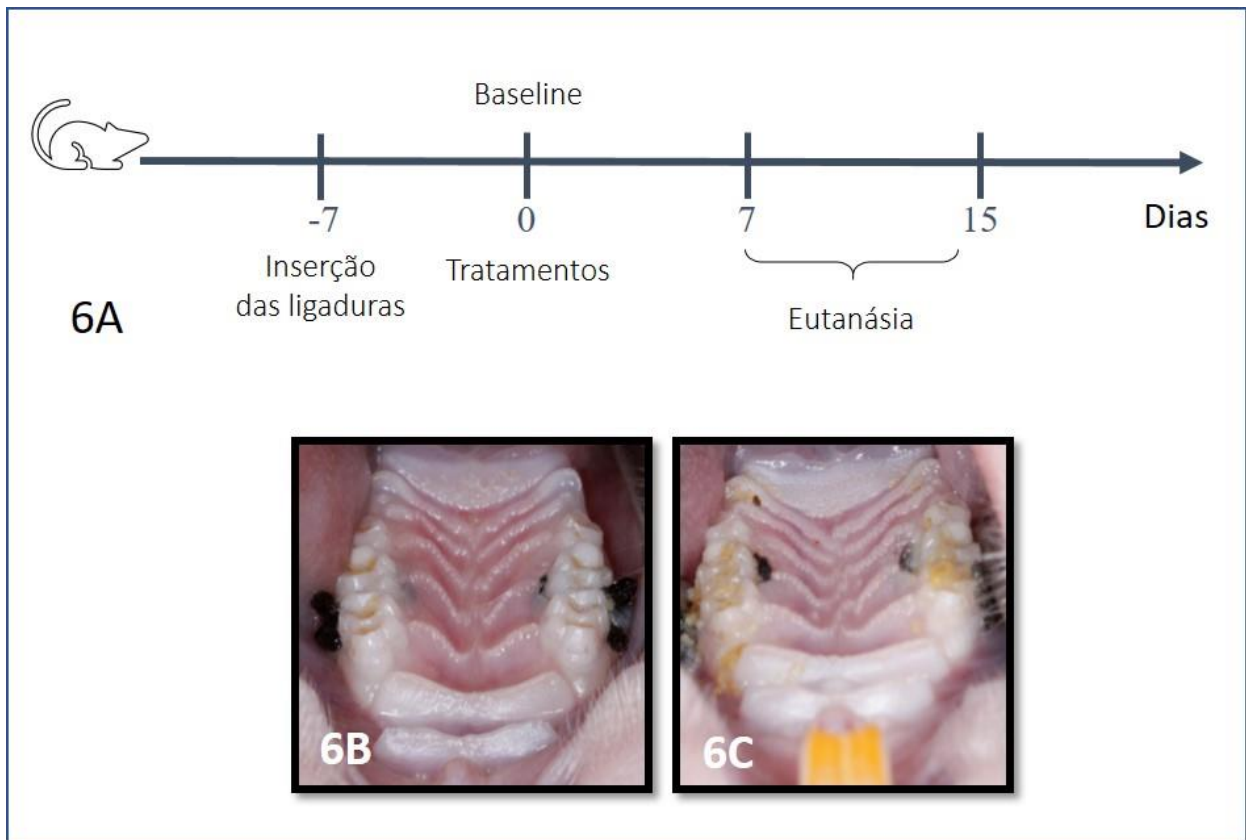
Amostra

Neste estudo foram utilizados 50 (5 por grupo, 15 por período) animais, *Rattus Norvegicus*, variação albinus, Holtzman, machos, 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 ambiente com luz, umidade e temperatura controladas.

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 de 0,08 ml/100g e 0,04 ml/100g de massa corporal, respectivamente. As ligaduras (fios de algodão no 24) foram inseridas na região subgengival ao redor de ambos os segundos molares superiores para a indução da DP, e mantidas durante todo o período experimental, até a eutanásia dos animais. Como mostra a Figura 6.

Figura 6. Em 6A, temos o Desenho experimental do estudo 2. Na Figura 6B observamos a ligadura em posição. Em 6C, observamos o acúmulo de substrato decorrente dos 7 dias de indução da doença periodontal .



Fonte: Elaboração própria

Grupos Experimentais

Os tratamentos referentes a cada grupo experimental foram aplicados após 7 dias da inserção das ligaduras, no *Baseline*, quando a hemimaxila que recebeu o tratamento (direita ou esquerda), foi escolhida de forma randômica, sendo sua contralateral seu controle negativo.

Individualmente, cada animal foi acomodado em posição supina na mesa operatória. A hemimaxila controle foi protegida, para que não sofresse interferência do tratamento. Os tratamentos foram aplicados de acordo com o grupo ao qual o animal havia sido randomicamente destinado, descritos abaixo:

Hipericina-glucamina (Hy-g): Aplicação do fotossensibilizador hipericina-glucamina (10 minutos de incubação);

LED: Irradiação com LED âmbar (6 minutos);

aPDT: Aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com o fotossensibilizador hipericina-glucamina e irradiação com o LED âmbar por 6 minutos;

A eutanásia dos animais foi programada de acordo com o período experimental ao qual haviam sido submetidos: 7 ou 15 dias após o Baseline.

