

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
unesp  “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA

**AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO
DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA:
*estudo histológico em ratos.***

**ARAÇATUBA
2004**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA

**AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO
DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA:
*estudo histológico em ratos.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do Campus de Araçatuba, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia – Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

**ARAÇATUBA
2004**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

A347a Almeida, Juliano Milanezi de
Ação da terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal induzida : estudo histológico em ratos / Juliano Milanezi de Almeida. - Araçatuba : [s.n.], 2004
197 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2004
Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

1. Doenças periodontais 2. Perda óssea alveolar 3. Fotoquimioterapia 4. Lasers

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Juliano Milanezi de Almeida

NASCIMENTO: 30 de novembro de 1976 – Manduri – SP.

FILIAÇÃO: Aurivan Antunes de Almeida
Nilce Milanezi de Almeida

1997/2000: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Bauru – USC

2000/2001: Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia, na Sede da APCD -
Bauru.

2001/2003: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Especialização,
na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2003/2004: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Mestrado, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Dedicatória

A Deus

*Por estar sempre presente em meu caminho
e guiar-me em todos os momentos.*

Aos meus pais, AURIVAN E NILCE, pelo amor, carinho e preocupação durante toda a minha caminhada, sempre preocupados em ensinar-me o caminho da honestidade e do trabalho. Exemplos de trabalho e honestidade para filhos e netos.

A minha esposa, Fernanda, minha eterna namorada e amada, obrigado pela paciência e compreensão.

Ao meu filho Gabriel, minha alegria e fonte de energia, desculpe-me pelas ausências, espero estar desde já contribuindo com sua formação. “Pai Ju”
Te ama.

A minhas irmãs Ana Brígida e Marcela,
obrigado por telas no meu caminho e pelo
carinho que sempre tiveram comigo. **Mana,**
obrigado pelos incentivos.

Aos meus sogros, **Isidoro e Ângela** , não só
pelo presente que me deram – sua Filha, mas
pelo apoio e consideração que sempre tiveram
por mim.

A toda minha Família, em especial a Sobrinhas,
cunhado, cunhadas e avós pelo carinho que
sempre tiveram por mim.

Agradecimento Especial

A meu Orientador Professor Titular Dr Valdir Gouveia Garcia,

Exemplo de dedicação ao trabalho e de conhecimento. Obrigado pelos ensinamentos dados, confiança, tê-lo como Orientador e ainda ser muito mais que um grande amigo, estando sempre disposto a atender-me não importando o momento.

Meu muito obrigado, hoje e sempre!

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

A Professora Dr^a. Leticia Helena Theodoro

Obrigado pela amizade, confiança e ajuda dada com a minha formação e no desenvolvimento do trabalho, muitas vezes deixando seu afazeres para me atender.

A sua participação em minha formação tem sido fundamental. Muito obrigado.

Ao Professor Dr. Álvaro Francisco Bosco

Grande Amigo. Exemplo de Professor e Clínico. Obrigado pelos ensinamentos desde a Especialização até hoje. Tê-lo como Professor é algo inexplicável, Obrigado pela confiança, amizade e dedicação com meu aprendizado.

A Professora Dr^a. Maria José Hitomi Nagata

Grande Amiga, exemplo de dedicação à pesquisa, estando sempre preocupada em melhorar o nosso curso. Obrigado pela amizade, pelo apoio, pelas oportunidades dadas, ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Dr. Roberto Holland

Exemplo de Pessoa, Professor e Pesquisador. Obrigado pelos conselhos, ensinamentos e dado-me a oportunidade de tê-lo como colaborador em meu trabalho. *A sua colaboração foi fundamental!*

Aos meus amigos e companheiros Danielle, Samara e Valmir

Obrigado pelos momentos de alegria, ajuda, amizade e respeito. A colaboração de vocês foi fundamental no decorrer do curso e no desenvolvimento do trabalho. O trabalho em grupo fez com que este período de nossas vidas, tornar-se mais fácil e produtivo. A vocês minha admiração e meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

À Direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. Em nome do Diretor Prof, Dr. Paulo Roberto Botacin e Vice Diretor Prof. Dr. Célio Percinoto

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do Professor Dr. Wilson Roberto Poi, por estar sempre disposto a nos dar suporte nas horas mais difíceis e lutar por termos o melhor curso de Pós-Graduação.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, pela dedicação e ensinamentos que me proporcionaram no curso.

Ao Professor Dr. Tetuo Okamoto, obrigado pela colaboração e ensinamentos, estando sempre disposto a ajudar.

A Professora Dr^a. Marie pela colaboração dada na realização da análise estatística.

A Professora Dr^a. Simone Maria Galvão de Sousa, pela colaboração dada com minha formação, desde a graduação.

A Dr. Sueli Murata, pela amizade, e contribuição dada ao desenvolvimento trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Periodontia, Claudiomiro em especial a Dona Antonia, amiga querida que sempre esteve presente em todos os momentos, fornecendo ensinamentos fundamentais na realização do processamento histológico. Os meus sinceros agradecimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Dirce, Gilmar, Cleide e Berna, que sempre estiveram dispostos a dar o

melhor ensinamento no processamento histológico. Dedicção e paciência sem medir esforços dados ao meu trabalho. Dirce, a sua colaboração foi fundamental, por muitas vezes deixando seu lar nas horas de folga para ajudar-me no laboratório. Os meus sinceros agradecimentos e admiração.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia, em especial a Nelci, pela ajuda e ensinamentos dados em todos os momentos.

A todos os funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araçatuba, obrigado pela colaboração, ensinamentos e de fazer a “nossa” Biblioteca um lugar agradável e alegre.

A todos os funcionários da secção de pós-graduação e divisão técnica acadêmica, pela paciência e estarem sempre disponíveis.

Aos funcionários do Biotério, em especial ao Odair e Camilo, amigos que contribuíram de forma incansável, que me proporcionaram a realização dos meus experimentos de forma agradável sempre dispostos a ajudarem não importando a hora. Obrigado vocês sempre serão lembrados como grandes amigos.

Ao Bruno, pela ajuda dada no decorrer da dissertação.

Aos meus colegas do Curso de Pós-graduação em Odontologia pela amizade, convívio e colaboração.

Aos meus colegas do Curso de Mestrado em Periodontia, Flávia, Danielle, Samara, Tatiana, Valmir pelo convívio, colaboração e amizade.

Aos animais experimentais, meu profundo respeito.

Enfim a todos que me ajudaram de forma direta e indiretamente os meus sinceros agradecimentos.

*“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King

Lista de Abreviaturas

µg – Microgramas, equivalente à um milhão de vezes menor que o grama.

µg/mL – Microgramas por mililitros.

ATP – Adenosina Trifosfato.

Densidade energética – Quantidade de energia aplicada em uma área. É expressa em Joules por centímetro quadrado (J/cm^2).

DNA – Ácido desoxidoribonucléico.

HCl-TTC- Hidroclorato de tetraciclina.

H&E – Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e eosina.

Hertz (Frequência) – número de oscilações completas de uma onda por segundo, e expresso em Hertz ou pulsos por segundo.

Joule – Uma unidade de energia, abreviada como J.

Kg - Unidade fundamental de medida de massa.

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

Laser AsGa – Laser de Arsênio-Gálio.

Laser AsGaAl – Laser de Arsênio-Gálio-Alumínio.

Laser contínuo – Laser que emite energia continuamente.

Laser He-Ne – Laser de Hélio-Neônio.

Laser Nd:YAG – Laser de Neodímio, Ítrio, Alumínio, Granada.

Laser pulsado – Laser que emite energia em intervalos fixos.

LILT – Laser de baixa intensidade. Expressa Low Intensity Laser Therapy.

LLLT – Laser de baixa intensidade. Expressa Low Level Laser Therapy.

MB – Azul de Metileno.

mg – Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.

mg/Kg – Miligramas por quilo.

Milijoule – Joule dividido por 1000, a abreviatura é mJ.

mL – Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

Monocromático – Uma única frequência de comprimento de onda – uma única cor.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

mW – Milionésima parte do Watt. 1/1000 Watt.

Nanômetro – Bilionésima parte do metro, utilizado para medir o comprimento de onda. Sua abreviatura é 10^{-9} metros.

Tempo de exposição – Período total que o tecido é exposto à energia Laser. Expresso em minutos ou segundos.

TBO – Azul de toluidina O.

PDT – Terapia Fotodinâmica.

Watt – Unidade de potência. Um Watt é igual a um Joule por segundo.

Lista de Figuras

Figura 1 - Anestésicos utilizados	83
Figura 2 - Animal posicionado na mesa operatória	83
Figura 3 - Dentes posteriores do animal.	83
Figura 4 - Sonda utilizada como auxiliar na passagem do fio.	84
FIGURA 5 - Figura da pinça modificada utilizada na passagem do fio.	84
FIGURA 6 - Posicionamento do fio na porção interproximal dos molares	84
FIGURA 7 - Ligadura posicionada ao redor do primeiro molar inferior.	85
FIGURA 8 - Aplicação do Azul de Metileno	86
FIGURA 9 - Aparelho utilizado.	88
FIGURA 10 - Aplicação do Laser.	88
FIGURA 11 - Aplicação do Azul de Metileno e o Laser (PDT).	88

Figura 12 - Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.	102
Figura 12a - Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival. H.E. Aumento original 100x.	102
Figura 12b - Aumento da figura anterior, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar à esquerda resíduos da crista óssea reabsorvida. H.E. Aumento original 200x	102
Figura 13 - Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.	103
FIGURA 13a - Detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido à raiz do dente com infiltrado inflamatório do tipo crônico. Notar no centro partícula de tecido ósseo necrosado. H.E. Aumento original 100x.	103
FIGURA 13b - Aumento da figura panorâmica, detalhe do ligamento periodontal desorganizado na crista óssea, cemento e osso alveolar. H.E. Aumento original 100x.	103
Figura 14 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção radiculares e óssea. H.E. Aumento original 40x.	104

Figura 14a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival e reabsorções inativas. H.E. Aumento original 100x.	104
Figura 14b – Aumento da figura 14, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar à esquerda crista óssea reduzida e ligamento periodontal desorganizado. H.E. Aumento original 200x	104
Figura 15 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, dente, ligamento periodontal e tecido ósseo. H.E. Aumento original 40x.	107
Figura 15a – Aumento da figura anterior, detalhe da tecido conjuntivo gengival com infiltrado inflamatório do tipo crônico. H.E. Aumento original 100x.	107
Figura 15b – Aumento da figura panorâmica, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar crista óssea reabsorvida e ligamento periodontal desorganizado. H.E. Aumento original 200x.	107
Figura 16 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal, cimento e osso alveolar. H.E. Aumento original 40x.	108
Figura 16a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival e sua aderência no cimento. H.E. Aumento original 100x.	108

Figura 16b – Aumento da figura panorâmica, detalhe da área do ligamento periodontal. Notar à esquerda área de reabsorção inativa na crista óssea. H.E. Aumento original 100x.	108
Figura 17 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival aderido um pouco abaixo da JCE, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea inativa. H.E. Aumento original 40x.	109
Figura 17a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival e reabsorções cervicais inativas com pequenas deposições de cimento. H.E. Aumento original 100x.	109
Figura 17b – Aumento da figura 17, detalhe da crista óssea com reabsorção inativa e ligamento periodontal aderido ao cimento. H.E. Aumento original 200x.	109
Figura 18 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival aderido ao cimento, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.	112
Figura 18a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival com infiltrado inflamatório do tipo crônico. H.E. Aumento original 100x.	112
Figura 18b – Aumento da figura 19, detalhe da área de atividade osteoclástica à esquerda. H.E. Aumento original 200x.	112

Figura 19 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal osso alveolar e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.	113
Figura 19a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido a área de reabsorção óssea. H.E. Aumento original 100x.	113
Figura 19b – Aumento da figura 20, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar à esquerda a crista óssea reabsorvida, reabsorção cervical até a crista óssea e reabsorções cementárias ativas. H.E. Aumento original 200x.	113
Figura 20 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e osso alveolar. H.E. Aumento original 40x.	114
Figura 20a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido ao cimento do dente. H.E. Aumento original 100x.	114
Figura 20b – Aumento da figura 21, detalhe do ligamento periodontal com pequeno infiltrado inflamatório do tipo crônico. H.E. Aumento original 200x.	114
Figura 21 – Vista panorâmica mostrando dente, tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e tecido ósseo. H.E. Aumento original 40x.	117

Figura 22 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção cervical ativa. H.E. Aumento original 40x.	118
Figura 22a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido ao dente adentrando na área de reabsorção inativa. H.E. Aumento original 100x.	118
Figura 22b – Aumento da figura panorâmica, detalhe do ligamento periodontal bem organizado e isento de processo inflamatório. H.E. Aumento original 100x.	118
Figura 23 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal, cimento e tecido gengival. Notar a aderência do tecido conjuntivo a superfície radicular. H.E. Aumento original 40x.	119
Figura 23a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival com infiltrado inflamatório do tipo crônico. H.E. Aumento original 100x.	119
Figura 23b – Aumento da figura panorâmica, detalhe da crista óssea sem reabsorção ativa e ligamento periodontal organizado. H.E. Aumento original 200x	119
Figura 24 - Frequências (%) dos escores de Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5 15 e 30 dias	123

Figura 25 - Freqüências (%) dos escores de Intensidade da inflamação crônica no Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5 15 e 30 dias	123
Figura 26 - Freqüências (%) dos escores da Extensão da Inflamação crônica no Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5 15 e 30 dias	123
Figura 27 - Freqüências (%) dos escores da Reabsorção Cervical inativa sem reparo atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5 15 e 30 dias	123
Figura 28 - Freqüências (%) dos escores da Aderência Gengival atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5 15 e 30 dias	126
Figura 29 - Freqüências (%) dos escores da Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5 15 e 30 dias	126
Figura 30 - Freqüências (%) dos escores da Intensidade da Inflamação Crônica no Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5 15 e 30 dias	126
Figura 31 - Freqüências (%) dos escores da Reabsorção Cervical Inativa sem Reparo atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5 15 e 30 dias	126

Figura 32 - Freqüências (%) dos escores da Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo III nos períodos de 5 15 e 30 dias	128
Figura 33 - Freqüências (%) dos escores da Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo IV nos períodos de 5 15 e 30 dias	129
Figura 34 - Freqüências (%) dos escores da Reabsorção Cervical Inativa com Reparo atribuídos ao Grupo IV nos períodos de 5 15 e 30 dias	129
Figura 35 - Freqüências (%) dos escores da Reabsorção Ativa do Tecido Ósseo atribuídos ao Grupo IV nos períodos de 5 15 e 30 dias	129

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência e porcentagem de escores de "Aderência do Tecido Gengival" (AG), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico" no tecido gengival em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 5 dias 135

Tabela 2 - Frequência e porcentagem de escores de "Inserção do Ligamento Periodontal" (ILP), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo no Ligamento Periodontal" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo no Ligamento Periodontal" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal "(InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal " em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV, no período experimental de 5 dias 134

Tabela 3 - Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção radicular ativa" (RRA), "Reabsorção Radicular Inativa com reparo" (RRlcr), "Reabsorção Radicular Inativa sem reparo"(RRlcr), "Reabsorção Cervical Ativa" (RCA), em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 5 dias. 135

Tabela 4 - Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção Cervical Inativa com reparo" (RCIcr), "Reabsorção Cervical Inativa sem reparo" (RCIsr), "Reabsorção Ativa do tecido ósseo"(Rato), "Reabsorção Inativa do tecido ósseo"(Ritc) em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 5 dias

136

Tabela 5 - Frequência e porcentagem de escores de "Aderência do Tecido Gengival" (AG), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo" (InPIag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo" (ExPIag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico (InPIcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico" no tecido gengival em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 15 dias.

139

Tabela 6 - Frequência e porcentagem de escores de "Inserção do Ligamento Periodontal" (ILP), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo no Ligamento Periodontal" (InPIag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo no Ligamento Periodontal" (ExPIag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" (InPIcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV, no período experimental de 15 dias. 140

Tabela 7 - Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção radicular ativa" (RRA), "Reabsorção Radicular Inativa com reparo" (RRIcr), "Reabsorção Radicular Inativa sem reparo"(RRIcr), "Reabsorção Cervical Ativa" (RCA), em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 15 dias 141

Tabela 8 - Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção Cervical Inativa com reparo" (RCIcr), "Reabsorção Cervical Inativa sem reparo" (RCIsr), "Reabsorção Ativa do tecido ósseo"(Rato), "Reabsorção Inativa do tecido ósseo"(Ritc) em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 15 dias 142

Tabela 9 - Frequência e porcentagem de escores de "Aderência do Tecido Gengival" (AG), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico" no tecido gengival em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 30 dias 144

Tabela 10 - Frequência e porcentagem de escores de "Inserção do Ligamento Periodontal" (ILP), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo no Ligamento Periodontal" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo no Ligamento Periodontal" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal " em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV, no período experimental de 30 dias 144

Tabela 11 - Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção radicular ativa" (RRA), "Reabsorção Radicular Inativa com reparo" (RRlcr), "Reabsorção Radicular Inativa sem reparo"(RRIsr), "Reabsorção Cervical Ativa" (RCA), em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 30 dias 145

Tabela 12 - Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção Cervical Inativa com reparo" (RCIcr), "Reabsorção Cervical Inativa sem reparo" (RCIsr), "Reabsorção Ativa do tecido ósseo"(Rato), "Reabsorção Inativa do tecido ósseo"(Ritc) em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 30 dias

147

ALMEIDA, J. M. Ação da terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal induzida: *estudo histológico em ratos*. Araçatuba, 2004, 160p. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Resumo

O presente estudo teve por objetivo avaliar histologicamente o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) na progressão da doença periodontal induzida em ratos. Realizou-se a adaptação de uma ligadura de algodão na margem gengival do primeiro molar inferior esquerdo de cento e vinte ratos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=30): Grupo I: nenhum tipo de tratamento realizado, somente a presença da ligadura; Grupo II (MB): tratamento com aplicação tópica de azul de metileno (100 µg/mL) dois dias após adaptação da ligadura; Grupo III (LLT): tratamento com Laser em baixa intensidade dois dias após adaptação da ligadura; e Grupo IV (PDT): tratamento com aplicação tópica de azul de metileno (100 µg/mL) seguido da aplicação do Laser em baixa intensidade dois dias após adaptação da ligadura. A superfície mesial dos dentes no Grupo III e IV foram irradiados com o Laser de diodo de GaAlAs, com 685 nm (50 mW, 120 s, 4.5 J/cm²). Todos os grupos foram subdivididos em subgrupos (n=10) e sacrificados nos períodos de 5, 15 e 30 dias pós-operatório. As peças foram processadas para análise histológica e coradas pela técnica de H&E. Através de um sistema de escores, vários parâmetros foram utilizados para avaliar o tecido conjuntivo, ligamento periodontal, superfície radicular e tecido ósseo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, (p<0.05). Os resultados indicaram diferença no nível da inserção do ligamento periodontal entre o Grupo I (C) e Grupo III (LLT) (p=0,0327), Grupo II (MB) e Grupo III (LLT) (p=0,0118) e entre o Grupo III (LLT) e Grupo IV (PDT) (p=0,0076) no período de 15 dias de pós-operatório. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros avaliados em todos os grupos no período de 5 ou 30 dias de pós-operatório. Dentro dos limites deste estudo, podemos concluir que: 1) nenhum dos tratamentos influenciou na progressão da doença periodontal induzida no período de 5 dias de pós-operatório; 2) LLT reduziu o nível da inserção do ligamento periodontal e aumentou a resposta

inflamatória no período de 15 dias pós-operatório; 3) A terapia fotodinâmica (PDT) foi mais efetiva que o Laser (LLT) somente no período de 15 dias pós-operatório; 4) A PDT não foi efetiva no tratamento da doença periodontal experimental induzida em ratos.

Palavras-chave: Doença periodontal. perda óssea alveolar. Laser. fotoquimioterapia

ALMEIDA, J. M. Effect of photodynamic therapy on the treatment of experimentally induced periodontal disease. A histological study in rats. Araçatuba, 2004, 160p. Dissertation (Master in Periodontics) – Dental School of Araçatuba, University of the State of São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”.

Abstract

The purpose of this study was to histologically evaluate the effect of photodynamic therapy (PDT) on the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. Cotton ligatures were placed at the gingival margin level of the lower left first molar in one hundred and twenty rats. The animals were then randomly divided evenly into 4 groups (n=30): Group I (C): no treatment; Group II (MB): treated with topical application of methylene blue (100µg/ml) 2 days after ligature placement; Group III (LLT): treated by low level laser therapy 2 days after ligature placement; and Group IV (PDT): treated with topical application of methylene blue (100µg/ml) followed by low level laser therapy 2 days after ligature placement. The mesial aspect of the teeth in Groups III and IV were irradiated using a 685nm GaAlAs laser (50mW, 120s, 4.5J/cm²). All groups were subdivided into subgroups (n=10) and euthanized at either 5, 15 or 30 days post-operative. Block sections were routinely processed for histological analysis using H&E stain. Using a scoring system, several biological parameters were used to evaluate the connective tissue, periodontal ligament, root surface and bone. The data were statistically analyzed (Kruskal-Wallis, p<0.05). The results showed significant differences in the periodontal attachment level between Group I (C) and Group III (LLT) (p=0,0327), Group II (MB) and Group III (LLT) (p=0,0118) and between Group III (LLT) and IV (PDT) (p=0.0076) at 15 days post-operative. There were no significant differences in any of the evaluated parameters among all groups at either 5 or 30 days post-operative. Within the limits of this study, it can be concluded that: 1) none of the treatments influenced the progression of the experimentally induced periodontal disease at 5 days post-operative; 2) LLT reduced the level of the periodontal attachment and increased the inflammatory response at 15 days post-operative; 3) PDT was more effective than LLT only at 15 days post-operative; 4) PDT was not effective in treatment of experimentally induced periodontal disease in rats.

Keywords: Periodontal diseases. alveolar bone loss. laser. Photochemotherapy.

Juliano Milanezi de Almeida

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	36
2 – REVISÃO DE LITERATURA	41
2.1 - Indução da doença periodontal	48
2.2 - Terapia Fotodinâmica na Redução Bacteriana	55
2.3 - Terapia Fotodinâmica na Reparação Tecidual	72
3 – PROPOSIÇÃO	78
4 – MATERIAL E MÉTODO	80
4.1 - Animais	81
4.2 - Sedação e Anestesia	81
4.3 - Indução da Doença Periodontal	82
4.4 - Grupos Experimentais	85
4.5 - Droga Fotossensibilizadora	86
4.6 - Laser	87
4.7 - Períodos Experimentais	89
4.8 - Processamento Histológico	90
4.9 - Avaliação Histológica	90
4.9.1 - Análise Descritiva	90
4.9.2 - Análise Quantitativa	91
4.10 - Análise Estatística	96
5 – RESULTADOS	98
5.1 - Análise Histológica Descritiva	99

5.2 - Análise Histológica Quantitativa	120
6 – DISCUSSÃO	148
6 – CONCLUSÃO	163
REFERÊNCIAS	165

Introdução

“O despertar do conhecimento inicia-se com o incentivo
de verdadeiros amigos”

1 Introdução

A doença periodontal representa a resposta dos tecidos periodontais frente a diferentes condições etiológicas, locais e/ou predisponentes, podendo sofrer também, a influência de fatores sistêmicos desfavoráveis. Os tecidos periodontais representam um sistema único no corpo humano onde os tecidos, epitelial e conjuntivo unem-se para formar uma junção. Essa junção, referida como dentogengival, é uma estrutura complexa e a manutenção de sua integridade é crítica para a preservação da saúde dos tecidos periodontais (AUKHIL, 2000).

Já está largamente documentado na literatura que a microbiota subgengival desempenha papel fundamental na etiologia da doença periodontal inflamatória, pois através da invasão de microrganismos e de seus produtos nos tecidos periodontais saudáveis, como enzimas e toxinas (exotoxinas e/ou endotoxinas), ocorre a degradação dos feixes colágenos inseridos na superfície radicular com conseqüentes alterações patológicas na junção dentogengival.

Desta forma, o processo ativo de destruição periodontal se agrava ainda mais à medida que fatores de resistência do hospedeiro possam ser modificados, quando não, os fatores de virulência e de especificidade dos microrganismos, tendem a aumentar sua agressividade.

Muito embora a colonização da bolsa periodontal seja bastante heterogênea, há de se destacar a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, e talvez outras como *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* e espiroquetas, que estão associadas às formas mais destrutivas da doença

periodontal (SLOTS et al., 1986; HAFFAJEE; SOCRANKY, 1994; KAMMA et al., 1995; LOESCHE, 1992).

Frente a tais fatos, tentativas de controlar os efeitos destrutivos das doenças periodontais crônicas e a regenerar os tecidos perdidos, irão requerer o restabelecimento da junção dentogengival. A terapia periodontal convencional, seja de natureza cirúrgica ou não cirúrgica, usualmente envolve instrumentação do complexo dentogengival inflamado (AUKHIL, 2000), e, já está largamente demonstrado e documentado na literatura que o sucesso da terapia periodontal consiste na remoção da placa supragengival e, principalmente, pela completa remoção mecânica da placa subgengival com a técnica de raspagem e alisamento radicular (SLOTS, 1979).

Com o avanço das pesquisas, embasadas no melhor conhecimento da etiologia das doenças periodontais e em evidências da especificidade microbiana, têm sido levantadas dúvidas quanto a eficácia do tratamento de raspagem e alisamento radicular como forma de terapia única em algumas periodontites (WAERHAUG, 1978; RABBANI; CAFFESSE, 1981; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1998).

A anatomia dentária, localização dos dentes na cavidade bucal e profundidade das bolsas periodontais limitam desta forma a eficácia da raspagem e alisamento radicular (RABBANI; CAFFESSE, 1981; POLSON; CATON, 1982; SLOTS; RAMS, 1990) levando alguns autores a indicarem uma terapêutica química, associada ao tratamento de raspagem e alisamento radicular (LOESCHE et al., 1981; GOODSON et al., 1985; NOYAN et al., 1997; AWARTANI; ZULQARNAIN, 1998; JEFFCOAT et al., 1998; RIEP et al., 1999).

Este tratamento químico consiste na utilização de agentes antimicrobianos como antibióticos e anti-sépticos, administrados localmente ou por via sistêmica (GOODSON, 1989; RAMS; SLOTS, 1996), porém, o uso de antimicrobianos tem sido contudo o maior responsável na seleção de bactérias resistentes responsáveis pela propagação da doença periodontal (MALIK et al., 1990; WILSON, 1994; WILSON et al., 1993, 1995; WAINWRIGHT, 1998; KLEINFELDER et al., 1999; DÖRTBUDAK et al., 2001; USACHEVA et al., 2001; CHAN; LAI, 2003; KOMERICK et al., 2003).

O emprego dos diversos tipos de Lasers em periodontia tem crescido muito nas últimas décadas o que pode ser notado pela quantidade significativa de publicações científicas de experimentos realizados não só em animais, como também em humanos (MESTER et al., 1968; MESTER et al., 1971; MESTER, 1973; MESTER; JASZSAGI-NAGI, 1973; MESTER et al., 1976; MESTER et al., 1978; MESTER et al., 1985; AVERBAKH et al., 1976; KANA et al., 1981; SURINCHAK et al., 1983; SOARES et al., 1989; GARCIA, 1992; LEE et al., 1993; BISHT et al., 1994; MISERENDINO; PICK, 1995; KAMEYA et al., 1995; LOWE et al., 1998; ESPINOSA, 1999; MALDONADO, 2000; REZENDE, 2001).

O efeito bactericida dos lasers tem sido creditado na maioria dos relatos, aos lasers de alta intensidade (COOB et al., 1992; ROONEY et al., 1994; HATIT et al., 1996; RADVAR et al., 1996; KATO et al., 1998; BACH et al., 2000; DEPPE et al., 2001; KREISLER et al., 2002; MAIORANA et al., 2002), porém são poucos os registros sobre o efeito letal dos lasers em baixa intensidade sobre microrganismos quando empregado isoladamente (HENRY et al., 1996; GARCIA et al., 1997; KONIG et al., 2000). Contudo, muitos estudos têm atestado o efeito destes lasers sobre a viabilidade microbiana quando os mesmos são associados a drogas

fotossensibilizadoras (WILSON; MIA, 1993; BURNS et al., 1993; WILSON, 1994; BURNS et al., 1994; WILSON et al., 1995; BHATTI et al., 1997, 1998; HAAS et al., 1997, 2000; DORTBUDAK et al., 2001; FERREIRA, 2001; USACHEVA et al., 2001; YILMAZ et al., 2002; CHAN; LAI, 2003; SHIBLI et al., 2003).

Desta forma, a terapia fotodinâmica, que se fundamenta na associação de drogas fotossensibilizadoras e luz, no espectro visível ou infravermelho tem despertado o interesse de muitos estudiosos. Inicialmente descrita para promover ação letal sobre células do câncer, recentemente tem sido empregada na Odontologia para promover efeitos letais sobre microorganismos (WAINWRIGHT et al., 1999; USACHEVA et al., 2001; FERREIRA, 2001; YILMAZ et al., 2002; CHAN; LAI, 2003), Contudo raros são os trabalhos que avaliam o efeito desta terapia sobre a reparação tecidual (ESPINOSA, 1999; LOPES Jr., 2002; JAYASREE et al., 2001; SHIBLI et al., 2003; LIMA, 2004), e principalmente sobre a doença periodontal.

Assim, diante do exposto, constitui propósito do presente trabalho, avaliar a terapia fotodinâmica sobre os eventos da doença periodontal induzida em ratos.

Revisão de Literatura

“Lembra-te de conservar o ânimo tranqüilo nas
situações difíceis”
(*Horácio 65 – 8 a.C.*)

2 Revisão de Literatura

O periodonto é definido como os tecidos que ancoram e envolvem os dentes, os quais consistem no cimento, ligamento periodontal, osso que reveste o alvéolo e na gengiva que se encontra em contato com os dentes (TEN CATE, 2001). O órgão dental é o único composto por quatro diferentes tipos de tecidos, que variam quanto a sua composição celular, tipos e quantidade de proteínas, mineralização, grau de atividade metabólica e suscetibilidade à doença (MARIOTTI, 1993). O periodonto, portanto, interliga o dente ao osso dos maxilares e é responsável pelo seu suporte durante a função, sendo constituído por tecido conjuntivo, protegido por epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado na superfície mastigatória e por epitélio não queratinizado nas superfícies juncional e do sulco (MELCHER, 1976).

Embora o periodonto seja uma estrutura altamente especializada e organizada está susceptível a ação de microorganismos. Frente a estes microorganismos, processos inflamatórios e imunológicos são desencadeados nos tecidos periodontais como forma de impedir que estes microorganismos se disseminem ou invadam os tecidos. Estes processos representam as características predominantes da gengivite e da periodontite. A reação inflamatória pode ser visível, microscopicamente pela análise do infiltrado inflamatório e clinicamente pela alteração da cor da gengiva e também pela sua forma. Portanto, os processos inflamatórios e imunológicos são mecanismos de defesa do hospedeiro, que em alguns casos podem ser prejudiciais, pois são capazes de danificar ou destruir células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo, além do osso alveolar. Tais

reações não são desencadeadas em resposta a uma simples espécie bacteriana, mas a uma infecção bacteriana mista. Como resultado da evolução da doença periodontal teremos a perda do osso alveolar, degradação de fibras colágenas e migração apical do epitélio juncional a partir da junção cimento-esmalte (LINDHE et al., 1999).

Dados atualmente disponíveis na literatura mostram que as substâncias oriundas dos microrganismos presentes no biofilme dental são patogênicas porque têm a capacidade de ativar determinados mecanismos de defesa do hospedeiro que amplificam o dano tecidual. Algumas destas substâncias podem causar injúria direta às células e aos tecidos do hospedeiro. Outros componentes microbianos podem ativar o processo inflamatório ou o sistema imune celular e humoral, o que secundariamente danifica o periodonto. É esta última via a responsável pela maior parte das injúrias periodontais (PAGE; KOMMAN, 1997), sendo, também, considerada como a grande responsável pela grande variação na resposta do hospedeiro ao biofilme, constituindo um fator importante na etiopatogênese da doença periodontal (KINAME et al., 1999).

A contaminação das superfícies radiculares por produtos citotóxicos de origem bacteriana, especialmente por endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS), que é um dos componentes da parede celular de bactérias gram-negativas, é investigada principalmente em estudos de culturas *in vitro*, sendo recomendada a remoção excessiva do cimento para tornar esta superfície livre da contaminação bacteriana (ALEO et al., 1974; ANDRIAENS et al., 1988a,b). Por outro lado, estudos mais recentes também *in vitro*, (GIULIANA et al., 1997; ÖKTE; BAL, 2000; ZAMAN et al., 2000), têm demonstrado que a grande quantidade de endotoxinas está localizada apenas na superfície do cimento.

O cimento é um tecido mineralizado avascular, não innervado, povoado assimetricamente por células. Apesar do pequeno volume que este tecido ocupa, sua aposição na superfície radicular é necessária para interligar o dente ao osso, reparar fraturas radiculares e reabsorções, bem como para a adaptação funcional do dente. Atualmente, evidências indicam que o cimento é um reservatório de numerosos fatores de crescimento (TEN CANTE, 2001).

