



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

ERIVAN CLEMENTINO GUALBERTO JÚNIOR

"Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal mecânico em ratas ovariectomizadas e sob influência sistêmica de nicotina: Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico."

ARAÇATUBA – SÃO PAULO

2013



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

ERIVAN CLEMENTINO GUALBERTO JÚNIOR

"Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal mecânico em ratas ovariectomizadas e sob influência sistêmica de nicotina: Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico."

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do Título de **"DOUTOR EM PERIODONTIA"**.

Orientadora: Prof^a. Adj. *Maria José Hitomi Nagata*

Coorientadores: Prof. Titular *Valdir Gouveia Garcia*

Prof^a. Dr^a. *Letícia Helena Theodoro*

ARAÇATUBA – SÃO PAULO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

G899e Gualberto Júnior, Erivan Clementino.
Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal mecânico em ratas ovariectomizadas e sob influência sistêmica de nicotina : estudo histomorfométrico e imunoistoquímico / Erivan Clementino Gualberto Júnior. - Araçatuba, 2013
103 f. :6 il. ; 3 tab. + 1 CD-ROM

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

Orientadora: Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata

Orientador: Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Helena Teodoro

1. Doenças periodontais 2. Fotoquimioterapia 3. Lasers
4. Nicotina 5. Estrogênios 6. Perda óssea alveolar I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

Erivan Clementino Gualberto Júnior

Nascimento : 15/05/1975 Floriano - Piauí

Filiação : Erivan Clementino Gualberto
 Yára Demes Gualberto

1993 - 1998 : Graduação em Odontologia
 Universidade Federal do Piauí - UFPI

2000 - 2001 : Pós-Graduação em Periodontia - Especialização
 Associação Brasileira de Odontologia, Secção Piauí -
 ABO/PI

2005 - 2006 : Curso de Atualização em Endodontia
 Associação Brasileira de Odontologia, Secção Piauí -
 ABO/PI

2008 - 2010 : Pós-Graduação em Odontologia
 Nível Mestrado - ÁREA DE PERIODONTIA - Faculdade de
 Odontologia de Araçatuba - UNESP

2010 - 2013 : Pós-Graduação em Odontologia
 Nível Doutorado - ÁREA DE PERIODONTIA - Faculdade de
 Odontologia de Araçatuba - UNESP

A Deus

*“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar,
é aproximar-se de Deus.”*

Pitágoras

ELE é o dono de tudo! Devo a ELE a oportunidade de estar vivendo este momento. Sei que muitas pessoas têm a mesma capacidade, mas não tiveram a oportunidade. Obrigado DEUS por ter me dado esta oportunidade! Não sei por que sou merecedor desta conquista, mas sei que não posso desperdiçá-la. Chegamos exatamente onde precisamos chegar, porque a mão de DEUS sempre guia aquele que segue seu caminho com fé e a fé é uma conquista difícil que exige embates diários para ser mantida! Obrigado DEUS por não me deixar afastar de TI e nos momentos de fraqueza me fazer sentir que sempre está comigo mostrando os caminhos que devo seguir. Por mais que eu escreva, louve, adore, te ame, sempre ficarei em falta contigo. E, me perdoa por reclamar e murmurar por coisas tão pequenas diante de TUA grandeza e da vida que o Senhor me deu. Temos lutas, mas em todas o Senhor nos deu JESUS CRISTO que luta e vence por nós!

Toda glória é dada ao Nosso Senhor. Amém.

*“Eu segurei muitas coisas nas minhas mãos e perdi tudo,
mas tudo que coloquei nas mãos de Deus eu ainda possuo!”*

Martin Luther King

Aos meus pais,

Erivan e Yára

“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade.”

Cora Coralina

A conquista de hoje é de vocês tanto quanto minha... Sabemos o preço que pagamos para eu poder viver este momento. Obrigado por sempre estarem dispostos a sacrificarem seus sonhos, seus planos para que eu pudesse realizar os meus. E como foi difícil esta conquista! Foram muitos os momentos de convivência e carinho que não vivemos e que não voltarão! Foram muitos os afagos, os beijos e abraços não dados! Foram muitas as noites sem dormir pela preocupação comigo! Foram muitas as orações para que tudo se resolvesse a acabasse bem! Foram muitos os meus momentos de impaciência e rispidez! Vocês passaram por tudo isto simplesmente porque me amam, porque a felicidade de vocês é a realização dos filhos e me ver feliz é o grande prêmio dos dois! Eis aqui a razão de tudo isso! Cabe a mim agora, valorizar cada noite mal dormida, cada lágrima derramada para que eu pudesse viver este momento!