Preparo do Fotossensibilizador

O preparo do fotossensibilizador foi realizado 15 dias antes da sua utilização, no Laboratório de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos, na Universidade de São Paulo (IQSC-USP). A manipulação da pomada de hipericina-glucamina foi feita a partir de uma solução de estoque, sintetizada pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro, da Universidade Federal do ABC. A solução estoque do FS hipericina-glucamina ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$), foi obtida em solvente aprótico polar, dimetil sulfoxido (DMSO), esterilizada por filtração em membrana $0,22 \mu\text{m}$ e mantida ao abrigo da luz. A solução de trabalho foi preparada, diluindo-se a solução de estoque em tampão fosfato de sódio (pH 7,2), obtendo-se a um preparado de consistência semi-sólida, de concentração final de $10 \mu\text{g/mL}$, onde a porcentagem final de DMSO foi inferior a 1%.

Técnica de Aplicação do Fotossensibilizador

Embora o fotossensibilizador apenas seja ativado por uma luz com comprimento de onda específico, para que houvesse um maior controle e padronização da técnica, optou-se por mantê-lo protegido de fontes de luz até o momento da irradiação com o LED âmbar. No dia dos tratamentos, a sala de cirurgia do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP permaneceu em penumbra, com apenas uma luz acesa distante do campo operatório. Para a adequada visualização do sulco a ser tratado, foram utilizadas lupas de cabeça com iluminação própria, que era desligada assim que a agulha (13×0.45 mm; Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltd., Curitiba, PR, Brazil) sem corte, que continha o FS fosse posicionada no sulco gengival. No momento da aplicação, em cada animal destinado aos grupos Hipericina-glucamina, ou aPDT, foi depositado o volume de 1ml, aproximadamente 0,2 mg de pomada de FS no sulco a ser tratado e manteve-se no escuro, por 10 minutos (tempo de incubação).

Fonte de Luz

Foi utilizada a mesma fonte de Luz empregada no Estudo 1, descrita no índice 3.3.3.

Obtenção das peças cirúrgicas

Após o período experimental correspondente a cada grupo, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. As mandíbulas foram removidas e fixadas em paraformaldeído a 4% pelo período de 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e armazenadas em álcool 70%.

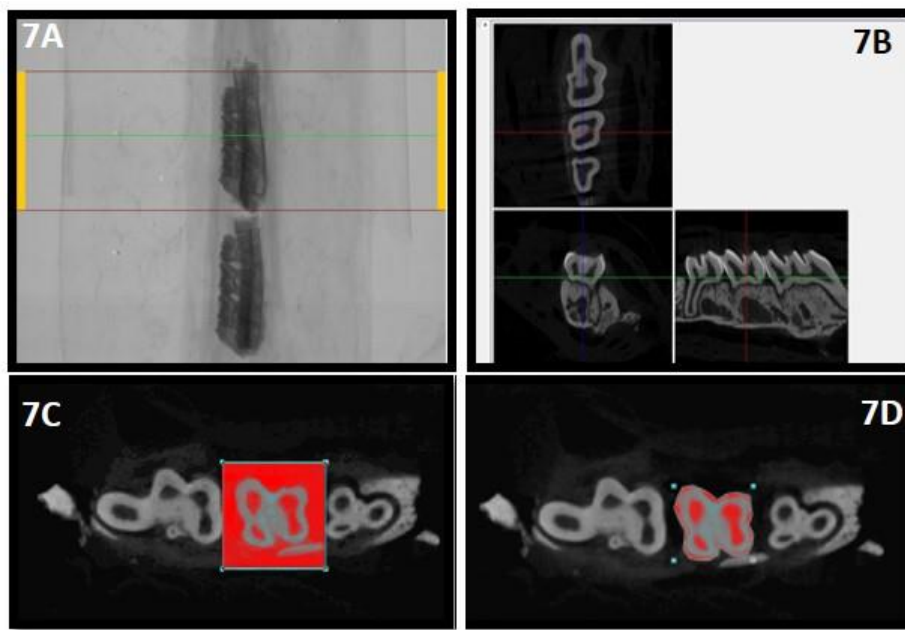
Avaliação por Microtomografia Digital(μCT)

Após o período de fixação em paraformaldeído, as hemimaxilas foram armazenadas em álcool 70%, e submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de

Microtomografia digital computadorizada, que avalia a porcentagem de volume ósseo presente na região do segundo molar superior, para a quantificação da reabsorção óssea inflamatória durante a doença periodontal experimental os efeitos das terapias propostas. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 18 μm (50Kv e 500 μ), filtro de Al 0.5mm; tamanho do voxel: 17,48 μm ; voltagem de 50KV e corrente elétrica de 500 μA . As imagens obtidas pela projeção dos raios X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon (Figura 7A). Essas imagens foram rotacionadas e reposicionadas em uma orientação padrão, com o auxílio do software DataViewer e salvas no plano coronal (Figura 7B). Em seguida, o software CTAnalyser – CTAn (Figura 7C), foi utilizado para a delimitação área de interesse (ROI- *Region Of Interest*)^{66,67}.