Aleo et al. (1974) utilizando dentes acometidos por doença periodontal avaliaram se as alterações no cimento, induzidas pela doença, aumentam a adsorção de endotoxinas na superfície radicular. Os autores ressaltam o fato da endotoxina, ser um potente agente inflamatório, que sem dúvida quando presente nas raízes dificulta a erradicação da doença. Concluíram que havia grande quantidade de endotoxinas presentes no cimento e que ela diminui a capacidade de proliferação celular. O cimento com aparência clinicamente normal, também pode ser um reservatório de endotoxinas.

Baseados na hipótese que o cimento e a dentina radicular com seus túbulos dentinários podem agir como reservatórios de microorganismos periodontopatogênicos, Adriaens et al. (1988) utilizando microscopia óptica e eletrônica, observaram as alterações estruturais e ultraestruturais destes tecidos. Os resultados mostraram invasão bacteriana no cimento e dentina radicular e defeitos em lacunas preenchidos por placa bacteriana, por vezes formando defeitos multiloculares. Assim, os autores concluíram que o debridamento mecânico apenas, não é capaz de remover as bactérias presentes na dentina radicular, necessitando, portanto de métodos químicos auxiliares para a eliminação destes microorganismos.

Ökte et al. (1999) avaliaram o cimento radicular de dentes acometidos ou não por doença periodontal, comparando seu conteúdo lipídico e

polissacarídeo. A avaliação morfológica demonstrou que existem áreas de reabsorção na superfície radicular dos dentes acometidos pela doença. A presença de lipopolissacarídeos não foi evidente no interior do cimento, mas apenas nas camadas superficiais ou associadas com colonização microbiana. Porém, mais estudos são necessários para determinar se a terapia ideal a ser aplicada é apenas o tratamento mecânico ou uma associação deste com o tratamento químico.

Beertsen et al. (2001) relacionaram a reabsorção cervical generalizada de raízes com doença periodontal. O estudo envolveu um paciente com 24 reabsorções radiculares, que foram associadas com inflamação gengival, cultura de placa subgengival positiva para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* e reabsorções da crista óssea. Após um ano de tratamento que constituiu na alteração da dieta, administração de antibiótico e procedimentos de raspagem e aplainamento radicular, todas as lesões apresentavam tecido mineralizado radiopaco no seu interior e reparo na crista óssea. Assim, estas reabsorções radiculares parecem ser o resultado de efeitos combinados de microflora periodontopatogênica e dieta rica em ácidos.

Desta forma, a patogênese da doença periodontal provoca a destruição das estruturas de sustentação dental, como resultado da ação ineficiente do sistema de defesa do hospedeiro em resposta ao acúmulo do biofilme. Este processo patogênico apresenta diferenças na extensão e severidade no próprio indivíduo, tendo diferentes sítios acometidos pela doença e, entre diferentes indivíduos e as razões para estas diferenças são multifatoriais (GONÇALVES, 2002).

O biofilme dental, independente da susceptibilidade do indivíduo, desempenha papel fundamental na patologia periodontal sendo, que o único método

universalmente aceito para interromper a destruição periodontal é o controle químico-mecânico do biofilme (PAGE; KOMMAN, 1997).

A partir do relato de Page; Komman, 1997 muitos estudos têm sido realizados para avaliar a melhor terapêutica local da doença periodontal. A maioria dos autores utilizaram como terapêutica complementar ao tratamento mecânico, antimicrobianos, ácidos e agentes quelantes (BLOMLÖF et al., 2000; BABAY, 2001; PAGE, 2004)

Muitos autores baseado no relato de Page; Komman, 1997 da necessidade de uma terapêutica antimicrobiana complementar a raspagem e alisamento radicular devido a dificuldade de acesso a determinados dentes, anatomia radicular e a presença de toxinas aderidas a superfície radicular provenientes da colonização bacteriana presente na bolsa periodontal muitos estudos, nos últimos anos, têm sido realizados para avaliarem a melhor terapêutica local da doença periodontal.

Vanheusden et al., (1999) publicaram um estudo que comparou o comportamento de queratinócitos humanos, obtidos por cultura, sobre superfícies de dentina com e sem condicionamento por tetraciclina HCl e ácido cítrico. Para tal, foram utilizados dentes humanos (pré-molares) extraídos por indicação ortodôntica. O terço apical e a coroa foram seccionados e descartados. O remanescente, com auxílio de uma cureta periodontal e broca diamantada, foi raspado para que fossem removidos restos de tecido mole aderido e todo o cimento. Logo após, o dente foi triturados para que se obtivessem partículas de dentina entre 44 e 76 µm de diâmetro. As partículas foram então condicionadas com ácido cítrico a 3% por 3 minutos e minociclina HCl a 0,01% e 2,5% por 3 minutos. Após condicionamento, as partículas foram colocadas em meios de cultura e realizaram as coletas dos

resultados. Quanto ao número de queratinócitos aderidos à superfície, a quantidade foi menor na dentina não tratada, aumentando sobre a dentina tratada com monociclina HCl, quanto maior a concentração de ácido, menor a aderência sobre a dentina. Quanto à forma adquirida pelas células após a adesão, nas superfícies não tratadas, as células tinham os citoplasmas regulares e somente algumas extensões eram visíveis, nas superfícies condicionadas, as células desenvolveram um grande número de filipodes e as membranas apresentaram vilosidades. A forma das células não diferiu nos dois tipos diferentes de condicionamento da dentina.

O tratamento da doença periodontal por meio da raspagem e alisamento radicular em campo, fechado ou aberto, resulta em significativa melhoria clínica, porém não eliminam as chances de recorrência ou progressão da doença. Baseados nestas possibilidades muitos estudos têm proposto substâncias auxiliarem a raspagem e alisamento radicular e Page, (2004) indica o uso de uma terapêutica complementar a raspagem e alisamento radicular com o uso por longos períodos e altas concentrações de antimicrobianos diretamente no interior da bolsa e a utilização destes coadjuvantes no tratamento de raspagem e alisamento radicular para o tratamento da doença periodontal promovem uma diminuição em média de 0,8 mm a profundidade de sondagem, sendo indicados como terapia complementar a terapêutica periodontal convencional.

Com objetivo de distribuir de forma didática os assuntos revisados, eles serão divididos em três tópicos. O primeiro envolve os trabalhos relacionados à indução da doença periodontal tendo como modelo experimental o rato. O segundo envolve os trabalhos em que a terapia fotodinâmica é utilizada na redução bacteriana e no terceiro tópico serão apresentados trabalhos que elucidam a reparação tecidual promovida pela terapia fotodinâmica.

2.1 Indução da Doença Periodontal

Pela dificuldade de se estudar a etiopatogênese e forma de tratamento da doença periodontal em humanos a utilização de modelos experimentais em animais é largamente utilizado. Pela semelhança do homem com os primatas estes são os melhores modelos para estudo. Contudo, o rato (*Rattus norvegicus*) é o animal mais freqüentemente utilizado em estudos de periodontite experimental, pois, comparado aos primatas, os ratos são mais baratos, de fácil manipulação e com grande semelhança ao homem (KLAUSEN, 1991). Para a indução da doença periodontal através da utilização de ligaduras estas, podem ser de nylon, algodão e seda, colocadas e adaptadas ao redor da cervical dos molares. Utilizando esse modelo de doença periodontal induzida, Johnson, (1975) relatou em seus estudos o achatamento e deslocamento da margem gengival, acúmulo de placa bacteriana, aumento da proliferação de infiltrado inflamatório no tecido subjacente, migração apical do epitélio juncional e reabsorção da crista óssea alveolar na porção mesial, verificada através de análise radiográfica, 17 dias após a adaptação de ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores de ratos.

A injúria traumática causada pela adaptação da ligadura ao redor dos molares como modelo para o desenvolvimento da doença periodontal experimental tem sido muito questionada. A ligadura estaria agindo apenas como fator secundário no acúmulo de placa bacteriana (NYMAN et al., 1979; BREVIK et al., 2002). Porém, existe a alegação de que o caráter traumático da colocação da mesma seria fator predominante na produção de destruição dos tecidos periodontais.

Tendo como objetivo esta questão, Rovin et al., (1966) verificaram que o uso de ligaduras de seda ao redor de primeiros molares inferiores de ratos livres de germes não apresentaram nenhuma evidência de resposta inflamatória.

Sallay et al., (1982) com o mesmo objetivo, avaliaram a possibilidade da destruição dos tecidos periodontais, decorrente do trauma mecânico e não da presença de bactérias. Dessa forma, realizaram a administração de antibióticos (gentamicina, clindamicina e tetraciclina) previamente a adaptação da ligadura e, para controle da placa aplicaram topicamente uma vez ao dia clorexidina. Como resultado, os autores observaram inibição da perda óssea alveolar, demonstrando o caráter infeccioso da periodontite experimental em ratos.

De acordo com Page; Schroeder, (1982) o rato possui um incisivo e três molares em cada quadrante. Pelo fato dos incisivos terem crescimento contínuo, são desfavoráveis na utilização como modelos experimentais da doença periodontal. Por outro lado, a estrutura e organização dos tecidos periodontais dos molares de ratos como, epitélio oral, epitélio gengival sulcular, epitélio juncional, fibras periodontais colágenas, cemento e osso alveolar são muito semelhantes aos encontrados em humanos. A única grande diferença é o epitélio sulcular do rato apresentar-se queratinizado. Teoricamente, esta estrutura tecidual poderia interferir com a migração de produtos metabólicos bacterianos para o tecido conjuntivo, desse modo impedindo o início de uma resposta inflamatória. No entanto, diversos estudos demonstram que a inserção de um material no sulco gengival de ratos, o mesmo penetrou no tecido conjuntivo via epitélio juncional (ROMANOWSKI et al., 1988; TAKATA et al., 1988).

Os ratos com cinco semanas de vida possuem todos os molares erupcionados. No entanto, esses molares sofrem, com a idade, uma erupção

passiva e migração para distal, decorrentes da atrição das superfícies oclusais. Juntamente com essa migração dos dentes, ocorre contínua remodelação do osso alveolar. Desse modo, a distância entre a junção cimento-esmalte (J.C.E.) e a crista óssea alveolar permanece constante em superfícies vestibular, mesial e distal em ratos sem doença periodontal, enquanto que nas superfícies linguais ou palatinas, pode ser observado um aumento fisiológico dependendo da idade (KLAUSEN, 1991).

A destruição óssea alveolar foi demonstrada por Sallay et al. em 1982 que de 9 a 14 dias após a colocação de ligaduras, foi possível observar histologicamente, tanto a destruição óssea alveolar horizontal, como seqüestro ósseo e leucocitose na corrente sanguínea periférica.

Mandalunis et al., (1998) analisaram histomorfologicamente a dinâmica da perda óssea alveolar em periodontite experimental em ratos. Utilizaram como marcador ósseo injeção de tetraciclina no 1º e 14º dia. No dia seguinte foi colocada a ligadura ao redor do primeiro molar inferior e o lado contralateral foi tido como controle. Os animais foram sacrificados 72 horas e 96 horas após a colocação da ligadura. As fotografias por fluorescência foram tomadas para a realização da histomorfometria na porção interradicular em corte obtidos por desgaste no sentido méso-distal. Os resultados indicam que 72 horas após a adaptação do fio, a perda óssea foi o dobro na porção mesial quando comparado com a superfície distal. A análise dos resultados após 96 horas indicou uma perda óssea mais acentuada na crista alveolar mesial. Os autores afirmam que este modelo experimental pode ser utilizado para o estudo da doença periodontal e que a perda óssea alveolar é maior na porção mesial.

Wikesjö; Selvig, (1999) em uma revisão de literatura dos aspectos biológicos críticos envolvidos no estudo da regeneração periodontal, incluindo modelos animais os autores concluíram que os defeitos periodontais podem ser classificados em supra-ósseos, infra-ósseos, defeitos de furca e recessão gengival ou ainda uma combinação destes e, os animais que podem ser utilizados nos estudos são os roedores, felinos, porcos, cães e primatas. Os ratos e outros roedores são freqüentemente usados nos estudos dos fenômenos biológicos básicos e os animais maiores em estudos de defeitos periodontais. No final do estudo os autores concluíram que as estratégias clínicas para obtenção da regeneração periodontal incluem biomodificação radicular e da ferida, visando estimular a formação de cemento e osso.

Bezerra et al., (2000) realizando análise macroscópica, observaram perda óssea alveolar significativa logo após 4 dias da colocação de ligaduras, alcançando um pico máximo aos 7 dias, em que além da reabsorção severa, puderam observar, histopatologicamente, um infiltrado inflamatório progressivo e um aumento do número de osteoclastos presentes.

Sinais clínicos de inflamação gengival foram descritos por Nociti Jr. et al., (2000). Os autores realizaram análise 30 dias após a adaptação da ligadura de algodão nos primeiros molares inferiores de ratos. Ao realizarem análise histomorfométrica, não encontraram diferenças significativas quanto a perda óssea encontrada na região de furca dos primeiros molares inferiores dos dentes que apresentavam ligadura, quando tratados com nicotina nas concentrações de 0,13 µL/mL, 0,19 µL/mL e 0,26 µL/mL tendo o maior índice de perda óssea quando utilizaram a nicotina na concentração de 0,13 µL/mL. Em relação a perda óssea nos dentes não submetidos à colocação de ligadura os autores não observaram perdas

ósseas na região de furca. Os autores concluem o estudo relatando que a nicotina aumentou os efeitos dos componentes locais da doença periodontal não apresentando ser dose dependente, e a utilização da nicotina na ausência de ligadura não promoveu perda óssea.

Holzhausen, (2002) com o objetivo de avaliar os efeitos da inibição específica da COX-2, com o celecoxib, sobre o desenvolvimento da doença periodontal experimentalmente em ratos a autora utilizou cento e vinte ratos (*Rattus norvegicus albinus-Holtzman*) machos com peso de aproximadamente de 100g. Após um dia da colocação do fio no primeiro molar inferior esquerdo do animal estes foram divididos em dois grupos experimentais que receberam celecoxib nas concentrações de 10 mg e 20 mg por peso corporal/dia por via oral. No grupo controle a autora administrou soro fisiológico. Aos 3, 5, 10, 18 e 30 dias após o início do tratamento 12 animais de cada grupo foram sacrificados. A mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas hemimandíbulas e o espécime contralateral do experimento foi considerado como controle. Na análise histopatológica a autora observou em todos os grupos ulceração do epitélio gengival, presença de infiltrado inflamatório e áreas de reabsorção óssea, sendo que nos grupos teste estas alterações eram menores. A autora conclui seu trabalho relatando que a administração diária oral de celecoxib 10 mg/Kg de peso corporal ou 20 mg/kg de peso corporal, interferiu com a resposta inflamatória do periodonto frente a presença da ligadura em ratos. A administração do celecoxib atrasou o início do processo inflamatório agudo e o grau de reabsorção óssea alveolar, não havendo diferenças quanto à dosagem utilizada.

Com o objetivo de investigar o efeito do gel de EDTA como coadjuvante na terapêutica periodontal, Reis, (2002) realizou um trabalho em que

utilizou 45 ratos, nos quais foi induzida a doença periodontal no 2^o molar superior esquerdo por meio da inserção de um fio de algodão. Após 5 semanas, a ligadura foi removida e os animais submetidos à raspagem e aplainamento radicular. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos. No grupo 1 foi aplicado EDTA à 24%, pH 7,0 durante 2 minutos, os animais do grupo 2 receberam apenas o tratamento mecânico e o grupo 3 foi condicionado com o gel placebo, pH 7,0 durante 2 minutos. Todos os grupos receberam irrigação final com soro fisiológico por 1 minuto. Em seguida, foi realizada uma marcação radicular na porção mais profunda da bolsa. Os animais foram sacrificados 4, 10 e 28 dias após ter sido realizado os tratamentos. Os resultados obtidos pelos autores quanto ao tipo de tratamento realizado os autores não observaram nenhuma diferença estatisticamente significativa com relação a reparação do periodonto. No entanto, o maior intervalo entre tratamento e tempo de sacrifício melhorou o reparo tecidual, uma vez que os animais sacrificados no período de 28 dias apresentaram menor quantidade de epitélio, maior quantidade de tecido conjuntivo sadio e preenchimento total da marcação. Foi verificada também ausência de tecido conjuntivo inflamado neste período. Os autores concluíram que o gel de EDTA não contribuiu para o reparo do tecido periodontal, quando utilizado em associação ao tratamento periodontal não cirúrgico e que o rato é um bom modelo na experimentação da doença periodontal induzida.

Nassar et al., (2004) avaliou o efeito da ciclosporina A sobre o osso alveolar de ratos que apresentavam doença periodontal induzida por ligadura adaptada no primeiro molar inferior esquerdo. Foram utilizados 24 ratos divididos em 4 grupos com 6 animais cada sendo: Grupo 1: controle; Grupo 2: ligadura ao redor do primeiro molar inferior; Grupo 3: ligadura ao redor do primeiro molar inferior e os ratos tratados com ciclosporina A e Grupo 4: ratos tratados com ciclosporina A. Após

30 dias os animais foram sacrificados e os níveis séricos de cálcio e fosfatase alcalina foram mensurados. Realizaram análise histomorfométrica na região compreendida da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar. A espessura do cimento foi analisada conjuntamente com parâmetros estereológicos: densidade volumétrica de osteoclastos multinucleados, osso alveolar, medular e relação de superfície óssea reabsorvida foram analisados na região mesial do osso alveolar. Os autores observaram redução no cálcio sérico nos grupos tratados com ciclosporina. Não foi observada mudança significativa na fosfatase alcalina sérica. A terapia com ciclosporina, combinada com a presença de ligadura, diminuiu o osso alveolar e aumentou o volume de osteoclastos medular, e a relação de superfície reabsorvida e a espessura de cimento foi também aumentada nos ratos tratados com ciclosporina A quando comparado com os não tratados.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que um aumento da prevalência e severidade da doença periodontal em pacientes com diabetes mellitus, com objetivo de avaliar tal influência Holzhausen et al., (2004) realizaram estudo em ratos nos quais foram induzidos o diabetes. Os autores utilizaram 72 animais divididos em 4 grupos experimentais que foram compostos por: Grupo I: controle, somente a presença da ligadura nos primeiros molares inferiores. Grupo II: ratos com diabetes induzida presente por todo o período experimental e ligadura nos primeiros molares inferiores. Grupo III: ratos com diabetes induzida por todo o período experimental e tratados com solução salina e ligadura nos primeiros molares inferiores. Grupo IV: ratos com diabetes induzida foram tratados com insulina após 4 dias da indução do diabetes experimental e estes apresentavam ligadura nos primeiros molares inferiores. Após 7, 15 e 30 dias da indução da doença periodontal estes animais foram sacrificados para análise radiográfica da perda óssea alveolar

na porção mesial dos primeiros molares inferiores. Os autores puderam observar que a maior média de perda óssea foi obtida no grupo III em todos os períodos experimentais com diferença estatisticamente significativa com os demais grupos e não observaram diferença estatisticamente significativa na perda óssea alveolar entre os períodos experimentais no grupo III. Os autores relatam que a severidade da doença periodontal pode não ser afetada por períodos curtos do diabetes.

A destruição do tecido periodontal, observada em ratos, os quais desenvolvem tal doença pela presença de ligaduras, apresenta semelhança ao processo que ocorre em humanos. A destruição do tecido periodontal, em humanos e em ratos, é decorrente das respostas do hospedeiro frente à presença de bactérias periodontopatogênicas e, tal modelo mostra-se efetivo nas elucidações do comportamento da doença frente a diversas metodologias, mostrando-se um modelo efetivo para estudo da doença periodontal.

2.2 Terapia Fotodinâmica na Redução Bacteriana

Com o advento do Laser por Theodore Maiman em 1960, tendo como meio ativo o Rubi uma nova opção terapêutica na área de prevenção, terapêutica e cirúrgica surgiu. Com esta nova conquista da ciência, os primeiros relatos e publicações da utilização do Laser foram para a obtenção da fotocoagulação em cirurgia de retina (ZARET et al., 1963).

Nos últimos anos, um tema muito interessante e de diversas divergências é a utilização do Laser de baixa intensidade (LILT – Low Intensity Laser Therapy), tal pela sua ação biomoduladora dentro do comprimento de onda (λ) do laser de hélio-neônio ($\lambda = 632,8$ nm) ou do Laser diodo de semicondutores ($\lambda = 670$

a 960 nm). Karu; e Mester são pesquisadores que contribuíram e muito para a utilização do Laser de baixa intensidade na clínica. Seu valor terapêutico é altamente controverso, variando desde o efeito placebo (RYDEN et al., 1994) à sua ação bactericida (COOB et al. 1992; WILSON; MIA 1993; WILSON, 1994; ROONEY et al. 1994; WILSON et al. 1995; HATIT et al. 1996; RADVAR et al. 1996; KATO et al. 1998; BACH et al. 2000; DEPPE et al. 2001; KREISLER et al. 2002; MAIORANA et al. 2002), à prevenção eficaz da cárie dental (SLUZHAEV; KUZAKOVA, 1989; MUHASHEV 1991) e à sua efetividade no processo de reparo (MESTER et al. 1968; GARCIA, 1992, LOPES JR., 2000; SHIBLI et al., 2003; GAD, 2004).

Nos últimos anos temos notado que a comunidade científica mundial tem dado atenção especial à terapia fotodinâmica a qual consiste na associação de um agente fotossensibilizador com uma fonte de luz. Foi inicialmente utilizada na área Médica para tratamento oncológico (TOMASELLI et al. 2001) e, mais recentemente tem sido empregada na Odontologia, com grandes perspectiva no controle antimicrobiano.

Esta terapia fundamenta-se na possibilidade dos Lasers interagirem com drogas fotossensibilizadoras (cromóforos), o que promoverá um maior efeito fotobiológico, podendo inclusive, promover a ação letal sobre células e microrganismos. Desta forma, a terapia fotodinâmica tem despertado o interesse de muitos estudiosos. Inicialmente descrita para promover ação letal sobre células do câncer, tem sido utilizado nos últimos anos para outras doenças sendo inclusive procedimento aprovado pela U.S Food and Drug Administration (FDA) e por inúmeras agências de saúde ao redor de todo mundo (DOUGHERTY, 2002). Tal terapia fundamenta-se no uso de drogas fotossensibilizadoras e luz, no espectro visível ou infra-vermelho. O corante em função da absorção da luz, inicia uma série

de reações químicas que levam a produção direta ou indireta de oxigênio “singlet” e outras espécies de oxigênio reativo capaz de promover modificações na célula.

Inúmeros agentes fotossensibilizadores tem sido utilizados. Dentre estes, destaca-se o azul de toluidina O, cristal violeta, fitalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirinas, tionina, protoporfirina e azul de metileno. O azul de metileno (tetra-metil-tionina-clorídrica) apresenta peso molecular de 391,84, cor azul-metálica, hidrofílico com espectro de absorvância de 660 nm e, este corante é o mais importante representante dos corantes tiazínico tendo sido usado clinicamente para corar células (SCHIMIDT et al. 1991). Relatos encontrados na literatura demonstram que o azul de metileno foi utilizado com coadjuvante no tratamento de diferentes patologias, face suas propriedades ansiolíticas e antidepressivas (EROGLU; e Caglayan, 1997; OLIVEIRA; GUIMARÃES, 1999), capacidade de inativação de vírus sobre suspensão de células vermelhas (SKRIPCHENKO et al. 1997) e capacidade de ativar o efeito fotobactericida sobre diferentes microrganismos (WAINWRIGHT et al. 1999; USACHEVA et al. 2001; FERREIRA, 2002; YILMAZ et al. 2002; CHAN; LAI, 2003).

Mais recentemente quando esta terapia busca um efeito antimicrobiano, alguns autores a denominam de quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) (WAINWRIGHT et al., 1999; RIBEIRO; e ZEDEL, 2004), e, esta técnica mostra-se efetiva, *in vitro*, contra bactérias, incluindo cepas resistentes a drogas (WAINWRIGHT et al., 1998; BHATTI et al. 1997). A morte bacteriana ocorre quando o corante absorve a energia do Laser e isso o leva a produzir substâncias altamente reativas, que por sua vez causam danos ao microrganismo ou célula alvo (ZEDEL et al., 2004).

Com relação ao efeito bactericida da terapia fotodinâmica, Dobson; e Wilson, (1992) utilizaram vários agentes fotossensibilizadores, como o cristal violeta, azul de metileno, azul de toluidina O, fitalocianina, sobre a viabilidade de alguns microorganismos como os *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, quando submetidos ao tratamento “*in vitro*” com o laser de He-Ne com a potência de 7,3 mW.

Em 1994 Wilson relata em seu estudo de revisão de literatura que a terapia realizada com Laser atuando em baixa intensidade pode ser influenciada pelo pH, conteúdo de água, presença de matéria orgânica, densidade da população celular e intensidade do fluido sulcular. Relata também que muitas bactérias da cavidade oral não apresentam cromóforos externos para absorver a luz laser no espectro vermelho ou infravermelho, exceção feita as espécies pigmentadas de preto como as *Porphyromonas* e *Prevotellas* que apresentam protohematoporfirina e protoporfirina respectivamente, como cromóforos naturais. O autor relata também que a terapia fotodinâmica pode ser utilizada na terapia de manutenção para prevenir a recolonização na região sub-gengival por bactérias periodontopatogênicas.

Haas et al. (1997) realizaram um estudo para avaliar a afirmativa de Wu-Yuan et al. em 1995 quando relataram que diferentes superfícies de implantes iriam influenciar na aderência do biofilme bacteriano. Frente a esta afirmativa os autores realizaram um estudo *in vitro* para avaliarem a efetividade da terapia fotodinâmica na eliminação de bactérias na superfície de discos de titânio com superfície polida, de hidroxiapatita. Estes discos foram contaminados com as *Porfiromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Actinobacilos actinomycetemcomitans*,

e foram divididos em quatro grupos experimentais. Grupo 1 recebeu azul de toluidina na concentração de 100 µg/mL e, após 1 minuto foi irradiado com o Laser de diodo com 905 nm de comprimento de onda operando no modo pulsado, com potência de 7,3 mW por um período de 60 segundos. O grupo 2 não recebeu nenhum tipo de tratamento. Já o grupo 3 recebeu irrigação somente com soro fisiológico por 1 minuto e subsequente aplicação do Laser com os mesmos parâmetros do grupo 1 e finalmente o grupo 4 que recebeu tratamento somente com azul de toluidina. Imediatamente após os tratamentos foram coletadas amostras e então realizaram exame de cultura. Nas superfícies tratadas apenas com azul de toluidina e Laser isoladamente os autores não observaram diminuição nas culturas bacterianas além de que culturas negativas foram obtidas apenas com a combinação do Laser e azul de toluidina. Os autores concluíram o estudo afirmando que a terapia fotodinâmica resultou na morte bacteriana podendo ser utilizada no tratamento da periimplantite, apresentando a vantagem de não alterar a superfície dos implantes além de apresentar os mesmos resultados, independente da superfície do implante analisada.

Lopes Jr., (2000) avaliou o uso de droga fotossensibilizadora associada ou não ao laser de baixa intensidade sobre os eventos biológicos do processo de reparação alveolar em feridas de extração dental infectadas. Foram utilizados 48 ratos que após indução anestésica sofreram exodontia do incisivo superior com subsequente isquemia alveolar. Estes alvéolos foram então contaminados com secreção purulenta de ratos que apresentavam alveolite. Após três dias da evolução da alveolite estes animais foram divididos em 4 grupos. Grupo I - foi tido como grupo controle e nenhum tipo de tratamento foi realizado. Grupo II – os ratos pertencentes a este grupo receberam apenas curetagem alveolar e

posterior irrigação com azul de metileno na concentração de 100 µg/mL. Grupo III – nestes ratos o autor realizou a curetagem alveolar e posterior aplicação do Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio com 635 nm de comprimento de onda com emissão pulsada de forma pontual, depositando na área 3,2 J/cm² de densidade energética perfazendo um tempo de 240 segundos. Após 7, 15, 21 e 28 dias da realização do tratamento os ratos foram sacrificados e realizou-se a análise histológica. Esta análise permitiu ao autor observar que no grupo controle houve um atraso na cronologia de reparação alveolar e que o uso da droga fotossensibilizadora não promoveu efeitos indejáveis à reparação alveolar e o uso isoladamente do Laser promoveu uma reparação mais evoluída e diferenciada que o grupo controle. Quando o autor realizou a terapia fotodinâmica o processo de reparação alveolar demonstrou-se mais evoluído e diferenciado quando empregou a droga isoladamente ou o laser. O autor relata que estes resultados abrem novas perspectivas de emprego do Laser atuando em baixa intensidade e reforçam a possibilidade do emprego de droga fotossensibilizadora para se obter a fotobiomodulação.

Ferreira (2001) com objetivo de avaliar a ação letal do Laser, de drogas fotossensibilizadoras e da associação de ambos, foram utilizados *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella denticola*, *Eubacterium sp*, bastonetes Gram negativos capnfilicos e *Streptococcus sanguis*. Estes microorganismos após cultura foram irrigados com solução de azul de toluidina-o e azul de metileno com concentrações final de 50 µg/mL, com aplicação ou não do Laser de diodo semiconductor por 60 e 120 segundos, depositando uma densidade de energia de 150 J/cm² e 300 J/cm². Após tratamento frações de 100 µl foram coletadas e mantidas em cultura de anaerobiose. A contagem das colônias crescidas possibilitou

concluir que o uso isolado do Laser em baixa intensidade e de drogas fotossensibilizadoras, não promoveram alterações significativas na viabilidade de microorganismos bucais, diferenças estatisticamente significante foram evidentes quando se utilizou a associação do Laser com droga fotossensibilizadora, com efeitos mais diferenciados nas amostras tratadas com azul de toluidina-O, quando comparada com o azul de metileno não importando o tempo de exposição ao Laser.

Com o objetivo de avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina O na fotossensibilização letal de microorganismos patogênicos Usacheva et al. (2001) utilizaram estes corantes em diversas concentrações sendo: 10, 20, 30 40, 50, 100, 150, 200 μM em diferentes bactérias como: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pneumoniae*; *Enterococcus faecalis*; *Hemophilus influenzae*; *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginos*. Os autores utilizaram o Laser de Argônio com comprimento de onda de 630 nm e o Laser diodo de comprimento de onda de 664 nm com fluência variando de 10 e 60 J/cm^2 e variando a intensidade de potência de 50 a 100 mW/cm^2 . Os resultados obtidos pelos autores indicaram que todos os microorganismos foram eliminados em algum grau quando expostos ao Laser na presença dos corantes. No entanto, a fotossensibilização dependeu do corante utilizado, sua concentração, fluência e intensidade de potência, bem como da espécie bacteriana envolvida. Na ausência da luz o azul de toluidina O mostrou-se mais efetivo quando comparado com o azul de metileno na morte de células bacterianas. O aumento da efetividade do corante em proporcionar morte bacteriana está relacionado com o tempo de contato e concentração.

Com o objetivo de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre a *Cândida albicans* Teichert et al. (2002) utilizaram cepas resistentes ao tratamento convencional da candidíase as quais foram coletadas de pacientes HIV-positivo.

Estas cepas foram inoculadas na cavidade oral de ratos que posteriormente foram submetidos a aplicação tópica de 1 mL do azul de metileno nas concentrações de 250, 275, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/mL. Após 10 minutos da aplicação do corante os autores aplicaram o Laser de diodo com comprimento de onda de 664 nm com uma potência de 400 mW, por um período de 687,5 segundos resultando em uma densidade energética de 275 J/cm². Após aplicação única realizaram exame de cultura da coleta das amostras e os animais foram sacrificados para análise histológica da língua. Os resultados obtidos pelos autores mostram uma completa eliminação dos microorganismos quando utilizaram as concentrações de 450 e 500 µg/mL do corante. Na análise histológica os ratos tratados com terapia fotodinâmica não apresentaram candidíase e insignificante resposta inflamatória, sendo que nos ratos do grupo controle as línguas apresentaram-se com elevada taxa de candidíase restrita as camadas de queratina. Os autores concluíram o estudo relatando que a terapia fotodinâmica é uma alternativa em potencial para o tratamento da candidíase, apresentando como vantagens de ser uma terapia realizada topicamente sem a interferência com outros medicamentos aplicados sistemicamente, ser uma técnica simples, inespecífica atingindo um grande número de microorganismos e uma terapia que pode ser repetida sem o risco da seleção de cepas resistentes e indicam a utilização do rato como modelo experimental para avaliação da terapia fotodinâmica.

Kömerik et al. (2002) avaliaram o efeito adverso do Laser na mucosa de ratos na presença do azul de toluidina O em várias concentrações e avaliaram também a penetração do corante no tecido. O azul de toluidina foi utilizado na concentração de 25, 50 e 200 µg/mL. O Laser diodo utilizado pelos autores apresentava-se com comprimento de onda de 633 nm, com potência de 100 mW. A

mucosa recebeu 25 µL do corante e posterior aplicação do Laser com uma fibra ótica de 6 mm de diâmetro e, o lado oposto da mucosa foi tido como controle negativo. Os grupos experimentais foram compostos pela combinação de 25 µg/mL do corante com densidade de energia de 110 J/cm² resultando em um tempo de exposição de 5 minutos; 50 µg/mL do corante com densidade de energia de 170 J/cm² resultando em um tempo de exposição de 8 minutos e 200 µg/mL do corante com densidade de energia de 340 J/cm² resultando em um tempo de exposição de 16 minutos. O autores também avaliaram o efeito isoladamente do Laser e do corante. Após 3 dias do referido tratamento os animais foram sacrificados para análise histológica e para avaliação da distribuição do corante no tecido foi utilizado o método de fluorescência dos tecidos e para esta avaliação os animais foram sacrificados 1 minuto e 10 minutos da aplicação do corante. Os resultados obtidos indicam que nenhum animal apresentou-se com estresse em todo o período experimental e quando avaliaram a mucosa, nenhum animal em nenhum grupo experimental apresentou-se com alterações na mucosa. Ao avaliarem histologicamente não observaram em nenhum grupo alterações nas fibras musculares, tecido conjuntivo e epitélio. Não observaram também alterações nos vasos sanguíneos, necrose tecidual e processo inflamatório presente. Na avaliação da distribuição do corante usado na concentração de 200 µg/mL por 10 minutos presente no tecido epitelial e no tecido conjuntivo os níveis apresentaram-se baixos compatíveis com os índices do lado controle. O tecido queratinizado apresentou-se com altas concentrações do corante e os autores relatam que este tecido influencia de forma significativa a penetração do corante. Quando avaliaram a associação do Laser na penetração do corante puderam observar que o tempo de aplicação influencia a penetração do corante no tecido, sendo, portanto dose dependente. Em

camadas mais profundas os autores não encontraram a presença do corante relatando que não seria nenhuma surpresa o tecido conjuntivo não apresentar nenhuma reação a terapia fotodinâmica, relatando ainda que esta terapia seria para o tratamento de infecções superficiais. Os autores concluem o estudo sugerindo que estes resultados obtidos dão segurança ao uso tópico do azul de toluidina O associado ao Laser na cavidade oral para o tratamento de infecções tópicas localizadas.

Dougherty (2002) em seu artigo de revisão de literatura relata que a morte celular promovida pela terapia fotodinâmica é mediada pela formação de oxigênio singlete e outra espécie de oxigênio reativo, causando danos celular direto pela diminuição da vascularização sangüínea contribuindo para a destruição tumoral. Relata também que a necrose e a apoptose ocorrida frente a terapia fotodinâmica depende do fotossensibilizante e da condição de tratamento. O autor salienta que esta terapia promove a ativação de macrófagos, neutrófilos e células T, resultando na liberação de várias citocinas como a IL-6, IL-10 e TNF- α . No final do artigo o autor chama atenção para o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica em modelos experimentais em animais e que os resultados obtidos apresentam semelhanças com os resultados em humanos.

Diante ao número de trabalhos *in vitro* que mostram o efeito letal da terapia fotodinâmica sobre bactérias periodontopatogênicas Yilmaz et al. (2002) realizou um estudo para avaliarem o efeito desta terapia no tratamento da doença periodontal em humanos. O grupo de estudo foi composto por 10 pacientes os quais não receberam nenhum tratamento periodontal e uso de antibióticos 6 meses antes do estudo. Os autores utilizaram 4 dentes unirradiculados sendo 1 por quadrante o qual deveria apresentar uma perda óssea de 4 mm na superfície mesial. Os

pacientes foram divididos em 4 grupos experimentais sendo: raspagem e alisamento radicular associado ao Laser e azul de metileno 0,05%; apenas a aplicação do Laser; apenas raspagem e alisamento radicular e somente técnicas de higiene oral. O Laser utilizado pelos autores foi o Laser de Arseneto de Gálio com 685 nm de comprimento de onda, na frequência de 5 Hz com potência de 30 mW e densidade de energia de 1,6 J/cm². O Laser foi aplicado imediatamente após a raspagem e alisamento radicular e nos períodos de 2, 4, 9 e 11 dias. Para análise os autores utilizaram dados microbiológicos e dados clínicos como profundidade de sondagem, índice de placa e índice gengival os quais foram coletados 3 semanas após terapia inicial. Na análise microbiológica os autores verificaram diferença estatística nos grupos tratados com a associação da raspagem e alisamento com o Laser e somente a raspagem e alisamento. Quando os autores avaliaram o tipo de tratamento realizado observaram diferença estatística entre os grupos tratados com raspagem e alisamento e Laser com o grupo em que recebeu apenas a aplicação do laser, entre o grupo tratado com raspagem e alisamento e Laser com o grupo o qual realizou somente técnicas de higiene oral e entre o grupo que recebeu somente raspagem e alisamento com o grupo de técnicas de higiene oral. Quando avaliaram os dados clínicos, os autores observaram redução significativa no índice de placa e no índice gengival em todos os grupos. Quando avaliaram o sangramento a sondagem e profundidade de sondagem houve redução significativa apenas nos grupos os quais foram tratados com raspagem e alisamento radicular associado ao Laser e no qual recebeu somente raspagem e alisamento radicular. No grupo Laser houve uma menor diminuição na perda de inserção, sangramento a sondagem e profundidade de sondagem com exceção no índice gengival e nenhuma diferença foi encontrada entre o grupo do Laser e o grupo que recebeu apenas higiene oral.

Quando os autores levaram em consideração todos os parâmetros considerados no exame clínico e microbiológico, somente o debridamento subgingival ou associado ao Laser foi mais efetivo quando comparado com o grupo que recebeu apenas a aplicação do Laser. Os autores concluíram o estudo sugerindo a necessidade de avaliar o efeito da associação de corantes com o Laser como coadjuvantes a terapia periodontal convencional e relatam ainda que esta nova opção terapêutica pode ser vantajosa no tratamento da doença periodontal inflamatória.

Frente ao número que trabalhos que utilizam diversos emissores com comprimentos de onda variados e parâmetros tendo assim uma gama de resultados contraditórios na literatura do efeito do Laser na cultura de microorganismos Nussbaum et al. (2002) realizaram um estudo para avaliarem o efeito do comprimento de onda sobre determinados microorganismos. Os autores utilizaram emissores com 630, 660, 810 e 905 nm de comprimento de onda sobre a cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O Laser de He-Ne com comprimento de onda de 630 e 660 nm atuaram com densidade de energia variando de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 J/cm². O Laser com 810 nm de comprimento de onda foi utilizado com densidade de energia de 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 J/cm² e este emissor os autores utilizaram para o grupo composto pelas *Escherichia coli*. Os resultados obtidos, permitiram que os autores observassem uma mudança significativa no crescimento bacteriano quando utilizaram densidades de energia variando de 1 a 20 J/cm² e o comprimento de onda de 630 nm parece ser o mais comumente associado com a inibição do crescimento bacteriano favorecendo a cicatrização de feridas.

Navratil; Kymplowa, (2002) realizaram uma revisão de literatura para avaliarem a contra-indicação do uso do laser de baixa intensidade e, se o seu efeito

é verdadeiro ou não. Os autores relatam que a contra-indicação está na incidência da luz Laser em células malignas pelo seu efeito biomodulador. Segundo os autores efeito biomodulador é dado pela ativação de enzimas da cadeia respiratória, com uma simultânea amplificação do efeito antioxidante. Com o aumento de ATP na célula, esta tem o processo de replicação do DNA mitocondrial acelerado. Estes dados podem ser comprovados pelo consumo de oxigênio e glicose no metabolismo celular estarem aumentados. Com este efeito, os autores relatam que há a necessidade de uma boa anamnese e exame clínico para não ocorrer à exposição de células malignas a luz Laser o que poderia promover um efeito bioestimulativo nestas células. Os autores observaram também na literatura o efeito do Laser sobre a viabilidade das bactérias, quando estas são submetidas ao Laser. O efeito positivo desta terapia irá proporcionar uma cicatrização mais diferenciada nos ferimentos purulentos e nas úlceras, devido ao aumento do suprimento sanguíneo com subsequente aumento da imunidade local do tecido irradiado por ativação da fagocitose e da ação proteolítica. Como contra-indicação do uso do Laser os autores relatam nos casos de tumores malignos, exposição da retina, exposição do abdômen durante a gravidez e áreas de gônadas e que outras contra-indicações presentes na literatura podem ser consideradas incorretas.

Diante da observação de alguns autores (TATEVOSSIAN, Gould, 1976; SMITH; GEEGAN, 1991) que chamam a atenção para os fatores que influenciam na terapêutica periodontal local como a presença do fluido gengival, sangue, saliva dentre outros, Matevski et al. (2003) realizaram um estudo para avaliarem se alguns destes fatores externos que podem ter influência nos resultados a serem obtidos pela terapia fotodinâmica. A fotossensibilização letal foi analisada “*in vitro*” em culturas de bactérias periodontopatogênicas como as *Porphyromonas*

gingivalis, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associadas ao sangue ou ao soro fisiológico simulando o fluido gengival, tendo como fonte de luz o Laser de He-Ne 635 nm e lâmpada de xenônio com filtro vermelho. A droga fotossensibilizadora utilizada foi o azul de toluidina O, nas concentrações de 12,5 µmg/mL e 50 µmg/mL. Os autores puderam observar redução na concentração destas bactérias, quando a terapia fotodinâmica foi realizada com as duas fontes de luz com exceção apenas para o *Bacteroides forsythus* que apresentou um aumento quando exposto a terapia fotodinâmica tendo a luz de xenônio como fonte de luz. Puderam observar também que os resultados obtidos com a lâmpada de xenônio e com o Laser de He-Ne foram semelhantes quando usaram os parâmetros de 12,5 µmg/ml de azul de metileno com dose de 10 J/cm². Os autores concluíram o estudo relatando que a terapia fotodinâmica tem seu efeito afetado negativamente pela presença de sangue e fluido gengival, pois estes podem refletir ou absorver a luz, atuando desta forma como uma barreira protetora às bactérias interferindo na ação tanto do Laser como do corante.

Shibli et al. (2003) realizaram um estudo piloto, por teste de cultura, da efetividade da fotossensibilização letal sobre os microrganismos envolvidos na periimplantite em cães. Após dois meses de indução da periimplantite em cães as ligaduras foram removidas e controle de placa com clorexidina a 0,12%, foi adotado por 12 meses. Decorrido este período retalho mucoperiósteo foi elevado e amostras foram coletadas com cones de papel antes e após tratamento da superfície do implante com 100 µg/mL de azul de toluidina-O e subsequente aplicação do Laser de diodo semiconductor de Arseneto de Gálio e Alumínio com comprimento de onda de 685 nm por 80 segundos. Os autores obtiveram redução e eliminação, em algumas amostras, de patógenos da periimplantite em cães, principalmente nas

espécies *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium* ssp e *Streptococcus*. Relatam também que esta abordagem adotada para promover a fotossensibilização letal a patógenos periodontais apresenta vantagens como não desenvolver a seleção de microorganismos resistentes, utilizados em baixas concentrações e de fácil aplicação.

Kömerik et al. (2003) realizaram um estudo para avaliarem a efetividade da terapia fotodinâmica na viabilidade de microorganismos. Os autores utilizaram *P. gingivalis* da linhagem W50, as quais foram inoculadas no interior da cavidade oral de ratos. Imediatamente a inoculação de 25 µl de *P. gingivalis*, na região dos molares superiores foi administrado topicamente azul de toluidina nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/ml. Como fonte de luz os autores utilizaram o Laser diodo de 630 nm depositando na área doses de 6, 12, 24 e 48 Joules correspondendo aos tempos de 1, 2, 4 e 8 minutos. Na análise histológica dos resultados os autores não observaram nenhuma alteração nas estruturas do periodonto como, ulcerações e inflamação no tecido conjuntivo, mesmo nas concentrações mais altas tanto do corante quanto do Laser utilizado. Quando analisaram o comportamento dos animais os autores não evidenciaram alterações comportamentais nos animais. Ao analisarem radiograficamente a região dos molares superiores não foi observada diferença estatisticamente significativa na perda óssea alveolar quando utilizaram 0,01 mg/ml do corante associado ao Laser com 48 J. Na análise morfométrica observou-se redução significativa da perda óssea alveolar quando utilizaram 0,1 e 1 mg do corante associado ao Laser com 48 J de potência, quando comparado com o grupo controle que não receberam nenhum tratamento, somente a inoculação das bactérias. Quando utilizaram apenas o corante ou o Laser, independente da concentração ou dose utilizada, os autores não

observaram redução significativa da perda óssea alveolar. Os resultados radiográficos foram semelhantes a análise morfométrica exceto quando utilizou-se 1 mg/ml do corante na ausência do Laser o que resultou em significativa redução da perda óssea alveolar. Foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os animais tratados com 0,1 mg/ml e 1 mg/ml do corante associado ao Laser com 48 J de potência. Os autores concluíram seus estudos relatando que a terapia fotodinâmica tendo como corante o azul de toluidina, promoveu fotossensibilização letal em um importante periodontopatógeno presente na bolsa periodontal, sem causar danos aos tecidos adjacentes e a perda óssea alveolar foi significativamente menor nos ratos tratados com a terapia fotodinâmica, sendo uma terapia antimicrobiana alternativa para o tratamento da doença periodontal.

Chan e Lai, (2003) com o objetivo de avaliarem os questionamentos na literatura dos parâmetros como, dose e tipo de droga fotossensível, que alteram os resultados da terapia fotodinâmica, realizaram um estudo em que avaliaram o efeito do Laser de He-Ne, com potência de 30 mW e comprimento de onda de 632,8 nm e do Laser diodo de AsGaAl, com potência de 100 mW e comprimentos de onda de 665 nm e 830 nm, tendo como corante o azul de metileno na concentração de 0,01% peso/volume, na viabilidade de bactérias periodontopatogênicas. As bactérias utilizadas pelos autores foram as *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Streptococcus sanguis* as quais foram mantidas em meio de cultura anaeróbico com posterior quantificação e diluição para posterior teste. O Laser de He-Ne foi utilizado por 30 e 60 segundos, depositando nos microorganismos uma densidade de energia de 3,2 J/cm² e 6,4 J/cm². Já o Laser de diodo depositou uma densidade de energia de 10,6 J/cm² e 21,2 J/cm². A distância de 5 mm da fibra as amostras foram

mantidas constantes. Os resultados deste estudo mostram que o tratamento somente com o azul de metileno não causou redução significativa na morte de todas as bactérias utilizadas no experimento, demonstrando que o azul de metileno na concentração de 0,01% peso/volume, não foi tóxico. Similarmente, a irradiação com o Laser He-Ne, não apresentou resultados significantes na morte bacteriana. Em contraste, a exposição ao Laser diodo em ambos os comprimentos de onda com densidade de energia de $10,6 \text{ J/cm}^2$, resultou em significativo declínio das colônias bacterianas. A terapia foi tempo dependente para ambos os sistemas de Laser, porém o Laser diodo de 830 nm foi o mais efetivo e a exposição por 60 segundos com densidade de energia de $21,2 \text{ J/cm}^2$, promoveu a morte de 99-100% das bactérias pigmentadas (*Porphyromonas. gingivalis. e Prevotella intermédia*) e *S. sanguis*. Já para as espécies de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, este tipo de tratamento promoveu a morte de 95 e 96% respectivamente. Os autores concluíram o estudo relatando que a terapia fotodinâmica apresenta a vantagem de ser uma terapia aplicada topicamente no interior da bolsa, sem o perigo dos efeitos indesejáveis de uma droga administrada sistemicamente e que a morte de microorganismos pode ocorrer quando são utilizados parâmetros adequados.

GAD et al. (2004) relatam em seus estudos que a emergente resistência antimicrobiana entre bactérias patogênicas, tem levado muitos pesquisadores a buscarem alternativas para a substituição das terapias antimicrobianas por terapias capazes de promoverem a morte bacteriana sem causarem a seleção de bactérias resistentes. Uma alternativa pode ser dada pela terapia fotodinâmica sendo que muitas infecções locais em animais apresentam resultados satisfatórios, no entanto os fatores que governam esta morte não são

conhecidos, porém podem ter os resultados alterados pela inativação da terapia pela presença de exotoxinas produzidas pelas bactérias. Quando analisaram o efeito de corantes catiônicos (azul de metileno) ativados pelo Laser com 665 nm de comprimento de onda e 40 J/cm² de densidade de energia depositada em *Staphylococcus epidermoides* e *aureus* com alterações na cápsula e na produção de exotoxinas. Os autores relataram que os resultados obtidos indicaram alterações na morte celular em virtude da produção de exotoxinas, que pode ser um obstáculo para a terapia fotodinâmica e que corantes catiônicos podem superar o efeito negativo da presença de exotoxinas quando associados ao Laser.

2.3 Terapia Fotodinâmica na Reparação Tecidual

Os primeiros estudos envolvendo a utilização do Laser no processo de reparo de feridas foi inicialmente proposto por Mester et al. (1971) que estudaram o reparo de feridas induzidas mecanicamente e outras por queimaduras de terceiro grau, na região dorsal de ratos. Essas lesões foram submetidas à ação do laser de rubi com comprimento de onda de 694,3 nm e doses de 0,5 a 10 J/cm². O número de aplicações foram de 1, 2 e 3 em um período de 14 dias. Os resultados comprovaram que a exposição ao Laser de baixa intensidade estimulou processo de reparação em feridas por queimaduras de terceiro grau induzidas pela eletrocoagulação da ferida, sobretudo na dose de 1J/cm². Os resultados demonstraram também que as repetições das doses estimularam a cicatrização por granulação das feridas.

Soares et al. (1989) através dos métodos, descritivo e morfológicos avaliaram a reparação tecidual em feridas cutâneas de ratos após aplicação do

laser de Hélio-Neônio (He-Ne). Foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos de 6, onde cada animal foi realizada duas lesões no dorso de aproximadamente 1 cm de diâmetro, uma mais próxima ao crânio e outra em direção a cauda. As doses aplicadas eram diárias de 2,7 J/cm² por 10 minutos. As feridas foram analisadas sob os aspectos morfológicos e histométricos nos 7^o, 14^o e 21^o dia do experimento, sendo que as aplicações do laser foram feitas entre os dias 0 a 4 dias para o grupo 7 dias, 0 a 4 e 7 a 11 dias para o grupo 14 dias e 0 a 4, 7 a 11 e 14 a 18 dias para o grupo investigado aos 21 dias. Os resultados obtidos mostraram uma epitelização e contração mais precoce nas feridas as quais foram tratadas com Laser. A proporção de fibras colágenas foi maior nas feridas irradiadas nas 3 fases analisadas do experimento. A quantidade de fibroblastos foi maior no grupo irradiado apenas no 7^o dia após procedimento cirúrgico. Os autores concluíram que o processo de reparo evoluiu de forma mais acelerada nas feridas do grupo teste em comparação ao controle.

Garcia (1992) realizou estudo clínico, biométrico e histológico sobre o comportamento de feridas cutâneas submetidas à ação do Laser. Foram utilizados, 36 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, wistar*) machos, com pesos variando entre 160 e 220 gramas. Os animais foram divididos em 3 grupos de 12 animais os quais foram submetidos a duas lesões circulares bilaterais de aproximadamente 8 mm no dorso de cada animal. Estabeleceu-se que as lesões, do lado direito de cada animal, foi considerada como lado experimental com aplicação do Laser e a contra-lateral seria controle. Foi utilizado o Laser de Arsênio e Gálio com emissão infra-vermelho, operando no modo pulsátil com comprimento de onda de 904 nm. A aplicação foi pontual em 8 localizações distintas na periferia da lesão e uma central para que toda lesão fosse tratada. A frequência de repetição aplicada variou entre 500 hertz

(mínima) e 3.700 hertz (máxima), com potência média de saída entre 0,3 a 3,5 mW. No grupo I, as feridas experimentais foram submetidas a frequência de pulso de 1.300 hertz e 1.25 mW de potência o que determinou 19 segundos por ponto de exposição. No grupo II a frequência de pulso 2.100 hertz e 2.00 mW de potência perfazendo 12 segundos por ponto de exposição. No grupo III, a frequência de pulso utilizada foi de 2.900 hertz e 2.75 mW de potência, o que determinou, por ponto de aplicação, 9 segundos de exposição. Os tempos de sacrifício dos animais ocorreram aos 3, 7 e 14 dias do procedimento cirúrgico e pós-aplicação do laser. Observou-se que do ponto de vista clínico, biométrico e histológico, as feridas tratadas com laser demonstraram processo de reparação bem diferenciados caracterizado por reparação mais rápida clinicamente. A contração também era maior nas feridas experimentais. Histologicamente, o processo de reparação apresentou-se mais acelerado, caracterizado pela velocidade de epitelização das feridas. Tanto do ponto de vista clínico, biométrico e histológico os resultados foram mais significativos para o tempo de 3 dias no grupo II. As lesões experimentais e controles estavam sob todos os aspectos completamente reparadas aos 14 dias, sem evidências de efeitos indesejáveis do Laser.

A utilização da terapia fotodinâmica no processo de reparo de feridas cutâneas tem sido utilizada mais recentemente com resultados promissores e esta nova opção terapêutica foi estudada por Espinosa (1999). Tal experimento foi realizado em ratos os quais foram tratados com Laser de 635 nm ou o Laser de 904nm, associados ou não ao azul de metileno (100 µmg/mL), tendo como controle as feridas não tratadas. O autor observou que os eventos biológicos foram mais evoluídos nos grupos tratados com Laser e pela terapia fotodinâmica. Porém os eventos biológicos foram mais evidentes no grupo tratado com azul de metileno e

Laser com 635 nm e, por ordem decrescente, nas tratadas com azul de metileno e Laser com 904 nm, Laser de 635 nm e Laser de 904 nm.

Shibli et al. (2003) realizaram um estudo em cães para avaliarem o tratamento da periimplantite quando tratada pela terapia fotodinâmica letal seguida de regeneração óssea guiada. Os autores utilizaram 4 diferentes superfícies de implantes, titânio puro, plasma spray de titânio, hidroxiapatita cristalina e híbrido, com pescoço polido e corpo revestido com ataque ácido. A periimplantite foi induzida por dois meses e após remoção da ligadura e desenvolvimento da periimplantite crônica por 12 semanas os cães foram tratados com debridamento mecânico e posterior fotossensibilização letal tendo como corante o azul de toluidina O com concentração de 100 µg/mL associada ao Laser diodo de 685 nm depositando na área uma densidade energética de 200 J/cm² e, após terapia realizaram a regeneração tecidual guiada. Os autores concluíram o estudo relatando que o tratamento da periimplantite com a fotossensibilização letal obtiveram uma significativa formação óssea quando associada a regeneração tecidual guiada e os resultados devem ser investigados em outros estudos.

Silva Neto (2004) com o propósito de avaliar histologicamente e morfometricamente o efeito do Laser isoladamente ou combinado à droga fotossensibilizadora na reparação de feridas provocas no dorso de ratos diabéticos induzidos experimentalmente, utilizaram 60 animais divididos em 3 grupos de 20 animais cada um, que receberam o seguinte tratamento: Grupo I, também chamado de controle, as feridas não receberam nenhum tratamento; Grupo II, as feridas foram submetidas ao tratamento com Laser em baixa intensidade e o grupo III as feridas foram submetidas ao tratamento com azul de toluidina-O (100 µg/mL) seguida da aplicação do Laser de diodo semicondutor de Arseneto de Gálio e Alumínio com

comprimento de onda de 685 nm, operando no modo contínuo e em contato com as feridas. As feridas do grupo II e III foram irradiadas em 9 pontos, sendo que cada ponto recebeu 10 segundos de exposição, energia de 4,5 J, recebendo uma densidade energética de 25 J/cm² por ponto. Decorridos 4 e 10 dias de pós-operatório os animais em número de 10 para cada grupo foram sacrificados. Os resultados histológicos evidenciaram que houve um retardo nos eventos biológicos nos ratos diabéticos e que a aplicação do Laser mostrou-se efetiva na reparação de feridas cutâneas e a utilização da terapia fotodinâmica mostrou-se mais efetiva na cicatrização das feridas.

Lima (2004) estudou histologicamente em ratos, o processo de reparo de feridas cutâneas provocadas à frio e termicamente retardadas. As feridas foram tratadas com Laser de diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio com 685 nm de comprimento de onda e azul de toluidina-O (100 µg/mL) como agente fotossensibilizador. As feridas receberam uma densidade de energia de 3,375 J/cm², em contato com o aparelho operando em modo contínuo. No período de 3, 7 e 14 dias os animais foram sacrificados e os resultados histológicos, evidenciou que no grupo tratado com Laser e droga fotossensibilizadora promoveu uma maior diminuição do infiltrado inflamatório, aumento da diferenciação epitelial, aumento da deposição de colágeno e diminuição do tempo de reparo das feridas. O autor concluiu o estudo relatando que a associação do Laser com o agente fotossensibilizador atuou como coadjuvante no balanceamento dos efeitos indesejáveis em feridas retardadas.

A eficácia da terapia através do laser no reparo de feridas foi investigada recentemente por Woodruff et al. (2004) através de uma meta-análise que envolveu vários trabalhos, os quais tiveram seus dados computados e

codificados depois de separados por rigoroso critério de inclusão e exclusão. A proposta principal do trabalho foi o de agregar a literatura pertinente para determinar o efeito global da terapia a Laser sobre o processo de reparo. O objetivo secundário foi o de elucidar questões que podem ser úteis para pesquisadores e clínicos no desenvolvimento de bases terapêuticas efetivas. Os trabalhos foram obtidos de diversas fontes, sendo que os critérios de inclusão estabelecidos foram, o tipo de Laser e definição do comprimento de onda utilizado, a utilização do Laser como única fonte de variação e pelo menos um índice de reparo de feridas como, conteúdo colágeno e tempo de cicatrização, identificados como uma variável independente, associados ao tempo utilizado de tratamento, na tentativa de incrementar o reparo tecidual, contração da área, aceleração do processo inflamatório e prevenção da necrose. Os autores concluíram o estudo relatando que a terapia a laser de baixa energia é uma modalidade efetiva no reparo de feridas sendo que os resultados do tratamento varia com os parâmetros utilizados como: potência, densidade de potência, comprimento de onda, perfil do feixe, energia, densidade de energia, número , frequência e duração do tratamento, tendo como o único parâmetro de tratamento com previsibilidade do efeito é a densidade de energia.

Podemos observar diante do exposto, que a terapia fotodinâmica tem apresentado resultados promissores tanto na redução bacteriana como na reparação tecidual, no entanto, a sua avaliação sobre a terapia periodontal é inexistente e desta forma, constitui propósito do presente estudo, avaliar o efeito da associação do azul de metileno com o Laser de diodo no comprimento de onda de 685 nm na evolução da doença periodontal induzida em ratos.

Proposição

*“Homem pobre não é aquele sem um centavo,
mas aquele sem sonho.”
(Harry Kemp 1883-1960)*

3 Proposição

Diante do exposto, constitui propósito do presente trabalho, analisar do ponto de vista histológico, o efeito da terapia fotodinâmica através da associação do azul de metileno com o Laser de diodo de 685 nm, sobre a evolução da doença periodontal induzida em ratos.

Material e Método

*“Todos os homens, por natureza,
desejam saber”
(Aristóteles 385-322 a.C.)*

4 Materiais e Método

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, processo de nº 32/03, estando de acordo com as normas vigentes adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (anexo 1).

4.1 Animais

No presente estudo foram utilizados cento e vinte ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 180 a 220g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais apresentavam-se saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo cinco animais cada, separados de acordo com o grupo experimental e, alimentados com ração e água *ad libitum*.

4.2 Sedação e Anestesia

Inicialmente os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrado. Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 0,04ml/100g de Cloridrato de quetamina*

* Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA

e 0,02ml/100g de copazime (cloridrato de xilazina)** (Fig 1), aplicados intramuscular no *bíceps femoris* da pata direita. Nos casos em que não se obteve o necessário efeito do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

4.3 Indução da Doença Periodontal

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada (Fig. 2), a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula (Fig. 3). Com o auxílio de uma sonda (Fig. 4) e pinça modificada (Fig. 5 e 6), foi adaptado um fio de algodão número 24*** ao redor dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo, ao nível do sulco gengival e mantidos por meio de nós cirúrgicos (Fig. 7). Esta ligadura atuou como irritante gengival e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana (JOHNNSON, 1975).

** Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil

*** Corrente Algodão nº 10; Coats Corrente, SP, Brasil



Figura 1 - Anestésicos utilizados.

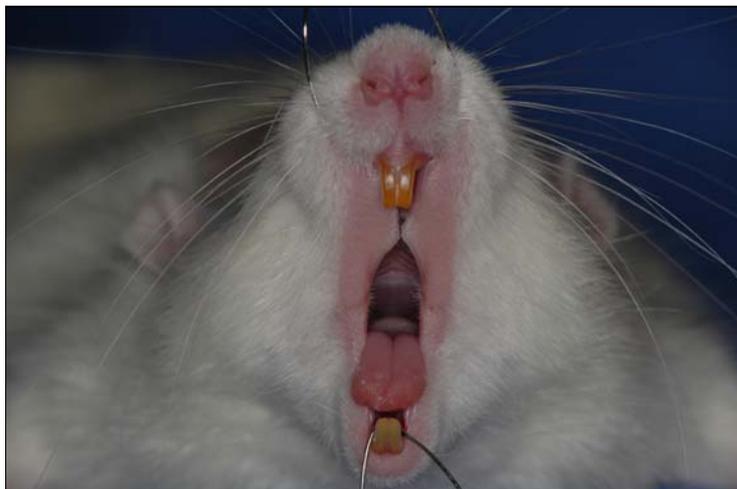


Figura 2 - Animal posicionado na mesa operatória.



Figura 3 - Dentes posteriores do animal.



Figura 4 - Sonda utilizada como auxiliar na passagem do fio.



FIGURA 5 - Figura da pinça modificada utilizada na passagem do fio.



FIGURA 6 - Posicionamento do fio na porção interproximal dos molares.



FIGURA 7 - Ligadura posicionada ao redor do primeiro molar inferior.

4.4 Grupos Experimentais

Logo após a colocação da ligadura, os ratos foram aleatoriamente distribuídos em um dos seguintes grupos experimentais:

Grupo I (n=30): não receberam nenhum tipo de tratamento local e ou sistêmico (C).

Grupo II (n=30): Os animais foram tratados com droga fotossensibilizadora (MB).

Grupo III (n=30): Os animais foram tratados com laser em baixa intensidade (LLT).

Grupo IV (n=30): Os animais foram tratados com droga fotossensibilizadora e a seguir, com laser em baixa intensidade (PDT).

4.5 Droga Fotossensibilizadora

Nos grupos II e IV foi utilizado o azul de metileno*, na dosagem de 100 microgramas/ml, depositando topicamente por meio de uma seringa de insulina 1 ml da droga fotossensibilizadora sobre o primeiro molar inferior esquerdo (Fig. 8), tomando o cuidado de depositar a droga de forma lenta e deixar a ponta ativa da agulha no espaço dente/tecido gengival por 60 segundos. No grupo III (Fig. 9) realizou-se a irradiação da superfície mesial do primeiro molar inferior com o Laser e, no grupo IV, após aplicação da droga aguardou-se 60 segundos para a irradiação da superfície mesial do primeiro molar inferior com o Laser, realizando desta forma a terapia fotodinâmica (PDT) (Fig. 10).



FIGURA 8 - Aplicação do Azul de Metileno.

* Aphoticário – Farmácia de Manipulação – Araçatuba, Brasil - SP.

4.6 *Laser*

O laser que foi utilizado no presente estudo, apresentava as seguintes características:

Emissor: Laser – Beam DR 500** (Fig. 11)

Meio ativador: arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl)

Comprimento de onda: 685 nm

Modo de operação: contínua ou interrompida

As áreas da superfície mesial dos primeiros molares dos grupos III e IV foram submetidas ao seguinte protocolo de tratamento:

Modo de operação: contínuo

Área do spot: 0,02 cm²

Modo de aplicação : contato, pontual e única

Tempo de exposição: 120 s

Potência da caneta: 0,05 W

Energia: 6 J

Densidade de energia: 4,5 J/ cm²

Intensidade de potência: 2,5 W/cm²

O laser foi aplicado uma única vez na porção mesial do dente relacionado tomando-se o cuidado de direcionar a ponteira laser de forma perpendicular ao longo eixo do dente e em contato com a área (Fig. 9).

**DR500 – Laser Beam – Rio de Janeiro, Brasil



FIGURA 9 - Aplicação do Laser.



FIGURA 10 - Aplicação do Azul de Metileno e o Laser (PDT).



FIGURA 11 - Aparelho utilizado.

Juliano Milanezi de Almeida

4.7 Períodos Experimentais

Nos grupos experimentais II, III e IV após dois dias da instalação da ligadura, realizou-se o tratamento preconizado para cada grupo experimental e aos 5, 15 e 30 dias após a colocação da ligadura, 10 ratos de cada grupo experimental (I, II, III, IV) foram sacrificados por meio de superdosagem anestésica. Logo após o sacrifício, a mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes. A fixação das peças foi realizada por um período mínimo de 48 horas em formol tamponado a 10%.