Como podemos observar nas imagens ilustrativas da Figura 7C e 7D, a estrutura radicular apresenta similaridade de tons de cinza com tecido ósseo circundante, sendo incluída erroneamente na medição fornecida pelo programa. Para que essa leitura fosse fidedigna, o presente estudo utilizou a leitura de dois ROIs para cada peça. O primeiro ROI abrange o segundo molar no sentido corono/apical da região do teto de furca até 1.000 micrometros no sentido apical até suas limitações proximais com os dentes vizinhos, como ilustrado na Figura 7C, do qual, foi extraído o valor de “tecido ósseo” dado pela leitura do segundo ROI, que possui a mesma delimitação anatômica, mas circundando apenas as raízes do segundo molar (Figura 7D).

Figura 7. Quadro ilustrativo para as avaliações de μ CT. Figura 7A. Software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). Figura 7B. Software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit). Figura 7C e 7D. Representação da delimitação das áreas de ROI utilizadas para a mensuração de tecido ósseo no Software CTAnalyser – CTAn (2003-11 SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0). Em 7C temos o ROI abrangendo toda a região do segundo molar e suas proximais, do qual será subtraído os valores resultantes da medição do ROI pertencente às raízes, representado em 7D.



Fonte: Elaboração própria

Processamento Histológico

Após a análise de microtomografia computadorizada, as peças foram lavadas em água corrente por 24h e submersas 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, as peças foram lavadas e desidratadas em álcool e diafanizadas em xilol. As peças de hemimaxila foram incluídas em parafina no sentido mésio-distal ao longo do eixo do dente, para a obtenção de cortes em micrótomo manual (Marca: Microm; Modelo: HM 360) de 4 µm de espessura. Após desbaste inicial dos blocos de parafina, as lâminas começaram a ser montadas assim que fosse possível observar a presença das três coroas clínicas (1º, 2º e 3º molar), com um terço de raiz. Foram obtidas para cada hemimaxila, 10 lâminas com 3 cortes cada. As lâminas de número 2 e 6 e 10 foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e utilizadas nas análises histométricas.

Análise Histométrica

Área de Furca e Área Proximal

A metodologia seguiu o protocolo já descrito no Apêndice A.

Imuno-histoquímica para Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP)

A análise imuno-histoquímica foi realizada para identificar e localizar a expressão da proteína fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram montados em lâminas silanizadas (Fisher Scientific Superfrost Plus, Fisher, New York, NY, EUA), seguido de tramitação laboratorial de rotina para deparafinização e rehidratação. Em seguida os cortes foram submetidos ao bloqueio dos epítomos inespecíficos através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e da proteína bovina albumina (BSA) a 3% por 2 horas. Logo após os cortes foram incubados por 16 horas no anticorpo primários, na concentração de 1:100 (Abcam, Inc. Cambridge, MA, EUA). Como controle negativo, cortes histológicos foram tratados

por IgG normal (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), em substituição ao anticorpo primário, na mesma diluição. Posteriormente, os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com a utilização do kit ABC Staining System (ABC kit DAKO A/S, Copenhagen, Dinamarca) segundo as instruções do fabricante. Os cortes foram contra-corados com solução de hematoxilina de Carrazi para visualização dos núcleos celulares. As imagens (50 e 100X) foram obtidas através de uma câmera acoplada a um microscópio de luz (Leica-Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Alemanha). A análise de TRAP foi realizada através da contagem dos osteoclastos marcados que estivessem em contato com o tecido ósseo da região da furca ao redor do segundo molar (Pavone et al., 2014). O resultado de cada amostra foi a soma dos valores dos osteoclastos nas três regiões de interesse. As análises foram realizadas por um examinador cego, treinado e calibrado.

Análise Estaística

Os resultados demonstraram que com um maostra de 5 animais ($p < 0,05$), o poder do estudo seria de 95%. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Graphpad 5.0* (Graphpad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). Os dados foram avaliados estatisticamente através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a análise entre as hemi-maxilas tratadas e seus controles negativos, os dados foram submetidos ao teste T de Student, e para a comparação entre os grupos tratados, foram submetidos ao teste paramétrico Anova complementado pelo teste de Tukey. Todas as análises foram aplicadas com nível de significância de 95%.

Anexo A



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



Proc. CEUA nº 07/2012

Araraquara, 13 de setembro de 2017.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa 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), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de prorrogação no prazo da pesquisa.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **DEZEMBRO/2019**.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Vice-Coordenador da CEUA

À
Profa. Dra. ROSEMARY ADRIANA CHIERICI MARCANTONIO
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA, SP
5º andar - fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6422

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 09/12/2019

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 08 de dezembro de 2017

Paula Delello Macedo