4.8 Processamento Histológico

Após as peças terem sido fixadas pelo período mínimo de 48 horas estas foram lavadas em água corrente por 12 horas para remoção do formol e, colocadas para descalcificação em solução de EDTA por um período de 8 semanas, com trocas semanais. Estando as peças suficientemente descalcificadas, estas foram aparadas, lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, com a face vestibular paralela ao plano de corte. Os cortes foram realizados no sentido méso-distal, com o cuidado de sempre estar no longo eixo do dente. Os cortes seriados com 6 µm de espessura foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina.

4.9 Avaliação Histológica

4.9.1 Análise Descritiva

Esta análise abrangeu a incidência e a descrição topográfica detalhada dos fenômenos histopatológicos ocorridos nos tecidos influenciados pela indução da doença periodontal, caracterizando cada variável experimental, realizada após seleção das lâminas mais representativas de cada grupo e período experimental,

4.9.2 Análise Quantitativa

Para a análise quantitativa foi utilizado escore que se baseava na magnitude dos fenômenos histopatológicos dissociados ou associados (globais), que serão descritos a seguir.

Ao aspecto morfológico que lembrava a normalidade, foi atribuído o escore 1 e, à escala crescente das alterações patológicas presentes, foram considerados escores de 2 a 4, referindo-se os maiores valores sempre aos problemas patológicos mais graves.

Tecido Gengival

Na análise histopatológica da gengiva, considerou-se a aderência epitelial ou do tecido conjuntivo da gengiva na ausência do epitélio e o processo inflamatório presente, atribuindo-se os seguintes escores:

Aderência Epitelial ou Tecido Conjuntivo Gengival

- 1 – ao nível da junção cimento-esmalte;
- 2 – ligeiramente abaixo da junção cimento-esmalte;
- 3 – muito abaixo da junção cimento-esmalte;
- 4 – ausência de aderência

Intensidade do Processo Inflamatório (Agudo e Crônico)

- 1 – ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2 – pequeno número de células inflamatórias, até 10 células inflamatórias por campo com aumento de 400x;
- 3 – moderado número de células inflamatórias, de 10 a 50 células inflamatórias por campo com aumento de 400x;
- 4 – grande número de células inflamatórias, acima de 50 células inflamatórias por campo com aumento de 400x.

Na avaliação da intensidade do processo inflamatório, levamos em consideração o critério descrito por Wolfson; e Seltzer, (1975).

Extensão do Processo Inflamatório (Agudo e Crônico)

- 1 – ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2 – processo inflamatório restrito à lâmina própria da vertente interna do epitélio;
- 3 – processo inflamatório estendendo-se apicalmente à pequena porção do tecido conjuntivo subjacente à lâmina própria da vertente interna do epitélio gengival;

4 – processo inflamatório atingindo a proximidade da crista óssea alveolar.

Ligamento Periodontal

Inserção das Fibras Periodontais

1 – inserção osso-cimento, em toda a extensão do ligamento;

2 – inserção osso-cimento em 2/3 da extensão do ligamento;

3 – inserção osso-cimento em 1/3 da extensão do ligamento;

4 – ausência de inserção.

Intensidade do Processo Inflamatório (Agudo e Crônico)

1 – ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;

2 – pequeno número de células inflamatórias, até 10 células inflamatórias por campo com aumento de 400x;

3 – moderado número de células inflamatórias, de 10 a 50 células inflamatórias por campo com aumento de 400x;

4 – grande número de células inflamatórias, acima de 50 células inflamatórias por campo com aumento de 400x.

Extensão do Processo Inflamatório (Agudo e Crônico)

- 1 – ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2 – processo inflamatório apenas no ligamento periodontal próximo à crista óssea alveolar;
- 3 – processo inflamatório atingindo também o 1/3 médio do ligamento periodontal da raiz do dente;
- 4 – processo inflamatório presente em todo o ligamento periodontal.

Superfície Radicular

Reabsorções Radiculares a Níveis, Cervical e da Crista

Óssea

Na análise da superfície radicular analisou-se a superfície radicular que se apresentava abaixo da aderência epitelial ou do tecido conjuntivo gengival. Foi considerada reabsorção radicular ativa a área de reabsorção que evidenciou a presença de células multinucleadas. Como reabsorção radicular inativa considerou-se a área de reabsorção que não apresentou células multinucleadas.

O local das reabsorções cervicais foi considerada sempre a área junto à aderência epitelial ou do tecido conjuntivo gengival. A magnitude das reabsorções

foram avaliadas através das reabsorções nos sentidos longitudinais e de profundidade da seguinte forma:

- 1 – ausência de reabsorção;
- 2 – pequena (s) áreas (s) de reabsorção;
- 3 – moderada (s) áreas (s) de reabsorção;
- 4 – grande (s) áreas (s) de reabsorção.

Reparação dos Áreas de Reabsorções

- 1 – reparação total – preenchimento por tecido duro de toda a área reabsorvida, ou ausência de reabsorção;
- 2 – reparação moderada – reparação de metade da área de reabsorção;
- 3 – reparação pequena – reparação de menos da metade da área reabsorvida;
- 4 – ausência de reparação.

Tecido Ósseo

Reabsorções Ativa e Inativa

Tanto as áreas de reabsorção ativa quanto as áreas inativas do tecido ósseo, foram avaliadas usando-se o mesmo critério empregado para as reabsorções radiculares, ou seja:

- 1 – ausência de reabsorção;
- 2 – pequena (s) áreas (s) de reabsorção;
- 3 – moderada (s) áreas (s) de reabsorção;
- 4 – grande (s) áreas (s) de reabsorção.

4.10 Análise Estatística

Sobre os escores atribuídos aos fenômenos histopatológicos das alterações na evolução da doença periodontal induzida em ratos no Tecido Gengival ("Aderência do Tecido Conjuntivo Gengival"; Intensidade da Inflamação Gengival Aguda"; Extensão da Inflamação Gengival Aguda"; "Intensidade da Inflamação gengival Crônica"; "Extensão da Inflamação Gengival Crônica"), Ligamento Periodontal ("Inserção do Ligamento Periodontal"; "Intensidade da Inflamação

Aguda no Ligamento Periodontal"; "Extensão da Inflamação Aguda no Ligamento Periodontal"; "Intensidade da Inflamação Crônica no Ligamento Periodontal"; Extensão da Inflamação Crônica no Ligamento Periodontal) na Superfície Radicular ("Reabsorção Radicular Ativa"; "Reabsorção Radicular Inativa com Reparo"; "Reabsorção Radicular Inativa sem Reparo"; "Reabsorção Cervical Ativa"; "Reabsorção Cervical Inativa com Reparo"; "Reabsorção Cervical Inativa sem Reparo") e no Tecido ósseo ("Reabsorção Ativa do Tecido Ósseo"; "Reabsorção Inativa do tecido Ósseo") foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,05, na comparação entre os grupos experimentais (GI,GII,GIII e GIV) e entre os períodos experimentais de 5, 15 e 30 dias. No caso de $p < 0,05$ a comparação entre os postos médios dos escores em cada grupo e em cada período foi efetuada através do teste de Kruskal-Wallis adotando-se como nível de significância o valor de 0,05. Para análise dos escores foi utilizado o programa computacional Bioestat*.

* Bioestat 1998, Windows 1995, Manaus, AM, Brasil

Resultados

*“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais
voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein 1891-1980)*

5 – Resultados

5.1 Análise Histológica Descritiva

Grupo Controle (G I):

No período pós-operatório de 5 dias (Figs. 12, 12a e 12b), foram aproveitados quatro espécimes. Houve aderência do tecido conjuntivo gengival ao cimento um pouco abaixo da junção cimento esmalte em dois casos, enquanto que nos restantes essa aderência ocorreu mais abaixo. Infiltrado inflamatório, do tipo agudo, ocorreu apenas em 1 caso e estava restrito à lâmina própria da vertente interna do epitélio. Infiltrado inflamatório, do tipo crônico ocorreu nos 4 espécimes sendo 3 de intensidade e extensão pequena, e um moderado.

O ligamento periodontal exibiu inserção óssea-cementária em 2/3 de sua extensão em 3 espécimes, enquanto que no último caso isso ocorreu em apenas 1/3. Não foi observada a presença de neutrófilos, contudo, células da série crônica estavam presentes nos 4 espécimes, sendo em pequena quantidade e localizadas próximas à crista óssea em 3 casos e em quantidade moderada atingindo o 1/3 médio do ligamento em 1 espécime.

Reabsorções radiculares não ocorreram, mas tão somente uma pequena área de reabsorção inativa a nível cervical em 1 espécime. Por outro lado, o tecido ósseo exibiu pequena área de reabsorção ativa em 2 casos, 1 moderado e

a outra grande nos espécimes restantes. Reabsorções ósseas inativa e de pequena magnitude foi notada em 1 caso.

No período de pós-operatório de 15 dias (Figs. 13, 13a e 13b), ocorreu presença de infiltrado neutrofílico, de pequena intensidade e extensão em apenas 2 casos. Infiltrado inflamatório, do tipo crônico de pequena magnitude e extensão foi observado em 2 espécimes. Em 1 caso esse infiltrado era intenso e atingia a crista óssea alveolar. Em 4 dos 5 espécimes a aderência do tecido conjuntivo gengival ocorreu muito abaixo da junção cimento-esmalte.

O ligamento periodontal exibiu inserção em toda sua extensão em 4 casos e não exibiu infiltrado inflamatório em nenhum dos espécimes analisados.

Não foram observadas áreas de reabsorção radicular, mas tão somente 4 ocorrências de reabsorção cervical de pequena magnitude, sendo 1 ativa e 3 inativas. Área pequena ou moderada de reabsorção óssea ativa foi observada em 2 casos.

Aos 30 dias (Figs. 14, 14a e 14b), os 5 espécimes exibiram aderência do tecido conjuntivo gengival muito abaixo da junção cimento-esmalte. Não se observou infiltrado neutrofílico mas tão somente infiltrado crônico de pequena a moderada intensidade e extensão.

O ligamento periodontal estava inserido em toda a sua extensão em 3 espécimes e em seus 2/3 em 2 casos. Não se observou infiltrado neutrofílico, mas tão somente um pequeno infiltrado crônico próximo à crista óssea em 1 caso.

Quanto às reabsorções dos dentes, observou-se as cervicais do tipo inativa e seu reparo em todos os espécimes analisados. O tecido ósseo, por sua vez exibiu apenas 2 casos de pequena área de reabsorção ativa.

Os escores atribuídos aos diferentes eventos histomorfológicos, em todos os espécimes e tempos pós-operatórios analisados, estão contidos no quadro 1 (Anexo 2).

Grupo Controle 5 dias

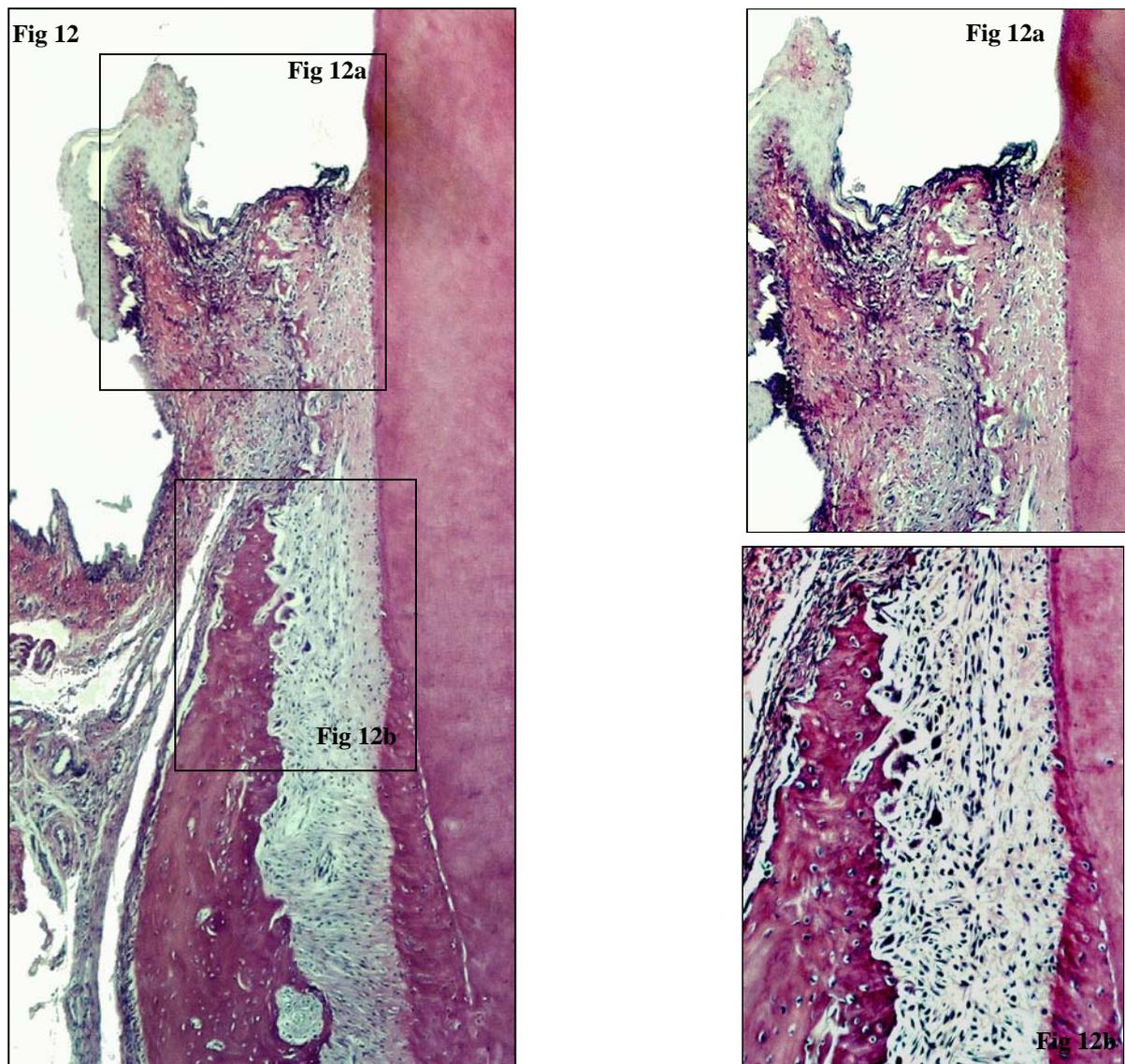


Figura 12 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.

Figura 12a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival com infiltrado inflamatório do tipo agudo. H.E. Aumento original 100x.

Figura 12b – Aumento da figura 12, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar à esquerda resíduos da crista óssea reabsorvida, Ligamento Periodontal desorganizado. H.E. Aumento original 100x.

Grupo Controle 15 dias

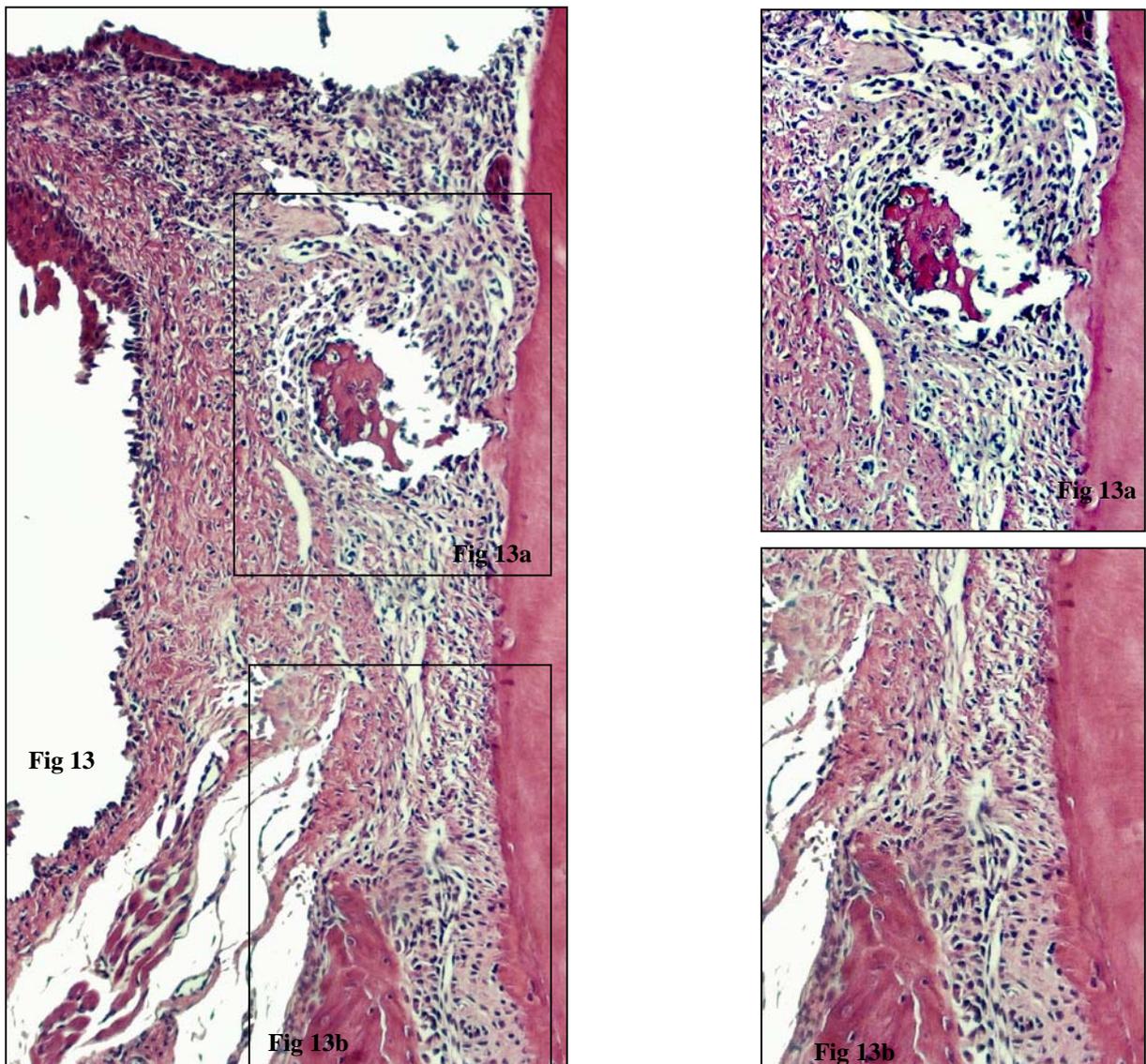


Figura 13 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.

Figura 13a – Detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido à raiz do dente com infiltrado inflamatório do tipo crônico. Notar no centro partícula de tecido ósseo necrosado. H.E. Aumento original 100x.

Figura 13b – Aumento da figura panorâmica, detalhe do ligamento periodontal desorganizado na crista óssea e reabsorções ativas do cimento e osso alveolar. H.E. Aumento original 100x.

Grupo Controle 30 dias

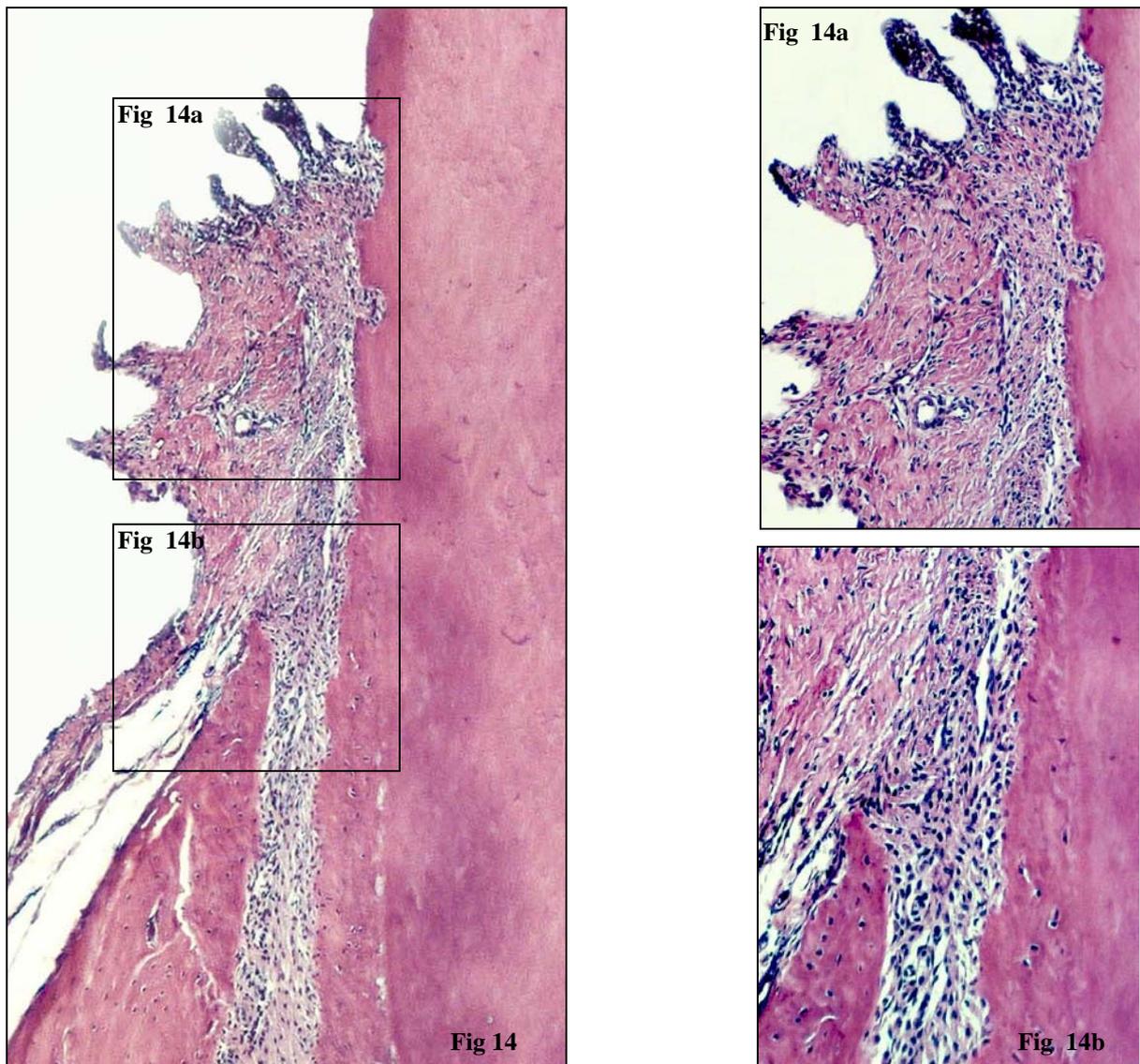


Figura 14 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção radiculares, óssea e cervical. H.E. Aumento original 40x.

Figura 14a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival e reabsorções inativas. H.E. Aumento original 100x.

Figura 14b – Aumento da figura 14, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar à esquerda crista óssea reduzida e ligamento periodontal desorganizado. H.E. Aumento original 100x.

Grupo Experimental Azul de Metileno (G II):

Aos 5 dias (Figs. 15, 15a e 15b), notou-se que nos 5 espécimes o tecido conjuntivo gengival mostrava-se aderido ao cimento levemente abaixo da linha cimento-esmalte. Neutrófilos foram visualizadas em apenas 1 caso em pequena quantidade e restritos à proximidade do epitélio. Por outro lado, infiltrado inflamatório do tipo crônico foi observado em 4 casos, sendo de pequena intensidade e extensão em 3 espécimes e moderada intensidade em 1 espécime.

O ligamento periodontal exibiu-se parcialmente inserido nos 5 espécimes, abrangendo 1/3 da extensão em 2 casos, e 2/3 nos restantes. Células inflamatórias ocorreram em pequena quantidade em 4 dos espécimes, atingindo o 1/3 médio do ligamento em 2 casos.

Reabsorção radicular foi evidenciada em apenas 1 espécime, sendo ativa e de pequena magnitude. Reabsorções cervicais foram presenciadas em 3 casos, todas de pequenas dimensões, sendo 1 ativa e 2 inativas. O tecido ósseo exibiu reabsorções ativas de pequena a grande dimensão em 4 dos espécimes analisados.

Aos 15 dias (Figs. 16, 16a e 16b), foram examinados 4 dos 5 espécimes previstos. A aderência do tecido conjuntivo gengival ocorreu muito abaixo da junção cimento-esmalte. O tecido conjuntivo do local exibia-se isento de processo inflamatório, exceção feita em apenas um dos espécimes que possuía apenas poucas células inflamatórias do tipo crônica.

O ligamento periodontal estava inserido em toda a extensão da raiz que apresentava tecido ósseo. Além disso, não exibiu infiltrado inflamatório.

Foram observadas reabsorções cervicais em 3 espécimes ativa e 1 inativa. Além disso, foram observadas em outro espécime pequenas reabsorções cervicais em reparação, exibindo delgada camada de cimento neoformado. O tecido ósseo, por sua vez exibiu pequena área de reabsorção ativa em 1 caso e pequenas reabsorções inativas em outros 2 casos.

Aos 30 dias (Figs. 17, 17a e 17b), a aderência do tecido conjuntivo gengival ocorreu muito abaixo da junção cimento-esmalte em 4 casos, sendo que em 1 espécime ela estava apenas um pouco abaixo desse limite. Nessa área não foi visualizado infiltrado inflamatório neutrofilítico, mas do tipo crônico e de pequena intensidade e extensão em 3 casos e grande em outro.

O ligamento periodontal estava bem inserido em 3 casos e inserido em apenas 2/3 de sua extensão em outro. Além disso, não foi visualizado infiltrado inflamatório em 4 casos, enquanto que 1 dos espécimes exibiu apenas pequeno e pouca extensão do infiltrado inflamatório do tipo crônico.

Reabsorções cervicais inativas foram observadas em 4 casos, sendo 3 consideradas de grande magnitude, 1 de pequena com deposição de delgada camada de cimento. Reabsorções radiculares foram detectadas em 2 casos, sendo uma inativa sem reparação e outra também inativa, com pequena reparação. O tecido ósseo exibiu reabsorção de pequeno porte em 2 espécimes, uma ativa e outra inativa.

Os escores atribuídos aos diferentes eventos histomorfológicos, em todos os espécimes e tempos pós-operatórios analisados, estão contidos no quadro 2 (Anexo 3).

Azul de Metileno 5 dias

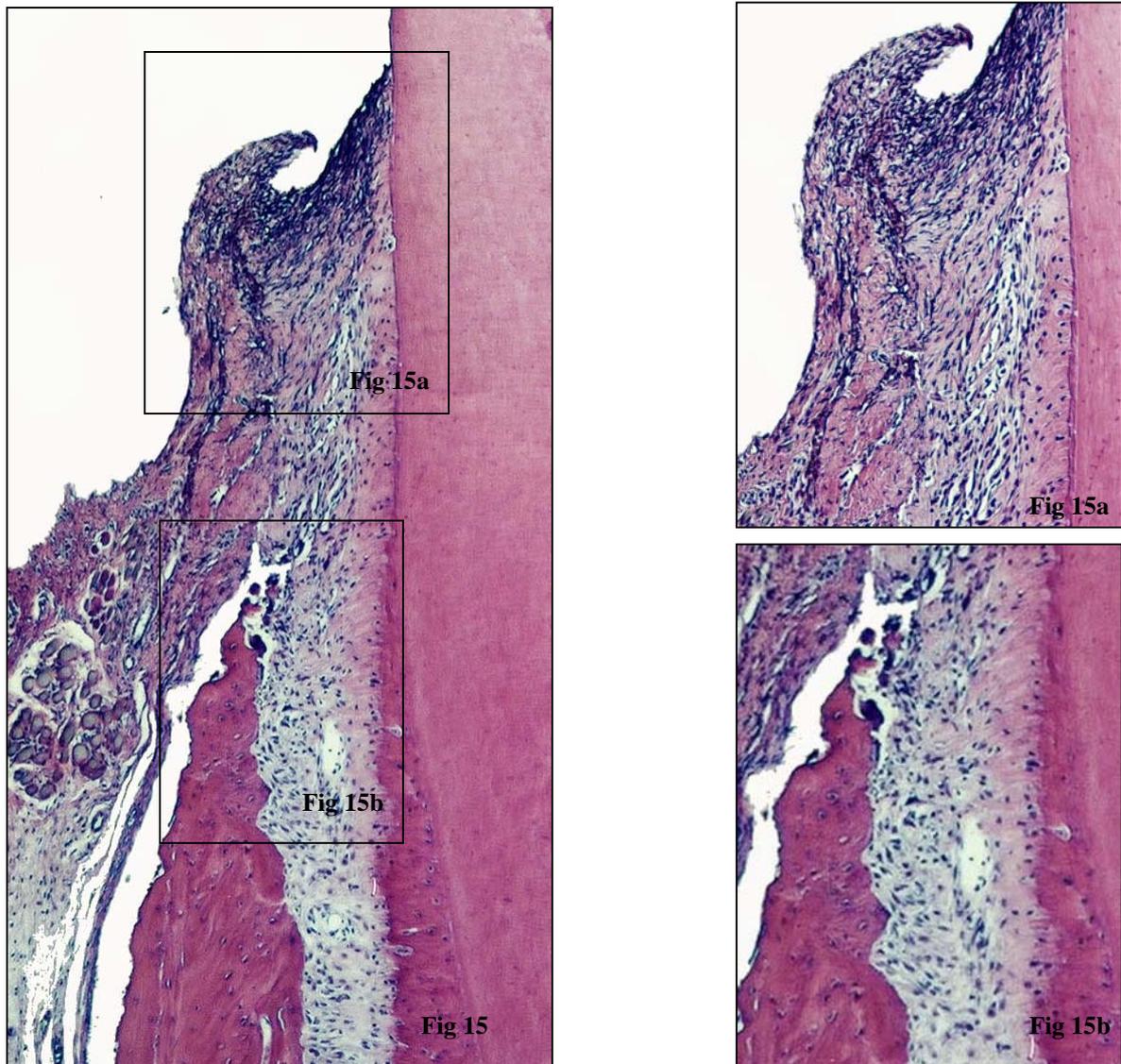


Figura 15 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, dente, ligamento periodontal e tecido ósseo. H.E. Aumento original 40x.

Figura 15a – Aumento da figura anterior, detalhe da tecido conjuntivo gengival com infiltrado inflamatório do tipo crônico e sua aderência no cemento. H.E. Aumento original 100x.

Figura 15b – Aumento da figura panorâmica, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar crista óssea reabsorvida e ligamento periodontal desorganizado. H.E. Aumento original 100x.

Azul de Metileno 15 dias

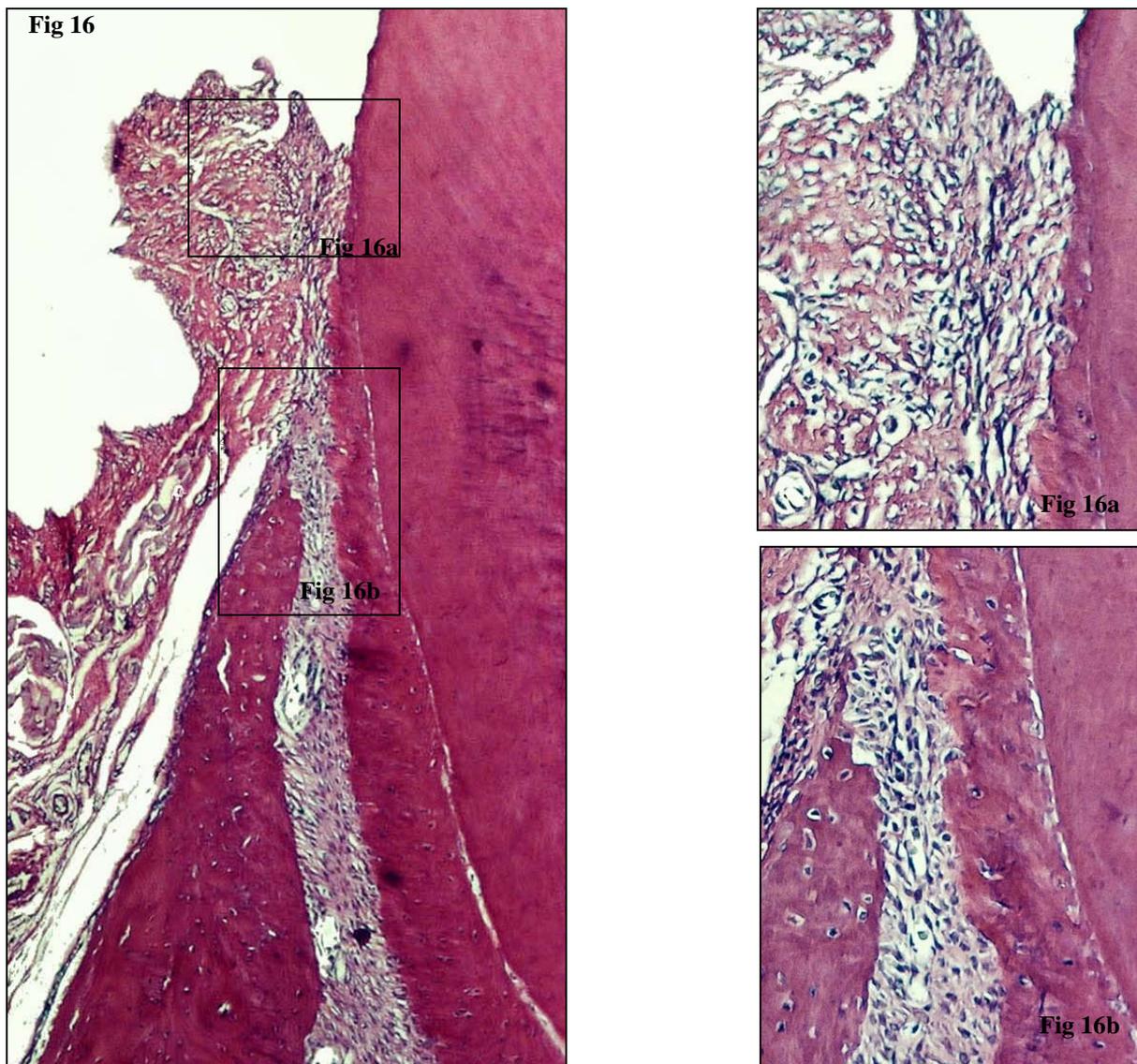


Figura 16 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal, cimento e osso alveolar. H.E. Aumento original 40x.

Figura 16a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival e sua aderência no cimento. H.E. Aumento original 100x.

Figura 16b – Aumento da figura panorâmica, detalhe da área do ligamento periodontal. Notar à esquerda área de reabsorção inativa na crista óssea. H.E. Aumento original 100x.

Azul de Metileno 30 dias

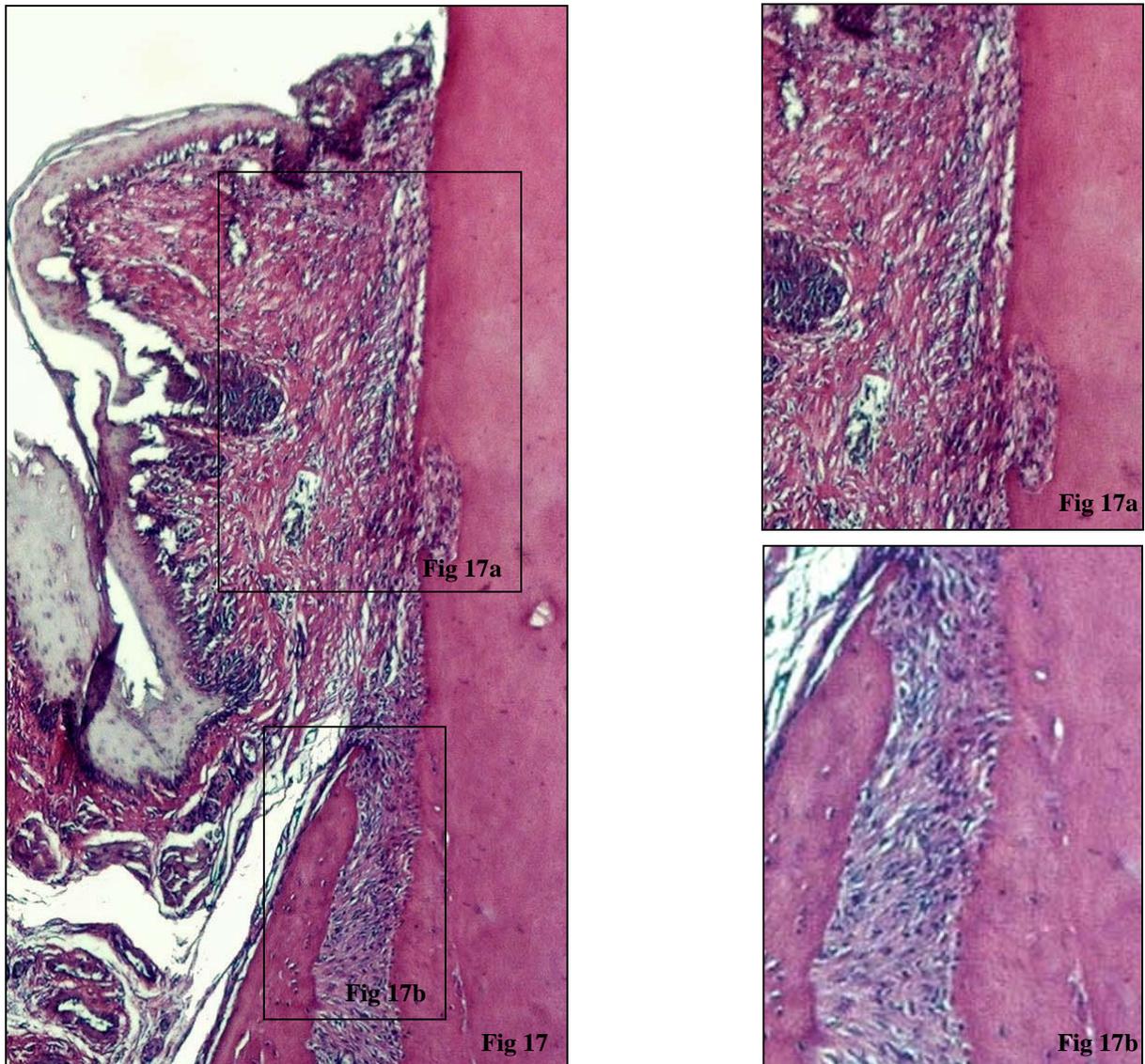


Figura 17 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival aderido um pouco abaixo da JCE, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea e cervical inativa. H.E. Aumento original 40x.

Figura 17a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival e reabsorções cervicais inativas com pequenas deposições de cimento. H.E. Aumento original 100x.

Figura 17b – Aumento da figura 17, detalhe da crista óssea com reabsorção inativa e ligamento periodontal aderido ao cimento. H.E. Aumento original 200x.

Grupo Experimental Laser (G III):

Neste grupo foram estudados 4 espécimes no período de pós-operatório de 5 dias (Figs 18, 18a e 18b). A aderência do tecido conjuntivo gengival ocorreu um pouco abaixo do limite da junção cimento-esmalte em 3 casos e esteve ausente em outro. Este último espécime exibiu intenso e extenso infiltrado inflamatório neutrofílico aliado a moderada quantidade de células da série crônica. O infiltrado neutrofílico estendeu-se pelo ligamento periodontal. Em um espécime havia pequeno infiltrado inflamatório neutrofílico. Moderado a pequeno infiltrado inflamatório do tipo crônico foi identificado em todos os casos do período experimental de 5 dias.

O ligamento periodontal dos espécimes exibiram-se com inserção parcial em todos os espécimes, os quais mostravam-se infiltrados por poucas células da série crônica e por neutrófilos em 1 dos casos.

Reabsorção cervical foi notada somente em 1 caso, sendo do tipo ativa de moderada magnitude. O mesmo ocorreu em relação à reabsorção radicular. Por outro lado, o tecido ósseo exibiu moderada e grande reabsorções ativas em 3 dos 4 espécimes analisados.

Aos 15 dias (Figs. 19, 19a e 19b), observou-se que a aderência do tecido conjuntivo gengival se fazia abaixo da junção cimento-esmalte. Infiltrado inflamatório neutrofílico de pequena intensidade e extensão foi notado em 1 caso. Por outro lado, nos 5 casos analisados havia infiltrado inflamatório do tipo crônico, geralmente de moderada intensidade e grande extensão.

O ligamento periodontal estava parcialmente inserido em todos os casos e exibiu infiltrado inflamatório de pequena intensidade e extensão em 3 espécimes.

Reabsorção radicular foi visualizada em apenas 1 espécime sendo ativa e de moderada magnitude. Foi observado, em relação à reabsorção cervical, dois casos de reabsorção ativa e igual número de reabsorção inativa. O tecido ósseo exibiu pequenas áreas de reabsorções ativas em 4 espécimes e uma grande área de reabsorção inativa em 1 caso.

Aos 30 dias (Figs. 20, 20a e 20b), notou-se aderência do tecido conjuntivo abaixo da junção cimento-esmalte em todos os espécimes. Em 3 desses casos essa aderência ocorreu junto à dentina exposta por reabsorção cervical. Em todos esses casos havia presença de infiltrado inflamatório do tipo crônico que podia ser de pequena à grande intensidade e extensão.

O ligamento periodontal exibiu inserção em toda sua extensão em 3 casos e em 2/3 em 2 espécimes. Infiltrado inflamatório ocorreu apenas do tipo crônico e de pequena intensidade em 2 espécimes.

Reabsorções radiculares foram observadas em 2 casos, sendo inativas e de pequenas dimensões. Reabsorções cervicais foram observadas em 3 espécimes, sendo 1 ativa de grande magnitude e 2 de tamanho moderado. O tecido ósseo, por sua vez, exibiu 2 casos com pequena área de reabsorção ativa e uma pequena área de reabsorção inativa em 1 desses mesmos casos.

Os escores atribuídos a todos os eventos histomorfológico, nos espécimes e períodos experimentais analisados, estão contidos no quadro 3 (Anexo 4).

Laser 5 dias

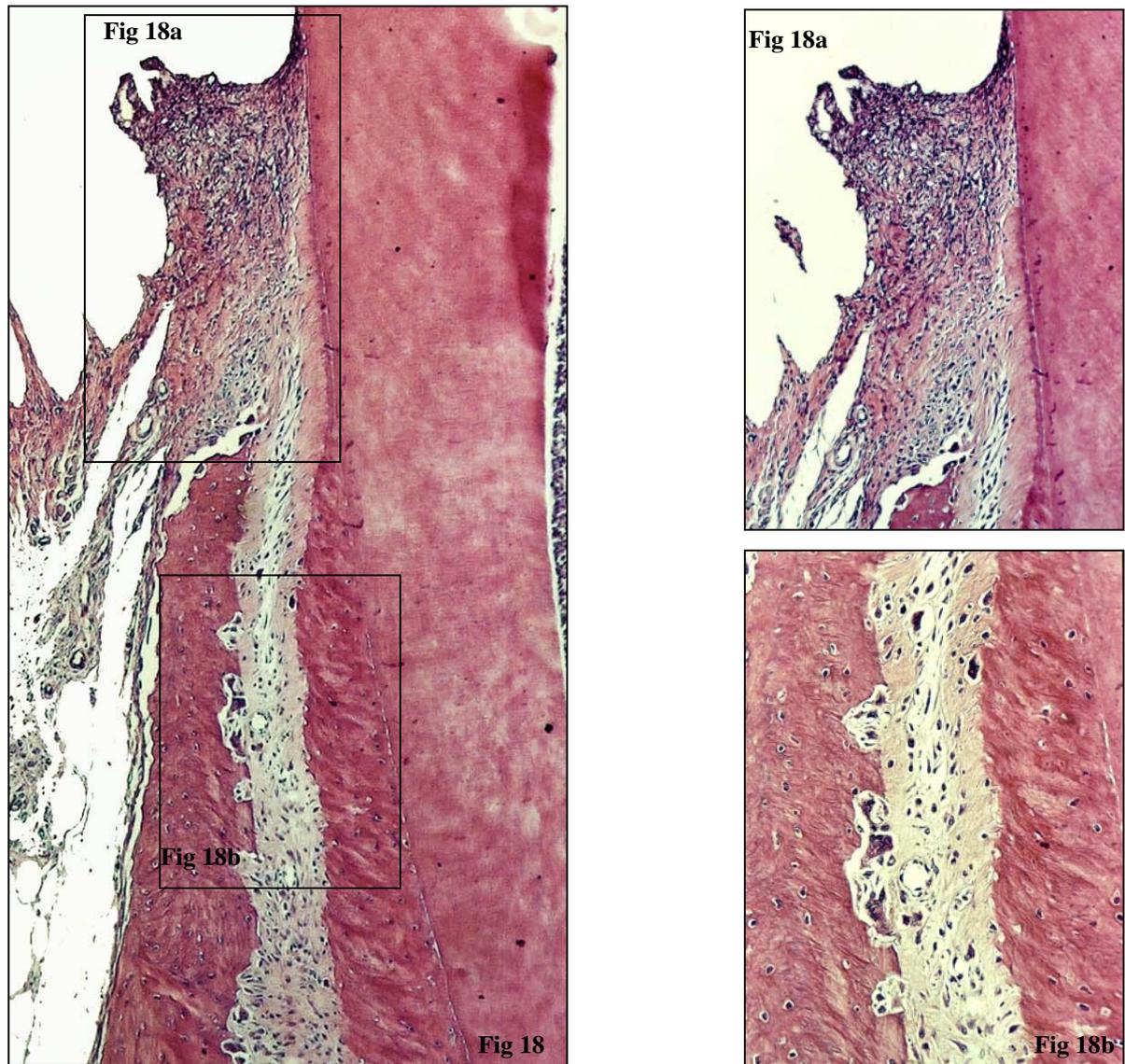


Figura 18 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival aderido ao cimento, ligamento periodontal e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.

Figura 18a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival com infiltrado inflamatório do tipo crônico. H.E. Aumento original 100x.

Figura 18b – Aumento da figura 18, detalhe da área de atividade osteoclástica à esquerda. H.E. Aumento original 200x.

Laser 15 dias

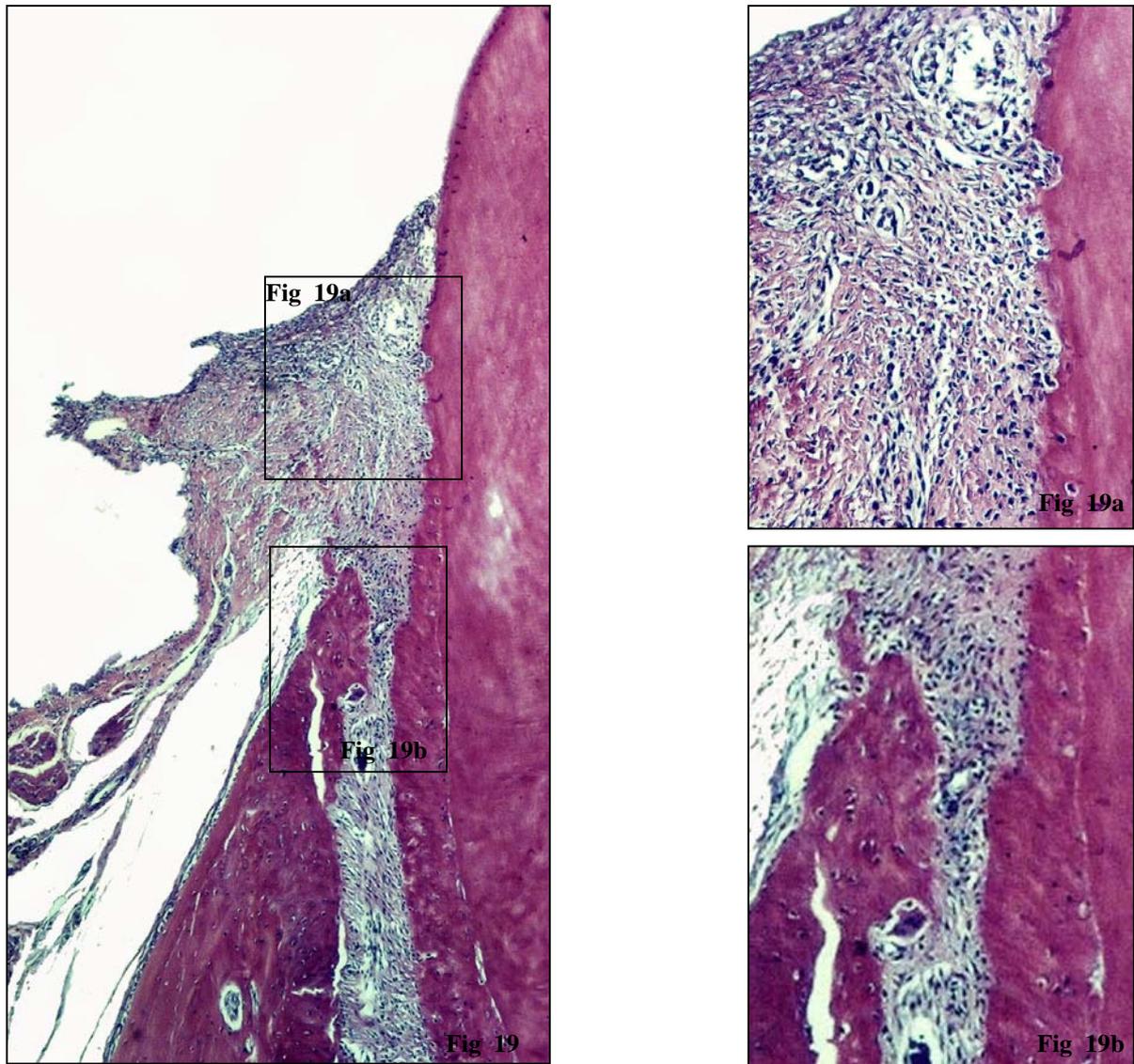


Figura 19 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal osso alveolar e área de reabsorção óssea ativa. H.E. Aumento original 40x.

Figura 19a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido a área de reabsorção ativa. H.E. Aumento original 100x.

Figura 19b – Aumento da figura 19, detalhe da área de atividade osteoclástica. Notar à esquerda a crista óssea reabsorvida, reabsorção cervical e cementárias ativas. H.E. Aumento original 100x.

Laser 30 dias

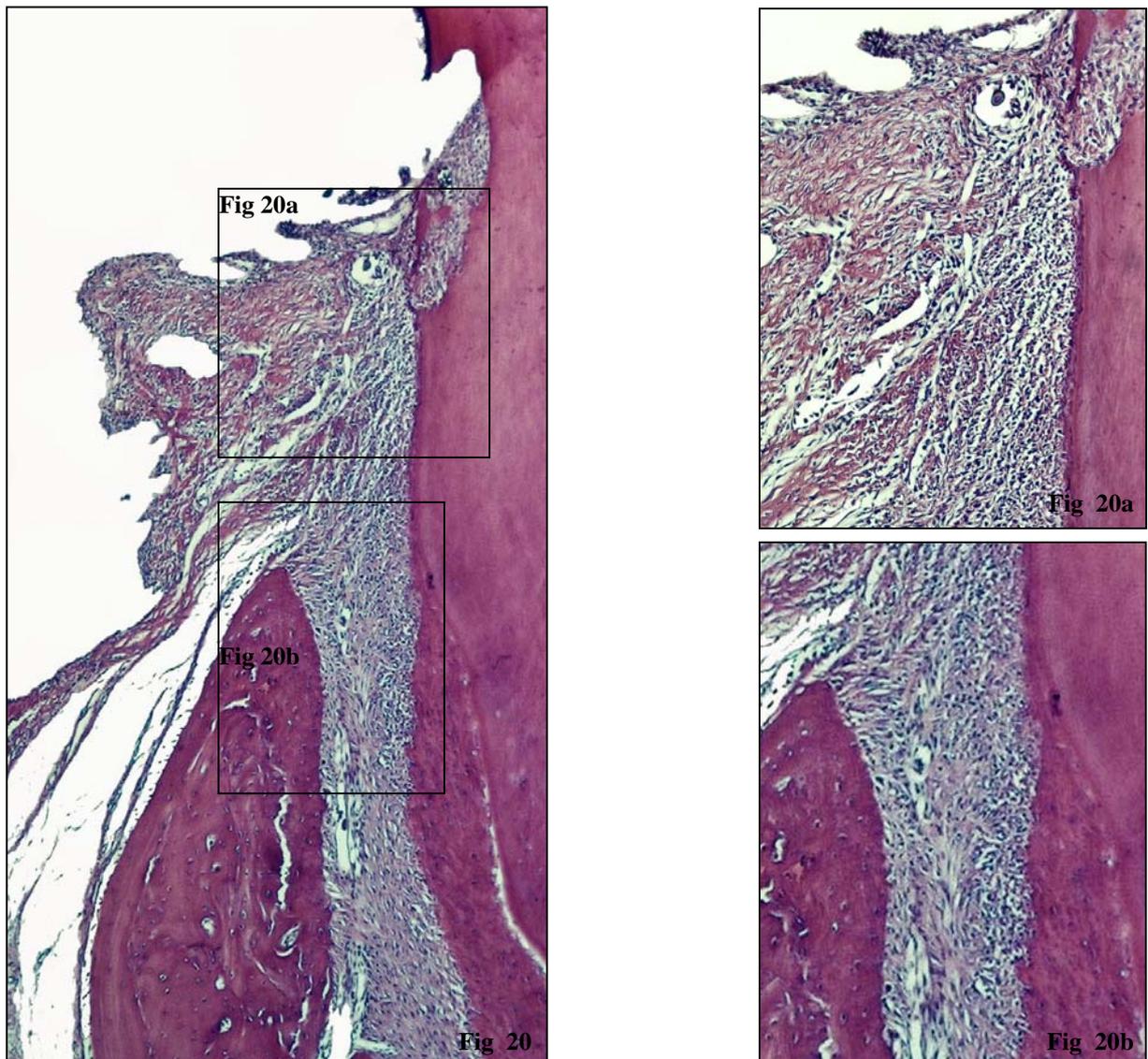


Figura 20 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e osso alveolar. H.E. Aumento original 40x.

Figura 20a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido ao cimento do dente e penetrando em área de reabsorção ativa. H.E. Aumento original 100x.

Figura 20b – Aumento da figura 21, detalhe do ligamento periodontal com pequeno infiltrado inflamatório do tipo crônico, e crista óssea íntegra. H.E. Aumento original 200x.

Grupo Experimental Azul de Metileno e Laser (G IV):

Aos 5 dias (Figs. 21, 21a e 21b), foram estudados 4 espécimes. Destes 1 exibiu aderência de tecido conjuntivo gengival na junção cimento-esmalte e outros 3 um pouco abaixo desse limite. Infiltrado inflamatório agudo de moderada intensidade e grande extensão foi vista em 1 espécime. Em 1 caso não observou-se infiltrado inflamatório. Em 3 espécimes ocorreu infiltrado inflamatório do tipo crônico sendo intenso e 1 caso e pequenos nos outros.

O ligamento periodontal exibiu inserção epitelial parcial nos 4 espécimes, infiltrado inflamatório agudo em 1 e crônico em 2. Reabsorções cervicais ativa ocorreu em 2 espécimes, sendo uma de pequena magnitude e outra moderada. Em outro espécime ocorreu reabsorção inativa pequena. Reabsorções ativas do tecido ósseo foram observadas em todos os espécimes sendo 3 de grande porte.

No período de 15 dias (Figs. 22, 22a e 22b), foram notados 4 casos de aderência do tecido conjuntivo gengival um pouco abaixo da junção cimento-esmalte. Em 1 caso a aderência ocorreu muito abaixo deste nível. Foi observada a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico, do tipo crônico de pequena intensidade em 3 casos a moderada em 2 casos.

O ligamento periodontal mostrou-se bem organizado e isento de infiltrado inflamatório em todos os casos.

Reabsorções cervicais inativas pequenas estavam presentes em 3 casos e de médio porte foi observada em apenas 1 caso. Reabsorção ativa, foi observada em 1 espécime.

Reabsorção radicular foi observada em 1 só caso, sendo inativa e de pequeno porte. Apenas 1 espécime mostrou reabsorção de tecido ósseo, que apresentou-se inativa e pequena. Em 2 espécimes notou-se necrose da polpa dental radicular com presença de microabscessos no ligamento periodontal periapical.

Aos 30 (Figs. 23, 23a e 23b), dias houve aderência do tecido conjuntivo gengival bem abaixo do limite cemento-esmalte em 3 casos e um pouco abaixo em 1 espécime. Infiltrado inflamatório do tipo agudo intenso e extenso foi notado em 1 caso. Por outro lado infiltrado inflamatório do tipo crônico de pequena ou média intensidade e extensão foi observada nos 5 casos.

O ligamento periodontal mostrou-se inserido em toda sua extensão em 3 casos e em 2/3 da extensão em 2 casos. Não foi observado infiltrado inflamatório agudo ou crônico em nenhum caso.

Foi notada pequena área de ativa reabsorção radicular em 1 espécime. O mesmo ocorreu em relação à reabsorção cervical. Contudo, reabsorções cervicais inativas de moderada (2 casos) e grande porte (1 caso), também foram notadas. O tecido ósseo, por sua vez, exibiu moderada (2 casos) e grande (1 caso) áreas de reabsorção ativa.

Os escores atribuídos aos diferentes eventos histomorfológicos, em todos os espécimes e período experimental analisados, estão contidos no quadro 4 (anexo 5).

Azul de Metileno e Laser 5 dias

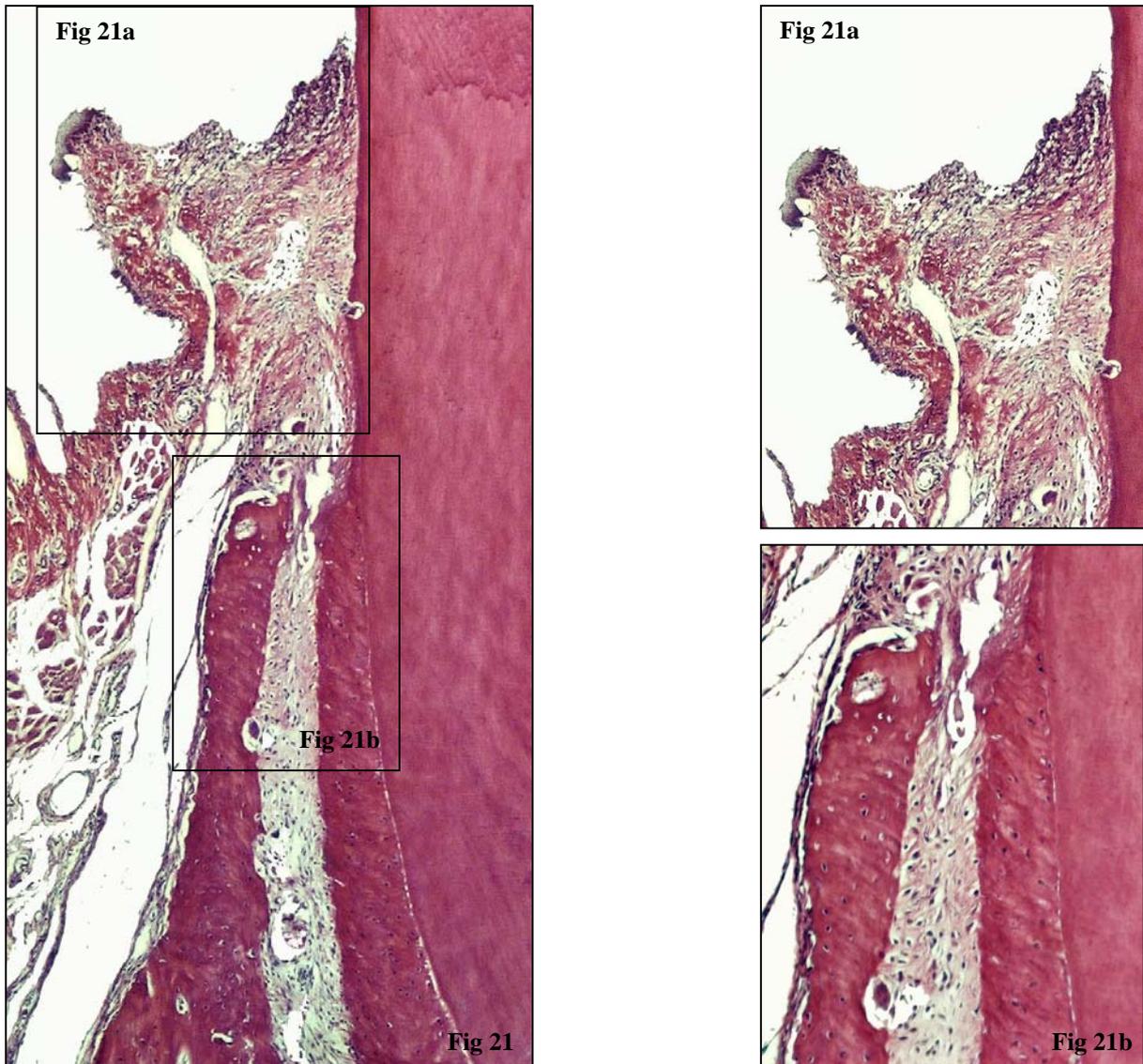


Figura 21 – Vista panorâmica mostrando dente, tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e tecido ósseo. H.E. Aumento original 40x.

Figura 21a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival isento de células inflamatórias e pequena área de reabsorção cervical do dente e do tecido ósseo. H.E. Aumento original 100x.

Figura 21b – Aumento da figura 23, detalhe da área do ligamento periodontal com reabsorção da crista óssea e alterações na sua organização do Ligamento Periodontal. H.E. Aumento original 200 x.

Azul de Metileno e Laser 15 dias

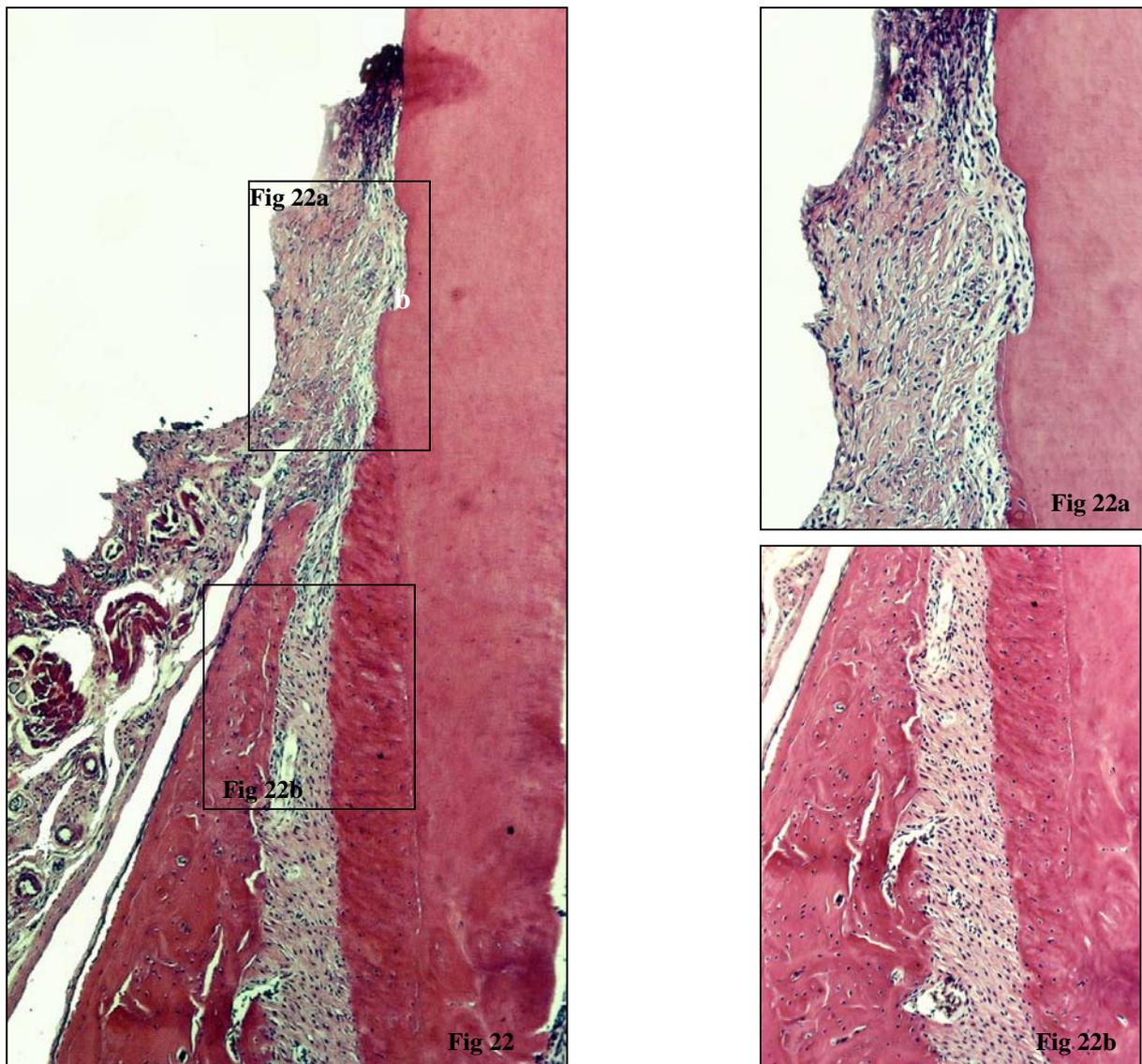


Figura 22 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal e área de reabsorção cervical inativa. H.E. Aumento original 40x.

Figura 22a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival aderido ao dente adentrando na área de reabsorção inativa. H.E. Aumento original 100x.

Figura 22b – Aumento da figura panorâmica, detalhe do ligamento periodontal bem organizado e isento de processo inflamatório. H.E. Aumento original 100x

Azul de Metileno e Laser 30 dias

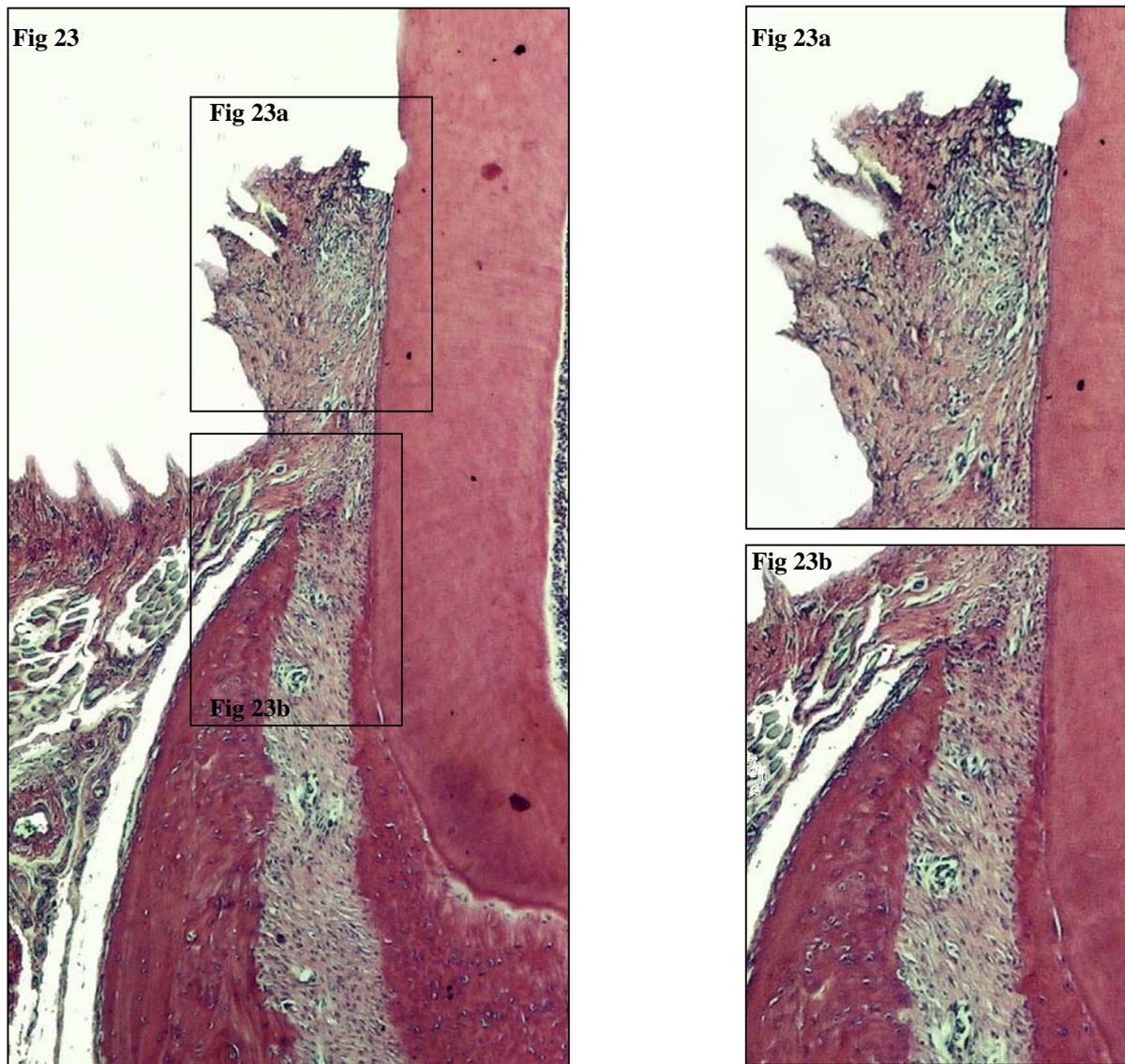


Figura 23 – Vista panorâmica mostrando tecido conjuntivo gengival, ligamento periodontal, cemento e tecido gengival. Notar a aderência do tecido conjuntivo a superfície radicular. H.E. Aumento original 40x.

Figura 23a – Aumento da figura anterior, detalhe do tecido conjuntivo gengival com infiltrado inflamatório do tipo crônico. H.E. Aumento original 100x.

Figura 23b – Aumento da figura panorâmica, detalhe da crista óssea sem reabsorção ativa e ligamento periodontal organizado. H.E. Aumento original 100x

5.2 Análise Quantitativa

Resultados Estatísticos

A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com nível de 5 % de significância, aplicado nos escores atribuídos em cada evento biológico estudado entre os períodos experimentais e entre cada grupo experimental estudado. A apresentação dos resultados estatísticos será subdividida neste capítulo em dois tópicos: 1) Análise comparativa dos escores atribuídos nos espécimes entre os períodos experimentais (5, 15 e 30 dias); 2) Análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos entre os grupos experimentais.

1. Análise comparativa dos escores atribuídos nos espécimes entre os períodos experimentais (5, 15 e 30 dias):

GRUPO I (controle)

Ao analisar os resultados estatísticos obtidos através do teste de Kruskal-Wallis com 5% de nível de significância pôde-se observar no grupo I que não ocorreu diferenças significantes entre os períodos experimentais (5, 15 e 30 dias) com relação aos escores atribuídos na análise do Tecido Gengival quanto a: “Aderência do Tecido Conjuntivo Gengival”, “Intensidade da Inflamação Gengival Aguda”, “Extensão da Inflamação Gengival Aguda”, “Intensidade da Inflamação Gengival Aguda” e “Extensão da Inflamação Gengival Crônica”.

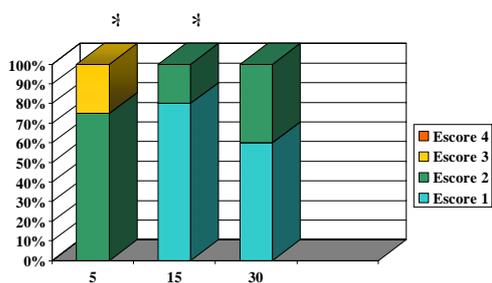
Juliano Milanezi de Almeida

Com relação à análise dos escores atribuídos no Ligamento Periodontal pode-se observar que não houve diferença estatística entre os períodos quando se avaliou os escores da intensidade de inflamação aguda e extensão da inflamação aguda no ligamento periodontal ($p > 0,05$). Por outro lado diferença estatisticamente significativa foi observada com relação à inserção do ligamento periodontal entre os períodos de 5 e 15 dias ($p = 0,0304$), demonstrando menor inserção do ligamento na superfície radicular no período de 5 dias pós operatório (Figura 24). Com relação à intensidade da inflamação crônica no Ligamento periodontal foram detectadas diferenças estatisticamente significante entre os períodos de 5 e 15 dias ($p = 0,0126$) e entre os períodos de 5 e 30 dias ($p = 0,0460$) demonstrando maior grau inflamação no período inicial de 5 dias (Figura 25). Ao avaliar a extensão da inflamação crônica no ligamento periodontal observou-se diferenças entre os períodos de 5 e 15 ($p = 0,0126$) e entre 5 e 30 dias ($p = 0,0460$) evidenciando maior extensão no período de 5 dias não havendo diferenças entre os períodos de 15 e 30 dias (Figura 26).

Na análise comparativa de reabsorção radicular ativa, inativa com reparo e inativa sem reparo, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os períodos experimentais estudados neste grupo. Por outro lado na análise comparativa de reabsorção cervical entre os períodos estudados houve diferenças estatísticas na reabsorção cervical inativa sem reparo demonstrando maior reabsorção no período de 30 dias quando comparado aos 5 dias ($p = 0,0248$) (Figura 27).

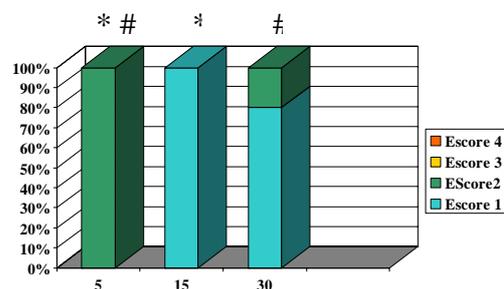
Na análise estatística dos escores atribuídos aos eventos biológicos envolvidos no tecido ósseo com relação a reabsorção ativa e inativa neste grupo não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos

experimentais estudados, demonstrando comportamento semelhante no grau de reabsorção óssea entre os períodos de 5, 15 e 30 dias ($p=0,0874$ e $p=0,2865$).



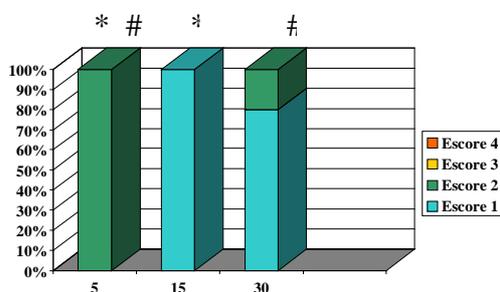
* p=0,0304

Figura 24 - Frequências (%) dos escores de Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5, 15 e 30 dias.



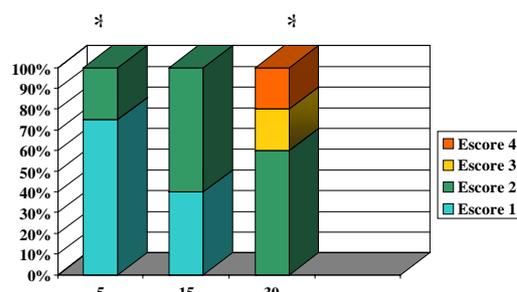
* p=0,0126 # p=0,0460

Figura 25 - Frequências (%) dos escores de Intensidade da inflamação crônica no Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5, 15 e 30 dias.



* p=0,0126 # p=0,0460

Figura 26 - Frequências (%) dos escores da Extensão da Inflamação crônica no Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5, 15 e 30 dias.



* p=0,0248

Figura 27 - Frequências (%) dos escores da Reabsorção Cervical inativa sem reparo atribuídos ao Grupo I nos períodos de 5, 15 e 30 dias.

GRUPO II

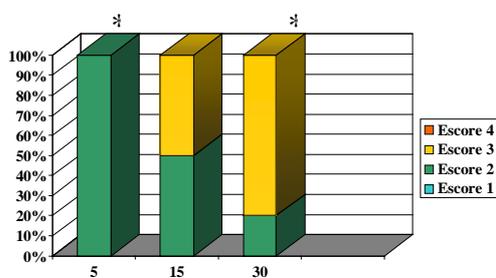
Ao analisar os resultados estatísticos obtidos através do teste de Kruskal-Wallis com 5% de nível de significância pode-se observar no grupo II que não ocorreram diferenças significantes entre os períodos experimentais com relação aos escores atribuídos na análise do tecido gengival quanto a: “Intensidade da Inflamação Gengival Aguda”; “Extensão da Inflamação Gengival Aguda”; “Intensidade da Inflamação Gengival Crônica” e “Extensão da Inflamação Gengival Crônica”. Entretanto com relação a aderência do tecido conjuntivo gengival foi observada diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de 5 e 30 dias ($p=0,0343$) demonstrando menor aderência gengival aos 30 dias (Figura 28).

Com relação à análise dos escores atribuídos no ligamento periodontal pode-se observar que não houve diferenças estatísticas entre os períodos quando se avaliou: intensidade de Inflamação aguda; extensão da inflamação aguda; extensão da inflamação crônica ($p>0,05$). Por outro lado diferenças estatisticamente significantes ocorreu com relação a inserção do ligamento periodontal entre os períodos de 5 e 15 dias ($p=0,0084$) (Figura 29), demonstrando menor inserção do ligamento na superfície radicular no período de 5 dias de pós operatório. Com relação à intensidade da inflamação crônica no ligamento periodontal foi detectada diferença estatisticamente significante entre os períodos de 5 e 15 dias ($p=0,0460$) (Figura 30), demonstrando maior grau de inflamação no período inicial de 5 dias.

Na análise comparativa da superfície radicular quanto a: Reabsorção Radicular Ativa; Reabsorção Radicular Inativa com Reparo e Inativa sem Reparo não houve diferenças estatisticamente significantes entre os períodos experimentais

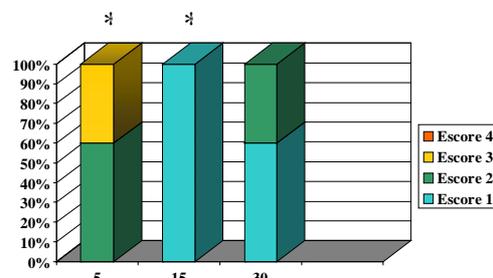
estudados neste grupo. Por outro lado na análise comparativa de reabsorção cervical entre os períodos estudados houve diferenças estatísticas na reabsorção cervical inativa sem reparo demonstrando maior reabsorção nos períodos de 30 dias quando comparado aos 5 e 15 dias ($p=0,0173$ e $p=0,0210$) (Figura 31).

Na análise estatística dos escores atribuídos aos eventos biológicos envolvidos no tecido ósseo com relação a: Reabsorção Ativa e Reabsorção Inativa neste grupo, apesar da análise descritiva demonstrar maior tendência a menor reabsorção óssea nos períodos de 15 e 30 dias, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos experimentais estudados, demonstrando comportamento semelhante no grau de reabsorção óssea entre os períodos de 5, 15 e 30 dias ($p=0,0587$ e $p=0,0666$).



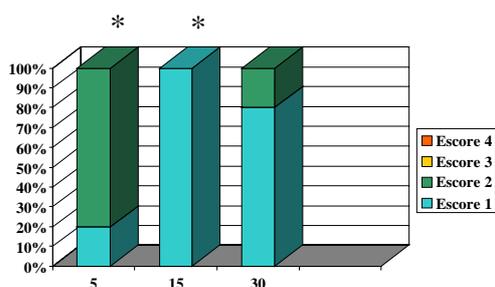
* p=0,0343

Figura 28 - Frequências (%) dos escores da Aderência Gengival atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5, 15 e 30 dias.



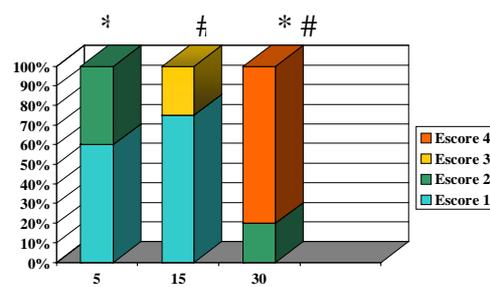
* p=0,0084

Figura 29 - Frequências (%) dos escores da Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5, 15 e 30 dias.



* p=0,0460

Figura 30 - Frequências (%) dos escores da Intensidade da Inflamação Crônica no Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5, 15 e 30 dias.



* p=0,0173 # p=0,0210

Figura 31 - Frequências (%) dos escores da Reabsorção Cervical Inativa sem Reparo atribuídos ao Grupo II nos períodos de 5, 15 e 30 dias.

GRUPO III

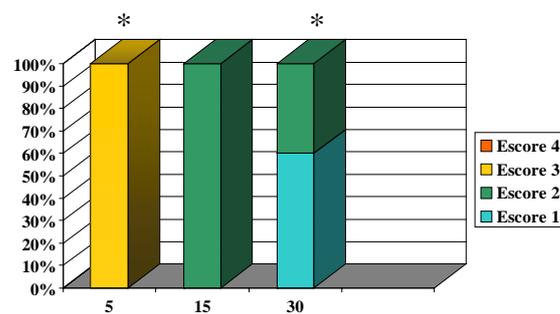
Ao analisar os resultados estatísticos obtidos através do teste de Kruskal-Wallis com 5% de nível de significância pode-se observar no grupo III que não ocorreram diferenças significantes entre os períodos experimentais com relação aos escores atribuídos na análise do tecido gengival quanto a: “Aderência do Tecidos Conjuntivo Gengival”; “Intensidade da Inflamação Gengival Aguda”; “Extensão da Inflamação Gengival Aguda”; “Intensidade da Inflamação Gengival Crônica” e “Extensão da Inflamação Gengival Crônica”.

Com relação à análise dos escores atribuídos no ligamento periodontal pode-se observar que não houveram diferenças estatísticas ente os períodos quando avaliou-se a Intensidade de Inflamação Aguda; Extensão da Inflamação Aguda; Intensidade da Inflamação Crônica e Extensão da Inflamação Crônica ($p > 0,05$). Por outro lado foram observadas diferenças estatisticamente significantes com relação a Inserção do Ligamento Periodontal entre os períodos de 5 e 30 dias ($p = 0,0025$) (Figura 32), demonstrando menor inserção do ligamento na superfície radicular no período de 5 dias pós operatório.

Na análise comparativa da superfície radicular quanto a: Reabsorção Radicular Ativa; Reabsorção Radicular Inativa com Reparo e Reabsorção Radicular Inativa com Reparo inativa sem reparo não houve diferenças estatisticamente significantes entre os períodos experimentais estudados neste grupo ($p = 0,5364$; $p = 0,1423$; $p = 0,7980$). Com relação a reabsorção cervical também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos períodos experimentais estudados ($p = 0,7980$; $p = 0,4066$; $p = 0,3547$).

Na análise estatística dos escores atribuídos aos eventos biológicos envolvidos no tecido ósseo com relação a: Reabsorção Ativa e Reabsorção Inativa

neste grupo, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos experimentais estudados, demonstrando comportamento semelhante no grau de reabsorção óssea entre os períodos de 5, 15 e 30 dias ($p=0,1305$ e $p=0,4504$).



* $p=0,0025$

Figura 32 - Frequências (%) dos escores da Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo III nos períodos de 5 e 30 dias.

GRUPO IV

Ao analisar os resultados estatísticos obtidos através do teste de Kruskal-Wallis com 5% de nível de significância pode-se observar no grupo IV que não houve diferenças significantes entre os períodos experimentais com relação aos escores atribuídos na análise do tecido gengival quanto a: “Aderência do Tecidos Conjuntivo Gengival”; “Intensidade da Inflamação Gengival Aguda”; “Extensão da Inflamação Gengival Aguda”; “Intensidade da Inflamação Gengival Crônica” e “Extensão da Inflamação Gengival Crônica”.

Com relação à análise dos escores atribuídos no ligamento periodontal pode-se observar que não houve diferenças estatísticas ente os períodos quando se avaliou: Intensidade de Inflamação Aguda; Extensão da Inflamação Aguda; Intensidade da Inflamação Crônica e Extensão da Inflamação Crônica ($p > 0,05$). Por outro lado ocorreu diferença estatisticamente significativa com relação a Inserção do Ligamento Periodontal entre os períodos de 5 e 15 dias ($p = 0,0075$) (Figura 33), demonstrando menor inserção do ligamento na superfície radicular no período de 5 dias pós operatório.

Na análise comparativa da superfície radicular quanto a Reabsorção Radicular Ativa, Reabsorção Radicular Inativa com Reparo e Reabsorção Radicular Inativa sem Reparo não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos experimentais estudados neste grupo ($p = 0,4066$; $p = 0,4066$; $p = 0,5839$).

Com relação a Reabsorção Cervical também não foi observada diferença estatisticamente significativa nos períodos experimentais estudados na reabsorção ativa e inativa sem reparo ($p = 0,5839$; $p = 0,2479$), porém ocorreram diferenças significantes na Reabsorção Cervical Inativa com Reparo entre os

períodos experimentais de 5 e 15 dias ($p=0,0460$) e entre 15 e 30 dias ($p=0,0343$) (figura 34), com maior reabsorção nos períodos de 15 dias.

Na análise estatística dos escores atribuídos aos eventos biológicos envolvidos no tecido ósseo com relação a: Reabsorção Ativa e Reabsorção Inativa neste grupo, detectou-se diferença estatisticamente significativa apenas na Reabsorção Ativa entre os períodos experimentais de 5 e 15 dias ($p=0,0133$) (Figura 35) demonstrando maior reabsorção óssea aos 5 dias.

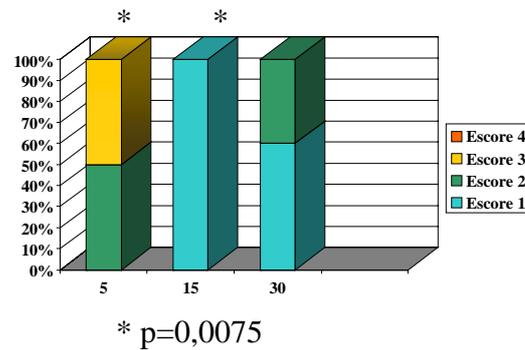


Figura 33 - Frequências (%) dos escores da Inserção do Ligamento Periodontal atribuídos ao Grupo IV nos períodos de 5, 15 e 30 dias.

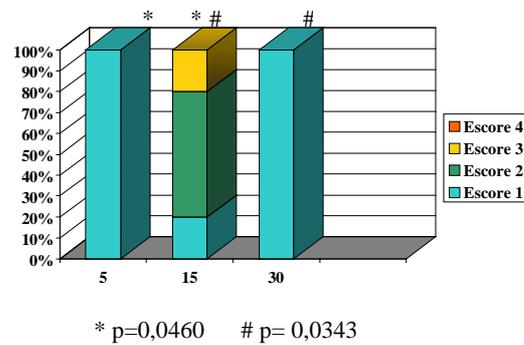


Figura 34 - Frequências (%) dos escores da Reabsorção Cervical Inativa com Reparo atribuídos ao Grupo IV nos períodos de 5, 15 e 30 dias.

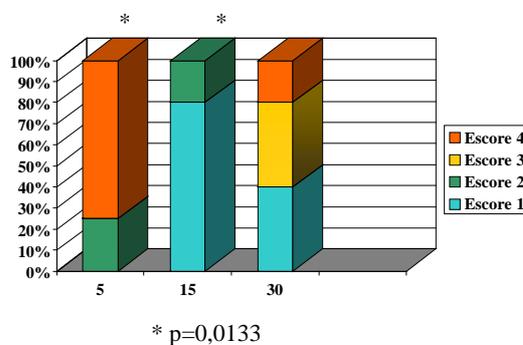


Figura 35 - Frequências (%) dos escores da Reabsorção Ativa do Tecido Ósseo atribuídos ao Grupo IV nos períodos de 5, 15 e 30 dias.

2) Análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos entre os grupos experimentais.

Período de 5 Dias

Na análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos analisados no “Tecido Gengival”, “Ligamento Periodontal”, “Superfície Radicular” e “Tecido Ósseo”, entre os Grupos I, II, III e IV no período de 5 dias não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais estudados, demonstrando que nenhum tratamento proposto influenciou na evolução da doença periodontal induzida em ratos neste período experimental (Tabela 1, 2, 3 e 4).

Tabela 1. Freqüência e porcentagem de escores de "Aderência do Tecido Gengival" (AG), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico" no tecido gengival em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 5 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
AG				
escore 1				
escore 2	2 (50%)	5(100%)	3(75%)	3(75%)
escore 3	2 (50%)			1(25%)
escore 4			1(25%)	
Valores de P	P=0,4500			
InPlag				
escore 1	3 (75%)	4 (80%)	2 (50%)	3 (75%)
escore 2	1 (25%)	1 (20%)	1 (25%)	
escore 3				1 (25%)
escore 4			1 (25%)	
Valor de p	P= 0,7111			
ExPlag				
escore 1	4 (100%)	4 (80%)	2 (50%)	3 (75%)
escore 2		1 (20%)	1 (25%)	
escore 3				
escore 4			1 (25%)	1 (25%)
Valor de p	P=0,4391			
InPlcr				
escore 1		1 (20%)		1 (25%)
escore 2	3 (75%)	3 (60%)	1 (25%)	2 (50%)
escore 3	1 (25%)	1 (20%)	3 (75%)	
escore 4				1 (25%)
Valor de p	P=0,4161			
ExPlcr				
escore 1		1 (20%)		1 (25%)
escore 2	3 (75%)	4 (80%)		1 (25%)
escore 3	1 (25%)		3 (75%)	1 (25%)
escore 4			1 (25%)	1 (25%)
Valor de p	P=0,0655			
Total (n)	4	5	4	4

(Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Tabela 2 Frequência e porcentagem de escores de "Inserção do Ligamento Periodontal" (ILP), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo no Ligamento Periodontal" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo no Ligamento Periodontal" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV, no período experimental de 5 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
ILP				
escore 1				
escore 2	3 (75%)	3 (60%)		2 (50%)
escore 3	1 (25%)	2 (40%)	4(100%)	2(50%)
escore 4				
Valores de P	0,1827			
InPlag				
escore 1	4 (80%)	5 (100%)		4(100%)
escore 2	1 (20%)		4 (100%)	
escore 3				
escore 4				
Valor de p	0,4925			
ExPlag				
escore 1	4 (100%)	5 (100%)	3 (75%)	3 (75%)
escore 2				
escore 3			1 (25%)	1 (25%)
escore 4				
Valor de p	0,4936			
InPlcr				
escore 1		1 (20%)		2 (50%)
escore 2	4 (100%)	4 (80%)	4 (100%)	
escore 3				2 (50%)
escore 4				
Valor de p	0,9315			
ExPlcr				
escore 1		2 ((40%)		2(50%)
escore 2	4 (100%)	1 (20%)	1 (25%)	2 (50%)
escore 3		2 (40%)	3 (75%)	
escore 4				
Valor de p	01223			
Total (n)	4	5	4	4

(Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Tabela 3. Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção radicular ativa" (RRA), "Reabsorção Radicular Inativa com reparo" (RRICr), "Reabsorção Radicular Inativa sem reparo"(RRIsr), "Reabsorção Cervical Ativa" (RCA), em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 5 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
RRA				
escore 1	4 (100%)	4 (80%)	3 (60%)	4 (100%)
escore 2		1 (20%)		
escore 3			1 (20%)	
escore 4				
Valores de P	0,5711			
RRICr				
escore 1	4 (100%)	5 (100%)	4(100%)	4 (100%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				
Valor de p	>0,05			
RRIsr				
escore 1	4 (100%)	5 (100%)	4(100%)	4 (100%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				
Valor de p	>0,05			
RCA				
escore 1	4 (100%)	3 (60%)	3 (80%)	2 (50%)
escore 2		2 (40%)		1 (25%)
escore 3			1 (20%)	1 (25%)
escore 4				
Valor de p	0,4831			
Total (n)	4	5	4	4

(Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Tabela 4. Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção Cervical Inativa com reparo" (RCIcr), "Reabsorção Cervical Inativa sem reparo" (RCIsr), "Reabsorção Ativa do tecido ósseo"(Rato), "Reabsorção Inativa do tecido ósseo"(Ritc) em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 5 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
RClcr				
escore 1	4 (100%)	5 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				
Valores de P	NS			
RCIsr				
escore 1	3 (75%)	3 (60%)	4 (100%)	3 (75%)
escore 2	1 (25%)	2 (40%)		1 (25%)
escore 3				
escore 4				
Valor de p	0,5983			
Rato				
escore 1		1 (20%)	1 (25%)	
escore 2	2 (50%)	1 (20%)		1 (25%)
escore 3	1 (25%)	2 (40%)	1 (25%)	
escore 4	1 (25%)	1 (20%)	2 (50%)	3 (75%)
Valor de p	0,5703			
Ritc				
escore 1	3 (75%)	5 (100%)	2 (50%)	4 (100%)
escore 2	1 (25%)			
escore 3				
escore 4			2 (50%)	
Valor de p	0,01682			
Total (n)	4	5	4	4

NS – Não significante (Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância).

Período de 15 dias

Na análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos analisados no Tecido Gengival, entre os Grupos I, II, III e IV no período de 15 dias foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais estudados com relação a “Extensão da Inflamação Gengival Crônica” entre os grupos I e III ($p=0,0351$) e entre os grupos II e III ($p=0,0011$) demonstrando uma maior extensão da inflamação gengival crônica no grupo tratado apenas com o laser (Tabela 5).

Na análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos analisados no Ligamento Periodontal. Notou-se diferenças estatisticamente significantes na inserção do ligamento periodontal entre os grupos I e III ($p=0,0327$), entre II e III ($p=0,0118$) e entre os grupos III e IV ($p=0,0076$) (Tabela 6). Tais fatos demonstram que o grupo do laser apresentou menor inserção do ligamento periodontal quando comparado com os demais grupos e que não houveram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com a terapia fotodinâmica e com a droga fotossensibilizadora com o grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento. Com relação à intensidade e extensão da inflamação aguda e crônica no ligamento periodontal não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos neste período experimental.

Na análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos analisados na Superfície radicular não houve diferenças estatisticamente significantes com relação a reabsorção radicular ativa e inativa com reparo e sem reparo entre os grupos neste período experimental (Tabela 7). Por outro lado com relação a reabsorção cervical houve diferença estatisticamente significativa na reabsorção cervical inativa com reparo entre os grupos I e IV ($p=0,0284$),

demonstrando maior reabsorção cervical nos animais tratados com a terapia fotodinâmica (Tabela 8).

Na análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos analisados no tecido ósseo não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos neste período experimental ($p=0,2975$ e $p=0,1927$) (Tabela 8).

Tabela 5. Frequência e porcentagem de escores de "Aderência do Tecido Gengival" (AG), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico" no tecido gengival em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 15 dias.

	G1	GII	GIII	GIV	GI X GII	GI X GIII	GI X IV	GIIXGIII	GIIXGIV	GIIXGIV
AG										
escore 1										
escore 2	1 (20%)	2 (50%)	5(100%)	4 (80%)						
escore 3	4 (80%)	2 (50%)		1 (20%)						
escore 4										
Valores de P	0,0962									
InPlag										
escore 1	3 (60%)	4(100%)	4 (80%)	5 (100%)						
escore 2	2 (40%		1 (20%							
escore 3										
escore 4										
Valor de p	0,2898									
ExPlag										
escore 1	3 (60%)	4 (100%)	4 (80%)	5 (100%)						
escore 2	2 (40%		1 (20%)							
escore 3										
escore 4										
Valor de p	0,2898									
InPlcr										
escore 1	1 (20%)	3 (75%)								
escore 2	2 (40%)	1 (25%)	1 (20%)	3 (60%)						
escore 3	1 (20%)		4 (80%)	2 (40%)						
escore 4	1 (20%)									
Valor de p	0,0513									
ExPlcr										
escore 1	1 (20%)	3 (75%)								
escore 2	3 (60%)	1 (25%)		3 (60%)						
escore 3			1 (20%)	2 (40%)						
escore 4	1 (20%)		4 (80%)							
Valor de p	0,0073									
	5	4	5	5	0,0351*			0,0011*		
Total (n)										

* Diferença estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Tabela 6 Frequência e porcentagem de escores de "Inserção do Ligamento Periodontal" (ILP), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo no Ligamento Periodontal" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo no Ligamento Periodontal" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV, no período experimental de 15 dias.

	GI	GII	GIII	GIV	GI X GII	GI X GIII	GI X GIV	GII X GIII	GII X GIV	GIII X GIV
ILP										
escore 1	4 (80%)	4 (100%)		5 (100%)						
escore 2	1 (20%)		5 (100%)							
escore 3										
escore 4										
Valores de P	0,0023					0,0327*		0,0118*		0,0076*
InPlag										
escore 1	5 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	5 (100%)						
escore 2										
escore 3										
escore 4										
escore 1	NS									
ExPlag										
escore 1	5(100%)	4 (100%)	5 (100%)	5 (100%)						
escore 2										
escore 3										
escore 4										
Valor de p	NS									
InPlcr										
escore 1	5 (100%)	4 (100%)	2 (40%)	5 100%)						
escore 2			3 (60%)							
escore 3										
escore 4										
Valor de p	NS									
ExPlcr										
escore 1	5(100%)	4 (100%)	2 (40%)	5 (100%)						
escore 2			3 (60%)							
escore 3										
escore 4										
Valor de p	NS									
Total (n)	5	4	5	5						

NS – Não significante; * Diferença estatisticamente significante (Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Tabela 7. Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção radicular ativa" (RRA), "Reabsorção Radicular Inativa com reparo" (RRlcr), "Reabsorção Radicular Inativa sem reparo"(RRlsr), "Reabsorção Cervical Ativa" (RCA), em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 15 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
RRA				
escore 1	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)	5 (100%)
escore 2				
escore 3			1 (20%)	
escore 4				
Valores de P	0,4235			
RRlcr				
escore 1	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				
Valor de p	NS			
RRlsr				
escore 1	5 (100%)	3 (75%)	5 (100%)	4 (80%)
escore 2		1 (25%)		1 (20%)
escore 3				
escore 4				
Valor de p	0,4920			
RCA				
escore 1	4 (80%)	3 (75%)	3 (60%)	3 (60%)
escore 2	1 (20%)			
escore 3		1(25%)	1 (25%)	
escore 4			1 (25%)	1 (20%)
Valor de p	0,7817			
Total (n)	5	4	5	5

NS – Não significativa (Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Tabela 8. Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção Cervical Inativa com reparo" (RCIcr), "Reabsorção Cervical Inativa sem reparo" (RCIsr), "Reabsorção Ativa do tecido ósseo"(Rato), "Reabsorção Inativa do tecido ósseo"(Ritc) em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 15 dias.

	G1	GII	GIII	GIV	GI X GII	GI X GIII	GI X IV	GIXGIII	GII X GIV	GIIIXGIV
RClcr										
escore 1	5 (100%)	3 (75%)	4 (80%)	1 (20%)						
escore 2		1 (25%)	1 (20%)	3 (60%)						
escore 3				1 (20%)						
escore 4										
Valores de P	0,0444						0,0284*			
RCIsr										
escore 1	2 (40%)	3 (75%)	3 (60%)	2 (40%)						
escore 2	3 (60%)		1 (20%)	3 (60%)						
escore 3		1 (25%)	1 (20%)							
escore 4										
Valor de p	0,7767									
Rato										
escore 1	3 (60%)	3 (75%)	1 (20%)	4 (80%)						
escore 2	1 (20%)	1 (25%)	4 (80%)	1 (20%)						
escore 3	1 (20%)									
escore 4										
Valor de p	0,2975									
Ritc										
escore 1	5 (100%)	2(50%)	4 (80%)	5 (100%)						
escore 2		2 (50%)								
escore 3										
escore 4			1 (20%)							
Valor de p	0,1927									
Total (n)	5	4	5	5						

* Diferença estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância).

Período de 30 dias

Na análise comparativa dos escores atribuídos aos eventos biológicos analisados no: “Tecido Gengival”; “Ligamento Periodontal”; “Superfície radicular” e “Tecido ósseo”, entre os Grupos I, II, III e IV no período de 30 dias não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais estudados, demonstrando que nenhum tratamento proposto influenciou na evolução da doença periodontal induzida em ratos neste período experimental (Tabela 9, 10, 11 e 12).

Tabela 9. Freqüência e porcentagem de escores de "Aderência do Tecido Gengival" (AG), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico" no tecido gengival em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 30 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
AG				
escore 1				1 (20%)
escore 2		1 (20%)	4 (80%)	1 (20%)
escore 3	5 (100%)	4 (80%)	1 (80%)	3 (60%)
escore 4				
Valores de P	0,0837			
InPlag				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				1 (20%)
Valor de p	0,3916			
ExPlag				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				1 (20%)
Valor de p	0,3916			
InPlcr				
escore 1		1 (20%)		
escore 2	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)
escore 3	2 (40%)	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)
escore 4			1 (20%)	
Valor de p	0,6524			
ExPlcr				
escore 1		1 (20%)		
escore 2	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	3 (80%)
escore 3	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	2 (20%)
escore 4	1 (20%)		1 (20%)	
Valor de p	0,5754			
Total (n)	5	5	5	5

(Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância).

Tabela 10 Frequência e porcentagem de escores de "Inserção do Ligamento Periodontal" (ILP), "Intensidade do Processo Inflamatório Agudo no Ligamento Periodontal" (InPlag), "Extensão do Processo Inflamatório agudo no Ligamento Periodontal" (ExPlag), "Intensidade do processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" (InPlcr), "Extensão do Processo Inflamatório crônico no Ligamento Periodontal" em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV, no período experimental de 30 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
ILP				
escore 1	3 (60%)	3 (80%)	3 (80%)	3 (80%)
escore 2	2 (40%)	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)
escore 3				
escore 4				
Valores de P	1,000			
InPlag				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				
Valor de p	NS			
ExPlag				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
escore 2				
escore 3				
escore 4				
Valor de p	NS			
InPlcr				
escore 1	4 (80%)	4 (80%)	3 (60%)	5 (100%)
escore 2	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	
escore 3				
escore 4				
Valor de p	0,4983			
ExPlcr				
escore 1	4 (80%)	4 (80%)	3 (60%)	5 (100%)
escore 2	1 (80%)	1 (20%)	1 (20%)	
escore 3				
escore 4			1 (20%)	
Valor de p	0,4565			
Total (n)	5	5	5	5

NS – não significativo (Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância).

Tabela 11. Freqüência e porcentagem de escores de "Reabsorção radicular ativa" (RRA), "Reabsorção Radicular Inativa com reparo" (RRlcr), "Reabsorção Radicular Inativa sem reparo" (RRlsr), "Reabsorção Cervical Ativa" (RCA), em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 30 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
RRA				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)
escore 2				1 (20%)
escore 3				
escore 4				
Valores de P	0,3916			
RRlcr				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	3 (60%)	5 (100%)
escore 2			2 (40%)	
escore 3				
escore 4				
Valor de p	0,0965			
RRlsr				
escore 1	4 (80%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)
escore 2	1 (20%)			
escore 3		1 (20%)		
escore 4				
Valor de p	0,5487			
RCA				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)
escore 2				1 (20%)
escore 3				
escore 4			1 (20%)	
Valor de p	0,5487			
Total (n)	5	5	5	5

(Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Tabela 12. Frequência e porcentagem de escores de "Reabsorção Cervical Inativa com reparo" (RCIcr), "Reabsorção Cervical Inativa sem reparo" (RCIsr), "Reabsorção Ativa do tecido ósseo"(Rato), "Reabsorção Inativa do tecido ósseo"(Ritc) em cada grupo experimental e valores de p da comparação entre os grupos I, II, III e IV no período experimental de 30 dias.

	G1	GII	GIII	GIV
RClcr				
escore 1	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)
escore 2		1 (20%)		
escore 3				
escore 4				
Valores de P	0,3916			
RCIsr				
escore 1				2 (40%)
escore 2	3 (60%)	1 (20%)	3 (60%)	
escore 3	1 (20%)		2 (40%)	2 (40%)
escore 4	1 (20%)	4 (80%)		1 (20%)
Valor de p	0,0983			
Rato				
escore 1	3 (60%)	4 (80%)	3 (60%)	2 (40%)
escore 2	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	
escore 3				2 (40%)
escore 4				1 (20%)
Valor de p	0,3351			
Ritc				
escore 1	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)
escore 2			1 (20%)	
escore 3				
escore 4				
Valor de p	0,3916			
Total (n)	5	5	5	5

(Teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância)

Discussão

*“Devemos ler para oferecer à nossa alma
a oportunidade da luxúria”
(Henry Miller 1891-1980)*

6 *Discussão*

O presente estudo representa uma linha de pesquisa ora implantada no Programa de Pós-Graduação, área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, que procura através de modelo animal acessível, contribuir para o conhecimento dos eventos biológicos envolvidos na doença periodontal.

Com o intuito de estabelecer a lesão periodontal em animais de experimentação, fio de algodão, seda e elástico tem sido utilizado em ratos (SALLAY et al., 1982; SAMEJIMA et al., 1990; HOLZHAUSEN et al., 2002), hamster (OKUDA et al., 1988), cães (LINDHE; ERICSON, 1978) e macacos (HOLT et al., 1988). O modelo de indução de periodontite proposto por Johnson (1975) é comprovadamente efetivo visto os inúmeros trabalhos que utilizaram este modelo para favorecer o acúmulo do biofilme bacteriano com conseqüente inflamação da margem gengival e posterior desenvolvimento da doença periodontal destrutiva. Tal modelo experimental de indução da doença periodontal é caracterizado pela colocação de um fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior de ratos, com o intuito do desenvolvimento da doença periodontal localizada para posterior tratamento, podendo ser comprovado histologicamente pelos inúmeros trabalhos na literatura (LISTGARTEN, 1975; LINDHE; ERICSSON, 1978; KLAUSEN, 1991; SELVING, 1994; MANDALUNIS et al., 1998; WEINBERG; BRAL, 1999; WIKESJÖ; SELVIG, 1999; BEZERRA et al., 2000; HOLZHAUSEN, 2002; NASSAR, 2004).

De acordo com alguns autores (KLAUSEN, 1991; SELVIG, 1999) o rato é um animal favorável como modelo experimental para o desenvolvimento da doença periodontal face à semelhança do periodonto ao do homem, tendo como

divergência apenas a presença da queratinização do epitélio sulcular (LISTGARTEN, 1975; KLAUSEN, 1991), sendo que a patogênese da doença periodontal e a microbiota periodontopatogênica também são semelhantes ao do ser humano (WEINBERG; BRAL, 1999; SELVIG, 1999). Levando em consideração estes aspectos, a doença periodontal pode ser induzida como afirmada e demonstrada por Lindhe; Ericsson em 1978, comprovando que a ligadura, além de iniciar o desenvolvimento da gengivite, promove uma rápida destruição dos tecidos periodontais de sustentação. Porém a efetividade da indução da doença periodontal foi questionada por Bogle et al. em 1981, que relataram haver mais sucesso das terapias periodontais em sítios que a doença foi induzida experimentalmente do que nos sítios em que a doença se desenvolveu naturalmente. Este estudo foi contestado mais tarde por Selving em 1994, ao afirmar que os resultados do tratamento, independe do modo como a doença se instala.

Comprovada pelos diversos estudos na literatura (ALEO et al., 1974; LISTGARTEN, 1975; REGISTER; BURDICK, 1975; LINDHE; ERICSSON, 1978; LASHO et al., 1983) a terapêutica periodontal através da raspagem e alisamento radicular é de extrema importância, pois remove depósitos bacterianos, cálculos e camadas superficiais das raízes, como cemento e dentina, que podem ser considerados como tecidos necrosados e reservatórios de toxinas bacterianas (ALEO et al., 1974; ADRIAENS et al., 1988; BIAGINI et al., 1992). Este cemento e/ou dentina remanescente após raspagem e alisamento radicular podem ainda estar contaminados tanto pela presença de microorganismos nas suas superfícies bem como na camada de *smear layer* formada durante o procedimento de raspagem e alisamento radicular (ADRIAENS et al., 1988; POLSON et al., 1984), interferindo assim no processo de reparação periodontal.

É notório na literatura a preocupação dos autores com o tratamento químico como agente coadjuvante aos procedimentos mecânicos na remoção do biofilme dental sobre a superfície radicular. Assim diferentes formas de tratamento químico radicular têm sido proposto, como o ácido cítrico (REGISTER; BURDICK, 1976; POLSON; PROYE, 1983; HANES et al., 1988, BABAY, 2001), ácido fosfórico (BLOMLÖF; LINDKOG, 1995; BLOMLÖF, 1996; FARDAL; LOWENBERG, 1990), EDTA (BLOMLÖF et al., 2000; BABAY, 2001; PILATTI, 2001), tetraciclina (MATTSON et al., 1999; BABAY, 2000; ISIK et al., 2000; BABAY, 2001), Metronidazol (LOESCHE et al., 1981; 1992), Doxiciclina (POLSON et al., 1997; FERREZ et al., 1999), Clorexidina (BRINER et al., 1994; SOSKOLNE et al., 1997), minoxicilina (VAN STEENBERGHE et al., 1993) e mais recentemente o Laser de alta potência (THEODORO et al., 2003).

Com o desenvolvimento do Laser por Theodore Maiman em 1960, inúmeros trabalhos têm demonstrado os efeitos biomoduladores benéficos desta nova modalidade terapêutica, sobre os eventos biológicos envolvidos no processo de reparação tecidual. Tais efeitos biomoduladores são decorrentes dos efeitos não térmicos promovido pelos Lasers em baixa intensidade, com uma densidade de potência de alguns mW/cm^2 , que exclui os efeitos térmicos ao tecido tratado não ultrapassando $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os fotoceptores presentes nas células e no tecido são responsáveis por absorver luz em certos comprimentos de onda, o que pode resultar em reações bioquímicas no tecido promovendo, desta forma, a biomodulação da resposta celular. Karu (1989) explica que tal efeito é decorrente das alterações fotoquímicas nas mitocôndrias, que alteram o metabolismo, conduzindo à transdução, processo o qual consiste na transferência de energia de um sistema

para outro, ou seja do sinal a outras partes da célula incluindo membranas, que finalmente conduzem à fotorresposta ou biomodulação.

Desta forma, o fenômeno da biomodulação tecidual tem sido de grande valia nos eventos biológicos envolvidos no processo de reparação tecidual como podemos observar pelo grande número de trabalhos que evidenciam o efeito positivo do Laser (MESTER et al., 1968; MESTER et al., 1971; MESTER 1973; MESTER; JASZSAGI-NAGI, 1973; MESTER et al., 1976; MESTER et al., 1985; AVERBAKH et al., 1976; KANA et al., 1981; SURINCHAK et al., 1983; SOARES et al., 1989; GARCIA, 1992; LEE et al., 1993; BISHT et al., 1994; KAMEYA et al., 1995; LOWE et al., 1998; ESPINOSA, 1999; REZENDE, 2001; TEICHART et al., 2002; MATEVSKI et al., 2003).

Mais recentemente a terapia envolvendo o uso do Laser em baixa intensidade que tem despertado a atenção de muitos pesquisadores é a terapia fotodinâmica. A terapia fotodinâmica, definida como a irradiação de células / bactérias marcadas por uma espécie de oxigênio reativo produzido por meio de uma droga fotossensibilizadora e luz com comprimento de onda apropriado (DOUGHERTY 2002), tem sido utilizada com maior frequência em Oncologia, para o tratamento de tumores malignos, evidenciando resultados animadores (BAUER et al., 2001; TOMASELLI et al., 2001). No entanto, nos últimos anos observamos que tal modalidade tem sido objetivo de inúmeras pesquisas para o tratamento de infecções microbianas, principalmente em cepas resistentes ao tratamento convencional com antibióticos (MALIK et al., 1990; WILSON, 1994; WILSON et al., 1993, 1995; DÖRTBUDAK et al., 1997; WAINWRIGHT, 1998; USACHEVA et al., 2001; CHAN; LAI, 2003; KOMERICK et al., 2003).

A utilização da terapia fotodinâmica no controle antimicrobiano apresenta como vantagens ser uma terapia que utiliza corantes com baixas concentrações, de custo reduzido e por ser uma terapia aplicada localmente, possibilita a absorção pela microbiota local sem os efeitos indesejáveis de um agente administrado sistemicamente, que solicitaria altas concentrações, necessidade de metabolização, atingindo a área interessada de forma inespecífica através da corrente sanguínea, o que não ocorre com a terapia fotodinâmica a qual apresenta efeito local e específico. Outra vantagem desta terapia é a não seleção de cepas resistentes além de ter o efeito biomodulador do Laser em baixa intensidade associado.

A ação bactericida desta nova opção terapêutica tem sido evidenciada em diferentes microrganismos como as *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Actinobacilos actinomycetemcomitans*, *Bacteróides forsythus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Cândida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium nucleatum*, *S. sanguis* (HAAS et al., 1997; USACHEVA et al., 2001; TEICHART et al., 2002; YILMAZ et al., 2002; NUSSBAUM et al., 2002; MATEVSKI et al., 2003; KREISLER et al., 2003; KÖMERIK et al., 2003; CHAN; LAI, 2003, SHIBLI et al. 2003),

Assim exposto, observamos que os resultados evidenciados no presente estudo demonstram que houve algumas diferenças estatisticamente significantes em alguns parâmetros analisados, entre os tempos pós-operatórios e tratamentos empregados.

Na análise dos resultados obtidos no grupo I, ficou evidente que o uso de fio de algodão foi responsável pela colonização de uma microbiota capaz de

provocar efeitos deletérios sobre os tecidos moles e mineralizados do periodonto. Esses achados mostram-se evidentes em todo período experimental e corroboram os achados descritos na literatura de indução experimental da doença periodontal (LISTGARTEN, 1975; LINDHE; ERICSSON, 1978; KLAUSEN, 1991; SELVING, 1994; MANDALUNIS et al., 1998; WEINBERG; BRAL, 1999; WIKESJÖ; SELVIG, 1999; BEZERRA et al., 2000; HOLZHAUSEN, 2002; NASSAR, 2004). Tal fato caracterizou-se pela presença de infiltrado inflamatório, perda de inserção do ligamento periodontal, reabsorção óssea ativa, e mostram-se amparados por estudos que documentam a presença de neutrófilos, a partir do quarto dia e de macrófagos a partir do 5^o dia do estabelecimento da doença periodontal induzida, persistindo este infiltrado inflamatório até sete dias além da perda óssea, apresentando esta, um pico ao redor do 7^o dia (JORDAN; KEYS, 1964; SALLAY et al., 1982, REIS, 2002; BEZERRA et al., 2002).

Neste grupo, também ficou evidente que houve diferenças estatisticamente significantes com relação a inserção do ligamento periodontal (Fig. 24) entre os períodos de 5 e 15 dias; intensidade do processo inflamatório crônico (Fig. 25) entre os períodos de 5 e 15 dias e entre os de 5 e 30 dias; extensão do processo inflamatório crônico (Fig. 26) entre os períodos os 5 e 15 dias e entre os períodos de 5 e 30 dias. Desta forma observamos que no período de 5 dias os eventos biológicos evidenciaram maior intensidade e extensão do processo inflamatório crônico e menor inserção do ligamento periodontal. Estudo recente demonstra, no mesmo modelo experimental utilizado no presente trabalho, a presença de moderado infiltrado inflamatório com neutrófilos e macrófagos no período de 4 dias e de raras células inflamatórias no período de 28 dias (Reis, 2002). Na análise comparativa com este estudo observamos que o autor removeu a

ligadura após 5 semanas da sua instalação e realização de diferentes tratamentos (Gel de EDTA a 24%, Gel placebo e Raspagem), contrário ao nosso experimento que mantivemos a ligadura em todos períodos experimentais.

Acreditamos que a manutenção da microbiota local, face a manutenção da ligadura, e conseqüente heterogenicidade microbiana desenvolvida no período de 30 dias, sejam, provavelmente, os responsáveis pelo maior grau de reabsorção radicular observado no período de 30 dias quando comparado ao período de 5 dias (Fig. 27).

Já no grupo II onde o azul de metileno foi utilizado também ficaram evidente diferenças estatisticamente significantes com relação a aderência do tecido conjuntivo gengival (Fig. 28) entre os períodos de 5 e 30 dias; inserção do ligamento periodontal (Fig. 29) entre os períodos de 5 e 15 dias; intensidade do processo inflamatório crônico (Fig. 30) entre os períodos de 5 e 15 dias e a reabsorção radicular cervical inativa sem reparo (Fig. 31) entre os períodos de 5 e 30 dias e entre os períodos de 15 e 30 dias.

Desta forma ficou evidenciado que o azul de metileno irrigando a área (1 mL) mantendo-se impregnado ao fio de algodão em contato direto com a microbiota, não foi capaz de interferir no estabelecimento da doença periodontal, uma vez que aos 5 dias observa-se menor inserção do ligamento periodontal, maior inflamação crônica e maior reabsorção radicular inativa sem reparo do que aos 30 dias.

Acreditamos que os resultados obtidos deveu-se a várias condições, como: concentração da droga, tempo de permanência da droga no interior do tecido, pH do meio (interface tecido/dente), presença de exsudato, fluido gengival, e modo de aplicação da droga (irrigação, gel de liberação lenta), uma vez que estudos

documentam a efetividade do azul de metileno, aplicado isoladamente, no reparo de feridas cutâneas (Espinosa, 1999) ou de extração dental infectadas (Lopes Jr, 2000), na viabilidade de diferentes microrganismos, inclusive fungos, vírus, microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos, quer isolado e ou associado ao laser em baixa intensidade (WILSON, 1994; WILSON; MIA, 1993; WILSON et al., 1993, 1995; SKRIPCHENKO et al., 1997; LOPES JR, 2000; USACHEVA et al., 2001), muito embora pesquisadores demonstram que o uso isolado da droga não promova ação letal significativa (SARKAR; WILSON, 1993, FERREIRA, 2002, CHAN; LAI, 2003). Recentemente GAD et al. (2004) chamam a atenção de que o azul de metileno, por tratar-se de uma droga catiônica, pode sofrer interferência na sua metabolização e conseqüente absorção pelas bactérias, face a liberação local de exotoxinas produzidas por bactérias periodontopatogênicas e que o uso da droga fotossensibilizadora associada ao laser poderá interferir na absorção da droga pelas bactérias uma vez que o laser poderia interferir na membrana celular bacteriana, possibilitando maior absorção da droga, interferindo conseqüentemente na viabilidade bacteriana.

Por outro lado, os resultados obtidos com o uso do Laser em baixa intensidade evidenciados no grupo III, demonstram que ocorreu diferenças estatisticamente significantes com relação a inserção do ligamento periodontal (Fig. 32) entre os períodos de 5 e 30 dias, com maior perda de inserção do ligamento na superfície radicular no período de 5 dias, não havendo diferenças significativas para os demais eventos biológicos analisados nos tempos de 5, 15 e 30 dias.

A literatura é rica de pesquisas que atestam a efetividade do Laser em baixa intensidade para promover aceleração da reparação tecidual em condições de normalidade ou em áreas infectadas, associado ou não à drogas

fotossensibilizadoras (MESTER et al., 1968; MESTER et al., 1971; MESTER, 1973; MESTER; JASZSAGI-NAGI, 1973; MESTER et al. 1976; MESTER et al. 1985; AVERBAKH et al. 1976; KANA et al. 1981; SURINCHAK et al., 1983; SOARES et al., 1989; GARCIA, 1992; LEE et al., 1993; BISHT et al. 1994; KAMEYA et al., 1995; LOWE et al., 1998; ESPINOSA, 1999; REZENDE, 2001; TEICHART et al., 2002; MATEVSKI et al., 2003). Um dos pontos discutido na literatura é a ação do Laser, isoladamente em áreas infectadas, uma vez que trabalhos documentam a possibilidade do Laser em baixa intensidade promover um efeito estimulador sobre as bactérias de tal forma que possa interferir no processo de reparação (NUSSBAUM et al., 1994). Karu (1988) contra-indica o uso do laser isoladamente em áreas infectadas, deixando de valorizar a capacidade do Laser em estimular a “resposta biológica do hospedeiro” e, desta forma, do próprio sistema imunológico do paciente, em combater a infecção. No entanto outros pesquisadores, baseando-se em experiência clínica, chamam a atenção que esta modalidade terapêutica constitui uma forma terapêutica de sucesso neste tipo de ferida (BAXTER et al., 1991), que experimentalmente em feridas de extração dental de ratos, mostrou-se efetiva sobre os eventos reparacionais, (LOPES Jr, 2000). Desta forma acreditamos que a maior perda de inserção observada no período de 5 dias, comparativamente ao período de 30 dias, provavelmente deveu-se a pouca ação do Laser sobre a viabilidade das bactérias presentes. Por outro lado no período de 30 dias, a capacidade bioestimuladora do laser sobre as células dos tecidos periodontais mostrou-se mais evidente, promovendo maior inserção do ligamento periodontal.

Os resultados evidenciados nos espécimes do grupo IV, no qual houve a associação da droga fotossensibilizadora com o Laser em baixa intensidade, observamos diferenças estatisticamente significantes quanto a inserção

do ligamento periodontal (Fig. 33) nos períodos entre 5 e 15 dias, com maior perda de inserção do ligamento na superfície radicular no período de 5 dias; quanto a reabsorção radicular inativa com reparo (Fig. 34) entre os períodos de 5 dias e 15 dias e entre os períodos de 15 e 30 dias, com maior grau de reabsorção aos 15 dias; e quanto a perda do tecido ósseo (Fig. 35) entre os períodos de 5 e 15 dias, com maior perda óssea aos 5 dias. Acreditamos que o uso do corante (azul de metileno) associado ao uso do Laser em baixa intensidade não tenham evidenciado resultados favoráveis no estágio inicial do processo de avaliação (5 dias) principalmente pelo fato de que fatores como concentração da droga, pH do meio, presença de exsudato, presença de saliva e material orgânico, possam ter interferido na sua absorção pelas bactérias, além do que, o parâmetro do Laser utilizado no presente estudo talvez não tenha se constituído em dose energética suficiente para alterar a viabilidade das bactérias e promover bioestimulação do tecido infectado. Tal observação reforça os efeitos mais satisfatórios, observados no período de 15 dias onde acreditamos, provavelmente, deveu-se ao efeito bioestimulador do laser neste período experimental.

Na análise comparativa entre os grupos estudados (I, II, III e IV) nos períodos experimentais de 5, 15 e 30 dias, observamos que há respostas biológicas diferenciadas, algumas do ponto de vista estatístico, significantes.

Se atentarmos para os achados descritos na tabela 5, observamos diferenças significantes entre os grupos I e III (0,00351) e entre os grupos I e IV (0,0011) quanto a extensão do processo inflamatório crônico no tecido gengival. Na análise dos escores permite-nos concluir que houve maior extensão do processo inflamatório nos espécimes do grupo III e IV, tratadas com Laser.

Tal observação provavelmente se deve à capacidade do Laser em baixa intensidade promover angiogênese (GARCIA, 1992), proliferação celular (MESTER et al., 1985; ENWEMEKA, 1988), aceleração da síntese de colágeno, inflamação e aceleração dos eventos envolvidos na reparação tecidual (ENWEMEKA, 1988; LAM; ABERGEL, 1986; BASFOR, et al., 1986). Assim, o Laser, por sua capacidade de promover maior aporte vascular da área, favorecerá, conseqüentemente, maior diapedese das células inflamatórias na área tratada.

Há de se registrar ainda que os efeitos biológicos podem ser modificados se algumas variáveis forem consideradas; a intensidade da luz aplicada pode contribuir significativamente para a morte bacteriana (MATEVSKI et al., 2003), além do que a intensidade da luz Laser deve ser suficiente para penetrar significativamente no interior da interface dente/gengiva (BHATTI et al., 1997).

Um outro fator importante que pode estar associado aos resultados obtidos no presente estudo é a dose energética utilizada. Pesquisas demonstram que dose abaixo de 2.2 J/cm^2 pode promover menor absorção de fótons de luz tornando-se insuficiente para a morte bacteriana (MATEVSKI et al., 2003) e, embora tenhamos utilizado no presente estudo, dose compatível com a reparação tecidual (4.5 J/cm^2), a mesma foi insuficiente para a destruição bacteriana. Um outro fator, é o tempo de exposição utilizado que foi de 120 s. Estudos revelam ação letal bacteriana com laser isoladamente, com exposição de 30s e 60s (CHAN; LAI, 2003) enquanto que outros documentam ação letal sobre a microbiota com tempos de exposição excessivamente maiores, de 6 e 12 minutos (GARCIA et al., 1997).

Por outro lado o comprimento de onda utilizado é fator de importância fundamental na viabilidade bacteriana. O comprimento de onda utilizado no presente estudo está na faixa do visível, vermelho (685 nm) o que se torna uma

fonte de luz de escolha, uma vez que determinadas bactérias não possuem fotoreceptores para a absorção em determinados comprimentos de onda e utilizando-se corantes azuis, tornam-nas mais fotossensíveis à luz vermelha (WILSON, 1994).

Deve-se ainda considerar que a ação do Laser em baixa intensidade sobre a viabilidade ou atividade de células bacterianas, está diretamente relacionado com a absorção da luz Laser por um ou mais constituinte celular. (WILSON, 1994). Assim muitas bactérias não possuem constituintes capazes de absorverem luz vermelha ou infra-vermelha, com exceção das *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia* que possuem protohemina e protoporfirina, respectivamente (SHAH et al., 1979) e considerando a heterogenicidade da microbiota presente nos tecidos periodontais dos ratos induzidos pode ter influenciado no grau de absorção do laser pela microbiota.

Por outro lado na análise da tabela 6, observamos diferenças estatisticamente significantes, no período de 15 dias, quanto a inserção do ligamento periodontal, entre os Grupo I e o III (0,0327), entre os grupos II e III (0,0118) e entre os grupos III e IV (0,0076). Assim ficou evidente que o grupo controle (GI) promoveu maior inserção do ligamento periodontal que os espécimes do grupo III, tratados com Laser; que o Laser (grupo III) promoveu menor inserção do ligamento periodontal que o grupo II (azul de metileno) e que o grupo tratado com a associação do azul de metileno e Laser (Grupo IV) apresentou maior inserção do ligamento periodontal que o grupo III, somente Laser.

Estes achados fortalecem nossa observação de que o Laser nos parâmetros utilizados no presente estudo (50 mW, 120 s, 4,5 J/cm², contato) isoladamente não foi suficiente para promover ação letal sobre as bactérias

presentes (grupo III). No entanto a associação da droga fotossensibilizadora (azul de metileno, 100 µg/mL, irrigação da interface dente/gengiva, 1 mL, intervalo 60s) com o Laser no parâmetro descrito anteriormente (Grupo IV), evidenciaram resultados mais satisfatórios que os observados com o uso da droga fotossensibilizadora isoladamente, o que provavelmente se deve à capacidade do Laser modular mais favoravelmente, a resposta biológica do hospedeiro, caracterizado por maior inserção do ligamento periodontal.

Muito embora não tenhamos no presente trabalho a intenção de “tratar a doença” e sim avaliar neste primeiro momento, a ação da terapia fotodinâmica, os resultados obtidos abrem novas perspectivas para a quimioterapia antimicrobiana periodontal. Num futuro próximo, com a realização de novas pesquisas, dentro deste mesmo modelo experimental, provavelmente encontraremos respostas a diferentes questionamentos, como:

- * Qual a droga fotossensibilizadora de escolha adequada para os patógenos periodontais?

- * A irrigação prévia da bolsa periodontal pode tornar as condições mais adequadas para a ação da terapia fotodinâmica?

- * Qual o tempo de intervalo para os tratamentos propostos, após utilização das drogas fotossensibilizadoras?

- * O uso de anticorpos marcados associados às drogas fotossensibilizadoras poderia tornar mais efetivo a terapia fotodinâmica na doença periodontal?

- * Será possível o desenvolvimento de drogas fotossensibilizadoras com maior espectro de absorção das diferentes espécies bacterianas e dos diferentes comprimentos de onda?

* Qual o protocolo de aplicação (tipo de Laser, comprimento de onda, energia, potência, densidade energética, tempo de exposição, entre outros) desejável para o tratamento periodontal?

* Quais as condições desejáveis do tecido periodontal para submetê-lo à terapia fotodinâmica?

Desta forma entendemos que há a necessidade de realização de novos trabalhos capazes de elucidar não só a ação do Laser em baixa intensidade, como das diferentes drogas fotossensibilizadoras e, principalmente, a interação destes, sobre os eventos da reparação periodontal.

Conclusão

*“O artista não é nada sem talento, mas o
talento é nada sem trabalho”
(Émile Zola 1840-1902)*

7 - Conclusão

Diante dos resultados obtidos, nos parâmetros utilizados no presente estudo, nos parece lícito concluir que:

1. Nenhum tratamento proposto influenciou na evolução da doença periodontal induzida em ratos, no período de 5 dias.
2. O tratamento com laser em baixa intensidade isoladamente, interferiu na inserção do ligamento periodontal e na extensão do processo inflamatório crônico aos 15 dias, da periodontite induzida.
3. A terapia fotodinâmica mostrou-se mais efetiva que o laser isoladamente, no extensão da inflamação gengival crônica, no período de 15 dias, no tratamento da doença periodontal induzida.
4. A terapia fotodinâmica utilizada isoladamente, não se mostrou efetiva no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

Referências

*“A preguiça de forma a mente.”
(Henry Ford 1863-1947)*

Referências*

1. ADRIAENS, P. A., DE BOEVER, J. A.; LOESCHE, W. J. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in human. **J. Periodontol.**, v. 59, p. 222-230, 1988a.
2. ADRIAENS, P. A., et al. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J. Periodontol.**, v. 59, n. 8, p. 493-503, 1988.
3. ADRIAENS, P. A., et al. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J. Periodontol.**, v. 59, p. 493-503, 1988b.
4. ALEO, J. J., et al. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. **J. Periodontol**, v. 45, n. 9, p. 672-675, 1974.
5. Al-Watban, F.A.H.; Zhang, X.Y. Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 15, p. 209-215, 1997.
6. AUKHIL, I. Biology of wound healing. **Periodontol 2000**, v. 22, p. 44-50, 2000.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR 6023 informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

7. AVERBAKH, M. M. et al., Effect of helium-neon laser on the healing of aseptic experimental wounds. **Eksp. Khir. Anaesteziol.**, v. 3, p. 56-57, 1976.
8. AWARTANI, F. A.; ZULQARNAIN, B. J. Comparison of the clinical effects of subgingival application of metronidazole 25% gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. **Quintessence Int.**, v. 29, n. 1, p. 41-48, 1998.
9. BABAY, N. Attachment of human gingival fibroblasts to periodontally involved root surface following scaling and/or etching procedures: a scanning electron microscopy study. **Braz. Dent. J.**, v. 12, n.1, p. 17-21, 2001.
10. BABAY, N. Comparative SEM study on the effect of root conditioning with EDTA or tetracycline HCL on periodontally involvrd root surfaces. **Indian J. Dent. Res.**, v. 11, n. 2, p. 53-57, 2000.
11. BACH, G.; NECKEL, C. MALL, C.; KREKELER, G. Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. **Implant. Dent.**, v. 9, n. 3, p. 247-251, 2000.
12. BASFORD, J. R. Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy laser, and occlusion in wound healing in a swine model. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 67, n. 3, p. 151-154, 1986.
13. BAUER, T. W.; et al. Preliminary report of photodynamic therapy for intraperitoneal sarcomatosis. **Ann. Surg. Onc.**, v. 8, p. 254-259, 2001.

14. BAXTER, G. D. Low level laser therapy. Current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.
15. BEERTSEN, W. et al. Generalized cervical root resorption associated with periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 11, p. 1067-1073, 2001.
16. BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1009-1014, 2000.
17. BHATTI, M. et al., A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem. Photobiol.** v. 68, n. 3, p. 370-376, 1998.
18. BHATTI, M. et al., Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. **Photochem Photobiol.** v. 65, n. 6, p. 1026-1031, 1997.
19. BIAGINI, G. et al. In vitro growth of periodontal fibroblasts on treated cementum. **Quintessence Int.**, v. 23, n. 5, p. 335-340, 1992.
20. BISHT, D. et al., Effect on low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian. J. Med. Res.**, v. 100, p. 43-46, 1994.

21. BLOMLÖF, J.P.S. Root cementum apperance in healthy monkeys and periodontitisprone patients after different etching modalites. **J. Clin. Periodont.**, v. 23, n. 1, p. 12-18, 1996.
22. BLOMLÖF, J.P.S., et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 20, n. 6, p. 567-573, 2000.
23. BLOMLÖF, J.P.S.; LINDSKOG, S.F. Periodontal tissue-vitality after diferent etching modalites. **J. Clin. Periodont.**, v.22, p. 464-468, 1995.
24. BOGLE, G. et al. New attachment after surgical treatment and acid conditional of roots in naturally occurring periodontal disease in dog. **J. Periodontal. Res.**, v. 16, n 12, p. 130 – 133, 1981.
25. BREVIK, T. et al., Effects of hippocampal lesioning on experimental periodontitis in Wistar rats. **V. 37**, n. 3, p. 360-365, 2002.
26. CHAN, Y; LAI C. H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, v. 18, n. 1, p. 51-55, 2003.
27. COBB, C. M.; McCAWLEY, T. K.; KILLOY, W. J. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. **J Periodontol.**, v. 63, p. 701-707, 1992.

28. DEPPE, H.; HORCH, H.H.; HENKE, J.; DONATH, K. Per-implant care of ailing implants with the carbon dioxide laser. **Int. J. Oral Maxilofac. Implants.**, v. 16, n. 5, p. 659-667, 2001.
29. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch. Oral Biol.**, v. 37, n. 11, p.883-887, 1992.
30. DORTBUDAK, O. HAAS, O. BERNHART, T. MAILATH-POKORNY, G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. **J. Clin Oral Impl. Res.** v.12, p.104-108, 2001.
31. DÖRTBUDAK, O.; HASS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin. Oral Implants Res.** v. 11, n. 6, p. 540-545, 2000.
32. DÖRTBUDAK, O; et al. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. **Clin. Oral Impl. Res.** v. 12, p. 104-108, 2001.
33. DOUGHERTY, T.J. An update on photodynamic therapy applications. **J. Clin Laser Med and Surg.**, v.20, n.1, p.3-7, 2002.
34. ENWEMEKA, C. S. Laser bioestimulation of healing wounds: Specific effects and mechanisms of action. **J. Orthopedic Sport Phys. Therapy**, v. 9, n.10, p. 333-338, 1988

35. EROGLU, L.; CAGLAYAN, B. Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. **Pharmacol. Res.**, v. 36, n. 5, p. 381-385, 1997.
36. ESPINOSA, C. R. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com laser ou com solução fotossensibilizadora associada ao laser de bioestimulação: estudo histológico em ratos. Marília, 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) – Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília.
37. FARDAL, O.; LOWENBERG, B. F. A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces *in vitro*. **J. Periodontol.**, v. 61, n. 8, p. 529-535, 1990.
38. FERES, M., et al. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections. II. Effect on antibiotic resistance of subgingival species. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, p. 784-792, 1999.
39. FERREIRA, J. P. R. Estudo “in vitro” da ação do laser em baixa intensidade, associado ou não a drogas fotossensibilizadoras, sobre a viabilidade de microrganismos bucais. Marília, 2001. 58p. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) – Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília.
40. GAD, F., et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

41. GARCIA, V. G. Comportamento de feridas cutâneas submetidas à ação do raio laser: estudo clínico, biométrico e histológico em ratos. Araçatuba, 1992. 170p. Tese (livre-Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
42. GARCIA, V.G., PINTO, R.S., PACCA, C.A D., THEODORO, L.H., Estudo in vitro da ação dos raios laser de biostimulação em amostras de streptococcus e sthaphylococcus. **Rev Fac Odontol Lins**, v.10, n.2, p.16-21, 1997.
43. GIULIANA, G.; et al. Occurrence of invading in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 478-485, 1997.
44. GONÇALVES, P. F. **Influência da ciclosporina-A e nifedipina sobre a perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratos.** 2002. 89f. Tese (Mestrado em clínica odontológica na área de Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2002.
45. GOODSON, J. M. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **J. Dent. Res.**, v. 68, p. 625-632, 1989.
46. GOODSON, J.M. Periodontal disease treatment by local drug delivery. **J. Periodontal.**, v. 56, n. 5, p. 265-272, 1985.

47. HAAS, R., BARON, M., DORTBUDAK, O., WATZEK, G. lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE Membrane for the treatment of Peri-implantitis: Preliminary results. **J Oral Maxillofac Implants.**, v.15, p.374-382, 2000.
48. HAAS, R., DORTBUDAK, O., MENSCHORFF-POUILLY, N., MAILATH, G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser *an in vitro study*. **Clin Oral Impl Res.**, v.8, p.249-254, 1997.
49. HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v.5, p. 78-111, 1994.
50. HANES, P. J.; POLSON, A. M.; FREDERICK, G. T. Initial wound healing attachments to desmineralized dentin. **J. Periodontol.**, v. 59, n. 3, p. 176-183, 1988.
51. HATIT, B.Y.; BLUM, R.; SEVERIN, C.; MAQUIN, M.; JABRO, M.H. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: *na in vitro study*. **J. Clin. Laser Med. Surg**, v. 14, n. 3, p. 137-143, 1996.
52. HENRY, C. A.; et al. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Phorphyromonas* and *Prevotella species*. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v. 34, p. 123-128, 1996.
53. HOLT, S.C.; et al. Implantation of bacteroides gingivalis in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. **Science**, v. 239, n. 4835, p. 55-57, 1988

54. HOLZHAUSEN, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 9, p. 1030-1036, 2002.
55. HOLZHAUSEN, M. et al. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 39, n. 3, p. 188-193, 2004.
56. ISIK, A. G. et al. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of desmineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 2, p. 219-225, 2000.
57. JAYASREE, R.S. et al., The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. v. 15, n. 3, p. 176-186, 2001.
58. JEFFCOAT, M. K.; et al. Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 989-997, 1998.
59. JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sulfathiazole administration on the periodontium of the rat. **J. Periodontal. Res.**, v. 10, p. 332-345, 1975.

60. JORDAN, H.V.; KEYS, P.H. Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. **Arch. Oral Biol.** v.32, p. 401-414, 1964.
61. KAMEYA, T. et al., Effect of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. **Laser Therapy**, v. 7, p. 33-36, 1995.
62. KAMMA, J. J.; NAKOU, M.; MANTI, F. A. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 30, p. 66-72, 1995.
63. KANA, J. S., et al., Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, v. 116, n. 3, p. 293-296, 1981.
64. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, v. 56, p. 691-704, 1989.
65. KATO, T.; KUSAKARI, H.; HOSHINO, E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implants and subsequent cellular adhesion to irradiated area. **Laser Surg. Med.**, v.23, n. 5, p. 299-309, 1998.
66. KINANE, D.F.; JOHNSTON, F.A.; EVANS, C. W. Periodontitis modified by systemic factors. **Ann. Periodontol.**, v. 4, n.1, p. 54-64, 1999.

67. KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol**, v. 62, n.1, p. 59-73, 1991.
68. KLEINFELDER, J.W.; MULLER, R.F.; LANGE, D.E., Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. **J. Clin.Periodontol**, v. 26, p.347-351, 1999.
69. KÖMERIK, N.; et al., Fluorescence biodistribution and photosensitizing activity of toluidina blue O on rat buccal mucosa. **Laser Med Sci**. v. 17, p. 86-92, 2002.
70. KÖMERIK, N.; In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 932-940, 2003.
71. KONIG, K.; et al. Red light kills bacteria via photodynamic action. **Cell. Mol. Biol.**, v. 46, p. 1297-1303, 2000.
72. KREISLER, M. et al., Effect of stimulated CO₂ and GaAlAs laser surface decontamination on temperature changes in Ti-plasma sprayed dental implants. **Lasers Surg. Med.**, v. 30, n. 3, p. 233-239, 2002.
73. LAM, T.; ABERGEL, P.; MEEKER, C. et al., Low-energy lasers selectively enhance collagen synthesis. **Lasers Life Sciences**, v. 1, p. 61-77, 1986.

74. LASHO, D. J.; O'LEARY, T. J.; KAFRAWY, A. H. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. **J. Periodontol.**, v. 54, n. 4, p. 210-220, 1983.
75. LEE, P.; KIM, K.; KIM, K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wounds in rats. **Laser Therapy**, v. 5, p. 59-64, 1993.
76. LIMA, M. A.; THEODORO, L.H.; OKAMOTO, T.; MILANEZI, L. A.; GARCIA, V.G. A histologic assessment of the low level therapy associated with photosensitizing drug on impaired wound healing in rats. **Brazilian Dental Journal** , v. 15, p. 113, Resumo 49, 2004.
77. LINDHE, J.; ERICSSON, I. Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in dog. **J. Periodontol**, v.49, n.7, p.343-350, 1978.
78. LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. (Ed.). Patogênese da Periodontite. In: Denis F. Kinane e Jan Lindhe. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.127-152
79. LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. **J. Periodontol**, v. 46, p. 677-680, 1975.
80. LOESCHE, W. J. et al. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. **J. Clin. Periodontol.**, v. 19, p. 103-112, 1992.

81. LOESCHE, W. J. et al. Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. **J. Clin. Periodontol.**, v. 8, n.1, p. 29-44, 1981.
82. LOPES JR. Reparação de feridas de extração dental, infectadas, tratadas com droga fotossensibilizadora associada ou não ao laser de baixa intensidade. Araçatuba, 2000. 98p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Cirurgia e Traumatologia Buço-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Araçatuba.
83. LOWE, A. S. et al., Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. **Laser Surg. Med.**, v. 23, n. 5, p. 291-298, 1998.
84. MAIORANA, C., SALINA, S., SANTORO, F. Treatment of periimplantitis with diode laser: A clinical report. **J. Oral Laser Applications**, v.2, p.121-127, 2002.
85. MALDONADO, E.P. Mecanismos de interação laser-tecido. Apostila do Curso de Mestrado em Lasers em Odontologia. Disciplina LO-03 Interação da Luz Laser com os tecidos biológicos: Aplicações. IPEN. 2000.
86. MALIK, Z. et al. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemi mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. **J. Photochem. Photobiol b.**, v. 6, n. 4, p. 419-430, 1990.

87. MANDALUNIS, P. M.; COSTA, O. R.; UBIOS, A. M., Dynamics of bone loss in experimental periodontitis. **Acta Odont. Latinoamer.**, v. 11, n.1, p. 27-35, 1998.
88. MARIOTTI, A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. **Periodontology 2000**, v. 3, p. 39-63, 1993.
89. MATEVSKI, D.; et al., Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp *in vitro*. **J. Periodont. Res.**, v. 38, p. 428-435, 2003.
90. MATTSON, J. S.; GALLAGHER, S. J.; JABRO, M. H. The use of 2 biosorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 5, p. 510-517, 1999.
91. MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissues. **J. Periodontol.**, v. 47, n.5, p. 256-260, 1976.
92. MESTER, E. et al., Effect of laser rays on wound healing. **Am. J. Surg.**, v. 122, p. 532-535, 1971
93. MESTER, E., et. al., The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. **Laser Rev.**, v.1, p.3, 1968.
94. MESTER, E.; NAGYLUCSKAY, S. DOKLEN, A.; TISZA, S. Laser stimulation of wound healing **Acta Chir. Acad. Sci. Hung.** v. 17, n. 1, p. 49-55, 1976.

95. MESTER, E.; NAGYLUCSKAY, S. DOKLEN, A.; TISZA, S., MESTER, A. Laser stimulation of wound healing by means of laser rays. Part III Investigation of the effect on immune competent cells. **Acta Chir. Acad. Sci. Hung.** v. 19, n. 2, p. 163-170, 1978.
96. MESTER, S. Stimulation of wound healing by means of laser rays: clinical and electron microscopical study. **Acta Chir. Acad. Sci. Hung.**, v. 14, n. 4, p. 347-354, 1973.
97. MESTER, S.; JASZSAGI-NAGY, E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen biosynthesis. **Stud. Biophys.**, v. 35, p. 227-230, 1973.
98. MESTER, S.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.
99. MISERENDINO, L. J.; PICK, R. M. Laser in dentistry. Chicago: *Quintessence*, 1995. 247p.
100. NASSAR, C. A., et al. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. **J. Periodontol. Res.**, v. 39, p. 143-148, 2004.
101. NAVRATIL, L.; KYMPLOVA, J. Contraindications in noninvasive laser therapy: truth and fiction. **J Clin Laser Med Surg.** v. 20, n. 6, p. 341-343, 2002.

102. NIEMZ, M.H. *Laser-Tissue Interactions: fundamentals and applications*. 1 ed., Heidelberg, New York, 1996. 297 p.
103. NOCITI, JR., F.H. et al. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1460-1464, 2000.
104. NOYAN, Ü.; et al. A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 158-165, 1997.
105. NUSSBAUM, E.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630, 660, 810 and 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria *in vitro*. **J. Clin Laser Med Surg** v. 20, n. 6, p. 325-333, 2002.
106. NYMAN, S.; SCHROEDER, H.E.; LINDHE, J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. **J. Periodontol.**, v. 50, n. 9, p. 450-461, 1979.
107. ÖKTE, E. et al. Histological assessment of root cementum at periodontally healthy and diseased human teeth. **J. Oral Sci.**, v. 41, n. 4, p. 177-180, 1999.
108. ÖKTE, E.; BAL, B. Topography of periodontally involved human root surface after different chemical treatment modalities: an *in vitro* scanning electron microscopic study. **J. Oral Sci.**, v. 42, n.3, p. 139-146, 2000.

- 109.OKUDA, K.; TAKAZOE, I. The role of bacteroides gingivalis in periodontal disease. **Adv. Dent. Res.**, v. 2, n. 2, p. 260-268, 1988
- 110.OLIVEIRA, R. W., GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 12, p. 1529-1532, 1999.
- 111.PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab Invest.**, v. 34, n. 3, p. 235-249, 1976.
- 112.PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Karger, Basel, 1982.
- 113.PAGE, R.C. The microbiological case for adjunctive therapy for periodontites. **J. Int. Acad. Periodontol.**, v. 6, n. 4, p. 143-149, 2004.
- 114.PAGE, R.C.; KOMMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontites: an introduction. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 9-11, 1997.
- 115.PILLATI, G. L. **Estudo *in vitro* da capacidade de remoção da *smear layer* da superfície radicular com o uso do gel de EDTA. Influência da concentração, tempo, e forma de aplicação.** 2001, 140f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

- 116.POLSON, A. M. ; CATON, J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. **J. Periodontol.**, v. 53, n.10, p. 617-625, 1982.
- 117.POLSON, A. M. et al. Multicenter comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis. II. Clinical results. . **J. Periodontol.**, v. 68, p. 119-126, 1997.
- 118.POLSON, A. M. et al. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. **J. Periodontol.**, v. 55, n.8, p. 443-446, 1984.
- 119.POLSON, A. M.; PROYE, M. P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J. Periodontol.**, v. 54, n. 3, p. 141-147, 1983.
- 120.RABBANI, G. M.; CAFFESSE, R. G. The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. **J. Periodontol.**, v. 52, p. 119-123, 1981.
- 121.RADVAR, M. et al., Na evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. **Br. Dent. J.**, v. 180, n. 2, p. 57-62, 1996.
- 122.RADVAR, M.; POURTAGHI, N.; KINANE, D. F. Comparison of 3 local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 860-865, 1996.

- 123.RAMS, T. E.; SLOTS, J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontol.** **2000**, v. 10, p. 139-159, 1996.
- 124.REGISTER, A. A.; BURDICK, F. A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. II. Defect Repair **J. Periodontol.**, v. 47, n. 9, p. 497-505, 1976.
- 125.REIS, L. M. **Influência do gel de EDTA a 24% no tratamento da doença periodontal induzida em ratos: análise histológica.** Dissertação. Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de S.J. dos Campos – S. J. dos Campos. 2002. 123p.
- 126.REZENDE, S.B. Ação do diodo laser emitindo em 830 nm, sobre o processo de cicatrização de lesões cutâneas: estudo biométrico e histológico em ratos. Dissertação. Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo. 2001.71 p.
- 127.RIBEIRO, M. S.; ZECELL, D. M. Laser de baixa intensidade. In: Gutknecht, N.; EDUARDO, C. P. **A Odontologia e o Laser.** 1^a ed. São Paulo: Quintessence ed. Ltda, 2004, v. 1, cap. 5, p. 217-240.
- 128.RIEP, B.; PURUCKER, P.; BERNIMOULIN, J. P. Repeated local metronidazole therapy as adjunct to scaling and root planing in maintenance patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, p. 710-715, 1999.

- 129.ROMANOWSKI, A.W.; SQUIER, C.A.; LESCH, C.A. Permeability of rodent junctional epithelium to exogenous protein. **J. Periodontal Res.** , v. 23, n. 2, p. 81-86, 1988.
- 130.ROONEY, J.; MIDDA, M.; LEEMING, J. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a NdYAG laser. **Br. Dent. J.**, v. 176, n. 2, p.61-4, 1994.
- 131.ROVIN, S.; COSTICH, E.R.; GORDON, H.A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J. Periodontal Res.**, v. 1, n. 3, p. 193-204, 1966.
- 132.RYDEN, H. et al. Effect of low levelenergy laser irradiation on gingival inflammation. **Swed. Dent. J.**, v. 18, n. 2, p. 35-41, 1994.
- 133.SALLAY, K. et al., Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontal Res.**, v.17, n.3, p. 263-274, 1982.
- 134.SAMEJIMA, Y.; EBISU, S.; OKADA, H. Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontal. Res.**, v.25, n. 5, p. 308-315, 1990
- 135.SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal. Res.**, v. 28, n. 3, p. 204-210, 1993.

- 136.SCHMIDT, S. et al., Photodynamic laser therapy of carcinomas effects of five different photosensitizers in the colonyforming assay. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 249, n.1, p. 9-14, 1991.
- 137.SELVING, K. A. Discussion: animal models in reconstructive therapy. *J. Periodontol*, v. 65, n. 12, p. 1169-1172, 1994.
- 138.SHAH, P. M. ; et al. Effect of concentration on bactericidal activity of cefotaxime. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 5, n. 4, p. 419-422, 1979.
- 139.SHIBLI, J. A.; et al., Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. **J. Oral Science**1, p. 17-23, 2003.
- 140.SHIBLI, J.A.; et al., Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: A preliminary histologic study in dogs. **J. Periodontol.**, v.74, n. 3, p.338-345, march. 2003.
- 141.SILVA NETO, U.T. Efeito da terapia fotodinâmica no processo de reparação de feridas cutâneas provocadas em ratos diabéticos: estudo morfométrico e histológico. Marília, 2004. 115p. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) – Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília.

142. SKRIPCHENKO, A.; ROBINETTE, D.; WAGNER, S. J. Comparison of methylene blue and methylene violet for photoinactivation of intracellular and extracellular virus in red cell suspensions. **Photochem. Photobiol.**, v. 65, n. 3, p. 451-455, 1997.
143. SLOTS, J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. **J. Clin. Periodontol.**, v.13, n.10, p. 912-917, 1986.
144. SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontol disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.6, p. 351-382, 1979.
145. SLOTS, J.; RAMS, T. E. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. **J. Clin. Periodontol.**, v.17, p. 479-493, 1990.
146. SLUZHAEV, I.F.; KUZAKOVA, G.M. The effect of hlium-neon laser light on the degree of dental caries in children on a outpatient register. **Stomatologia**, v. 68, n. 6, p. 58-60, 1989.
147. SMITH, Q. T.; GEEGAN, S. J. Repeated measurement of cervicular fluid parameters at different sites. **J. Clin. Periodont.**, v. 18, p. 171-176, 1991.
148. SOARES, J. H. et al., Aspectoss morfológicos e histométricos da reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos após irradiação com laser de hélio-neônio. **Acta Cir. Bras.**, v. 4, n. 2, p. 56-60, 1989.

- 149.SOCKANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, p. 134-144, 1998.
- 150.SURINCHAK, J. S. et al., Effect of low-level energy laser on the healing of full-thickness skin defects. **Lasers Surg. Med.**, v. 2, n. 3, p. 267-274, 1983.
- 151.TAKATA, T.; et al. Penetration and uptake of colloidal gold-labeled concanavalin A in the junctional epithelium of the rat. **J. Periodontol.**, v. 59, p. 823-982, 1988.
- 152.TATEVOSSIAN, A.; GOULD, C. T. The composition of the aqueous phase in human dental plaque. **Arch. Oral. Biol.**, v. 21, p. 319-323, 1976.
- 153.TEICHERT, M. C.; et al.; Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.93, n. 8, p. 155-160, 2002.
- 154.TEN CATE, A. R. Desenvolvimento do periodonto. In: **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 12, p. 222-237.
- 155.THEODORO, L. H. et al. Effect of Er-YAG and diode Laser irradiation on the root surface: morphological and thermal analysis. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 6, p. 838-843, 2003.

- 156.TOMASELLI, F.; et al. Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung câncer – a clinical pilot study. **Lasers Surg. Med.**, v. 28, p. 399-403, 2001.
- 157.USACHEVA, M.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidina blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, v. 29, p. 165-173, 2001.
- 158.VAN STEENBERGHE, D.; BERCY, P. KOHL, J. Subgingival minocycline hydrochloride ointment in moderate to severe chronic adult periodontitis: a randomized, double-blind, vehicle-controlled, multicenter study. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 637-644, 1993.
- 159.VANHEUSDEN, A. J. et al. In vitro stimulation of human gingival epithelial cell attachment to dentin by surface conditioning. **J. Periodontol.**, v.70, n.6, p.594-603, jun. 1999.
- 160.WAERHAUG. J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II – As observed on extracted teeth. **J. Periodontol.**, v. 49, n. 3, p. 119-134, 1978.
- 161.WAINWRIGHT, M. et al., Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 44, n. 6, p. 823-825, 1999.

- 162.WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, p. 13-28, 1998.
- 163.WEINBERG, M. A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, p. 335-340, 1999.
- 164.WIKESJÖ, U. M. E.; SELVIG, K. A. Periodontal wound healing and regeneration. **Periodontology 2000**, v. 19, n.7, p. 21-39, 1999.
- 165.WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.**, v. 44, n. 2, p. 181-189, 1994.
- 166.WILSON, M. et al., Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. App. Bacteriol.**, v. 78, n. 3, p. 569-574, 1995.
- 167.WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 22, n. 8, p. 354-357, 1993.
- 168.WOLFSON, E. M.; SELTZER, S. Reactions of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. **J. End.**, v. 1, p. 395-402, 1975.
- 169.WOODRUFF, L.D. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed Laser Surg.**, v. 22, n. 3, p. 241-247, 2004.

- 170.WU-YUAN, C.D.; et al. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. **J. Oral Implantol.**, v.21, n. 3, p. 207-213, 1995.
- 171.YILMAZ, S. et al., Effect of Galium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbial and clinical study, **Lasers Surg. Med.** v. 60, n. 1, p. 60-66, 2002.
- 172.ZAMAN, K.U.; et al., A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 7, p. 1094-1099, 2000.
- 173.ZARET, M.M. et al., Laser Photocoagulation of the eye. **Arch Ophtalmol Fr.**, v. 64, p. 96-104, 1963.
- 174.ZEZELL, D.M., MALDONADO, E.P., RIBEIRO, M.S. Interação laser - tecidos biológicos. Apostila do Curso de Mestrado em Lasers em Odontologia. Disciplina LO-03: Interação da Luz Laser com os tecidos biológicos: Aplicações. IPEN. 2000.

ANEXO – 1 – Aprovação do Comitê de Ética

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE ARAÇATUBA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CURSOS DE ODONTOLOGIA E DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**Ação da terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal induzida: estudo histológico em ratos**” sob responsabilidade do **Prof. Dr. VALDIR GOUVEIA GARCIA e JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 12/05/2003, de acordo com o protocolo nº 32/03.

Araçatuba, 23 de junho de 2003.

Adelina M.S.

Profa. Ass. Dra. Adelina Maria da Silva

Presidente

Juliano Milanezi de Almeida

ANEXO – 2 – Quadro 1

GRUPOS EXPERIMENTAIS		CONTROLE (Ligadura) 5 DIAS					MÉDIA	CONTROLE (Ligadura) 15 DIAS					MÉDIA	CONTROLE (Ligadura) 30 DIAS					MÉDIA
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
G E N G I V A	I N F L A M M A T Ó R I O	ADERÊNCIA	2	2	3	3	2,5	3	2	3	3	3	2,8	3	3	3	3	3,0	
			INTENSIDADE	2	1	1	1	1,25	1	1	1	2	2	1,4	1	1	1	1	1,0
		AGUDA	EXTENSÃO	1	1	1	1	1,0	1	1	1	2	2	1,4	1	1	1	1	1,0
			INTENSIDADE	3	2	2	2	2,25	2	1	2	3	4	2,4	3	2	2	2	2,4
		CRÔNICA	EXTENSÃO	3	2	2	2	2,25	2	1	2	2	4	2,2	3	4	2	2	2,6
			INSERÇÃO	2	2	3	2	2,25	2	1	1	1	1	1,2	1	2	2	1	1,4
	L I G A M E N T O	AGUDA	INTENSIDADE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1,0	
			EXTENSÃO	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1,0	
		CRÔNICA	INTENSIDADE	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1,0	1	2	1	1	1,2	
			EXTENSÃO	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1,0	1	2	1	1	1,2	
		R A D I C U L A R	ATIVA - MAGNITUDE	COM REPARAÇÃO	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1,0
				SEM REPARAÇÃO	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1,2
ATIVA - MAGNITUDE	COM REPARAÇÃO		1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,2	1	1	1	1	1,0		
	SEM REPARAÇÃO		1	2	1	1	1,25	2	2	1	1	2	1,6	2	3	4	2,6		
ATIVA	ATIVA		2	2	3	4	2,75	1	1	1	3	2	1,6	1	2	1	2	1,4	
	INATIVA		1	2	1	1	1,25	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1,0	
MÉDIA DOS ESCORES						1,54						1,37					1,44		

ANEXO – 3 – Quadro 2

GRUPOS EXPERIMENTAIS		Azul de Metileno 5 dias					MÉDIA	Azul de Metileno 15 dias					MÉDIA	Azul de Metileno 30 dias					MÉDIA												
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5													
L I G A M E N T O	G E N G I V A	I N F L A M M A T Ó R I O	ADERÊNCIA	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2,5	2	2	3	3	3	3	3	2,8			
				INTENSIDADE	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1,0	
			AGUDA	EXTENSÃO	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1,0	
				INTENSIDADE	2	3	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,25	1	2	2	2	3	2	2	2,0	
		CRÔNICA	EXTENSÃO	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,25	1	2	2	2	3	2	2	2,0		
			INSERÇÃO	2	2	3	2	3	2	3	2	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	2	1	2	1	1,4		
		L I G A M E N T O	G E N G I V A	AGUDA	INTENSIDADE	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1,0	
					EXTENSÃO	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0
					INTENSIDADE	2	1	2	2	2	1,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	2	1	2	1	1	1,2
					EXTENSÃO	1	1	3	2	3	2,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	2	1	1	1	1,2
R E A B S O R Ç Ã O	R A D I C U L A R	ATIVA - MAGNITUDE	1	1	2	1	1	1,2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0			
			COM REPARAÇÃO	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	2	1	1	1	1	1,2		
		INATIVA	SEM REPARAÇÃO	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,25	1	1	1	1	1	3	1	1	1,4		
			ATIVA - MAGNITUDE	2	1	1	1	1	1,2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0		
		R E A B S O R Ç Ã O	INATIVA	COM REPARAÇÃO	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2,5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,2	
				SEM REPARAÇÃO	1	1	2	1	2	1,4	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1,5	1	1	4	4	4	1	1	1	1	2,8	
T E C I D O	T E C I D O	ATIVA	2	3	3	1	4	2,6	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1,25	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1,2			
		INATIVA	1	1	1	1	1	1,0	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1,5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,2			
MÉDIA DOS ESCORES							1,92										1,23											1,42			

ANEXO – 4 – Quadro 3

GRUPOS EXPERIMENTAIS		LASE R 5 DIAS					MÉDIA	LASE R 15 DIAS					MÉDIA	LASE R 30 DIAS					MÉDIA			
ESPÉCIMES		1	2	3	4	5	2,5	1	2	3	4	5	2,0	1	2	3	4	5	2,2			
G E N G I V A	I N F L A M M A T Ó R I O	ADERÊNCIA	2	4	2	2		2,5	2	2	2	2	2	2,0	2	2	2	2	3	2,2		
		AGUDA	INTENSIDADE	1	4	1	2		2,0	2	1	1	1	1	1,2	1	1	1	1	1	1,0	
			EXTENSÃO	1	4	1	2		2,0	2	1	1	1	1	1,2	1	1	1	1	1	1,0	
		CRÔNICA	INTENSIDADE	2	3	3	3		2,75	3	3	3	2	3	2,8	2	2	2	3	4	2,6	
	EXTENSÃO		4	3	3	3		3,25	3	4	4	4	4	3,8	1	1	1	3	4	2,6		
	L I G A M E N T O	I N F L A M M A T Ó R I O	INSERÇÃO	3	3	3	3		3,0	2	2	2	2	2	2,0	2	1	1	2	1	1,4	
			AGUDA	INTENSIDADE	1	4	1	1		1,75	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1,0
				EXTENSÃO	1	3	1	1		1,5	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1,0
			CRÔNICA	INTENSIDADE	2	2	2	2		2,0	2	2	2	1	2	1,6	2	1	1	2	1	1,4
		EXTENSÃO		3	3	2	3		2,75	2	1	2	1	2	1,6	2	1	1	4	1	1,8	
		R E A B S O R Ç Ã O	R A D I C U L A R	ATIVA - MAGNITUDE	1	1	1	3		1,5	1	1	1	3	1	1,4	1	1	1	1	1	1,0
				INATIVA	COM REPARAÇÃO	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1,0	2	1	2	1	1
SEM REPARAÇÃO					1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1,0
ATIVA - MAGNITUDE				ATIVA - MAGNITUDE	1	1	1	3		1,5	1	1	4	1	3	2,0	1	1	1	1	4	1,6
			COM REPARAÇÃO	1	1	1	1		1,0	1	1	1	1	2	1,2	1	1	1	1	1	1,0	
INATIVA			SEM REPARAÇÃO	1	1	1	1		1,0	2	3	1	1	1	1,6	1	1	3	3	1	1,8	
			ATIVA	3	1	4	4		3,0	1	2	2	2	2	1,8	1	2	2	1	1	1,4	
T E C I D O	ATIVA		1	1	4	4		2,5	4	1	1	1	1	1,6	1	2	1	1	1	1,4		
	INATIVA		1	1	4	4		2,0						1,65						1,47		
MÉDIA DOS ESCORES																						

ANEXO – 5 – Quadro 4

GRUPOS EXPERIMENTAIS		TERAPIA FOTODINÂMICA 5 DIAS					MÉDIAS	TERAPIA FOTODINÂMICA 15 DIAS					MÉDIAS	TERAPIA FOTODINÂMICA 30 DIAS					MÉDIAS		
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5			
G E N G I V A	ESPÉCIMES	I N F L A M M A T Ó R I O	ADERÊNCIA	2	3	2	2	2,25	2	2	3	2	2	2,2	1	3	2	3	3	2,4	
				INTENSIDADE	1	3	1	1	1,5	1	1	1	1	1	1	1,0	1	4	1	1	1,6
			AGUDA	EXTENSÃO	1	4	1	1	1,75	1	1	1	1	1	1,0	1	4	1	1	1	1,6
				INTENSIDADE	1	2	4	2	2,25	2	3	3	2	2	2,4	3	2	3	2	2	1,4
	CRÔNICA	EXTENSÃO	1	2	4	3	2,5	2	3	3	2	2,4	3	2	2	2	2	2	1,2		
		INSERÇÃO	2	2	3	3	2,5	1	1	1	1	1,0	1	1	2	2	1	1	1,4		
	L I G A M E N T O	AGUDA	INTENSIDADE	1	3	1	1	1,5	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1,0	
			EXTENSÃO	1	3	1	1	1,5	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1,0	
		CRÔNICA	INTENSIDADE	1	1	3	3	2,0	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1,0	
			EXTENSÃO	1	1	2	2	1,5	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1,0	
	R E A B S O R Ç Ã O	ATIVA - MAGNITUDE	INTENSIDADE	1	2	2	2	1,75	1	1	1	1	1,0	1	1	2	1	1	1	1,2	
			COM REPARAÇÃO	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1,0	
SEM REPARAÇÃO			1	1	1	1	1,0	1	1	2	1	1,2	1	1	1	1	1	1	1,0		
ATIVA - MAGNITUDE			2	1	1	3	1,75	1	1	4	1	1,6	1	1	2	1	1	1	1,2		
INATIVA		COM REPARAÇÃO	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1	1,0		
		SEM REPARAÇÃO	1	2	1	1	1,25	2	3	1	2	2,0	3	1	4	3	1	1	2,4		
ATIVA		ATIVA	2	4	4	4	3,5	1	1	2	1	1,2	4	3	1	1	1	1	2,4		
		INATIVA	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1,0	1	1	1	1	1	1	1,0		
MÉDIA DOS ESCORES						1,75					1,33							1,48			