Se existem palavras para agradecer todas as oportunidades de crescimento que vocês me proporcionaram, todas as coisas de que tiveram que abrir mão para me educar e fazer com que eu chegasse a este lugar... eu não as encontrei. Simplesmente agradeço a tudo isto, também ao amor incondicional, ao carinho que me dedicaram e aos conselhos, entendendo os meus momentos de ausência, inquietude e rispidez.

Obrigado....Eu também os amo muito!!!

Aos meus irmãos

Isamélia, Erick e Ericka

e minha sobrinha Ana Clarice,

*“A Verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo quando todos dizem
que ele é impossível.”*

Cora Coralina

Obrigado por sempre estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida e por fazerem dos meus sonhos os sonhos de vocês. Hoje divido a nossa conquista, a nossa vitória! Penso que nossos pais fizeram um bom trabalho....!!! Nos deram princípios e uma base familiar que nos permitiram ver o quanto é importante um irmão cuidar do outro e que enquanto tivermos uns aos outros seremos fortes. Cada um de nós somos frutos de nossos pais e este respeito e carinho que temos uns aos outros é uma forma de dizer a eles o quanto nós os amamos!

Obrigado por serem parte da minha família e fazerem parte da minha vida... do meu mundo!

Aos meus familiares

Presentes física ou espiritualmente sempre soube de seu apoio e torcida, querendo ver-me galgar os degraus mais altos da vida.

Obrigado!

À Periodontia de Araçatuba

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que nada é ao acaso.”

Antoine De Saint-Exupery

Obrigado por me acolherem e por acreditarem em mim! Vocês abriram a casa de vocês para mim e permitiram que eu voasse, que eu fosse longe na busca dos meus objetivos! Obrigado por fazerem desta conquista, deste momento uma vitória particular de cada um de vocês. Nestes 5 anos de convívio, eu não me fiz só. Sou o resultado do que eu consegui aprender com cada membro desta casa e quando falo membro incluo a todos....professores, colegas de pós-graduação, alunos de graduação e funcionários. Tem um pouco de cada um dentro de mim!

Muito obrigado.

Ao Prof. Valdir Gouveia Garcia,

Idealizador deste projeto

Da mesma forma aquela sentença: “A quem te pedir um peixe, dá uma vara de pescar.” Pensando bem, não só a vara de pescar, também a linhada, o anzol, a chumbada, a isca...

Cora Coralina

Vim a Araçatuba buscando a minha vara de pescar e recebi bem mais que isso! Sei que ainda tenho uma longa estrada, mas também sei que já caminhei boa parte dela e neste caminho eu encontrei o senhor e recebi o teu incentivo. Agradeço a confiança em mim depositada para realizar dois grandes projetos teus, o meu mestrado e o meu doutorado. Nestes projetos me senti desafiado a expandir os meus limites tamanha as interrogações surgidas e como sou grato a estas interrogações que hoje carrego comigo! Há ainda muito o que responder e o senhor me deu estas perguntas. Olhando para trás, reconheço a coragem que teve, no meu mestrado, em entregar um projeto daquela envergadura a um desconhecido que não entendia nada da tua linha de pesquisa. Admiro o respeito que o senhor tem às tuas idéias, aos teus planos, aos teus projetos... e verdadeiramente espero que este projeto, que a mim foi confiado, tenha sido executado a altura do que o senhor imaginou que seria e que as respostas dadas por ele tenha o alcance que o senhor imaginou que teria. Sou um mero executor das tuas idéias e que a partir delas teve suas próprias idéias!

Muito Obrigado!

A Prof.^a *M*aria *J*osé *H*itomi *N*agata,

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.” (Fernando Pessoa)

Sabemos que a travessia não foi fácil, mas conseguimos chegar até o fim! Hoje, sinto-me feliz pela oportunidade de agradecer a tudo que recebi da senhora e sabemos que foi muito! A Senhora é uma mulher de inúmeras qualidades que tantas vezes foram enaltecidas por outros colegas que aqui passaram. Guardo como exemplo, o seu rigor para alcançarmos o padrão de excelência. Perdoe-me pelas inúmeras faltas e Obrigado pelas oportunidades dadas e por corrigir minhas falhas durante esta travessia.

Muito Obrigado!

*A*o Prof. *A*lvaro *F*rancisco *B*osco,

"O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes."

Cora coralina

Inúmeras vezes deixei clara a minha admiração pelo senhor e todas as vezes que assim fiz, agi com orgulho de poder falar que o Senhor é um dos meus Mestres. A sua grandeza extrapola o seu saber e se eleva na sua humildade e na sua generosidade. É um espelho do que eu quero ser e espero um dia alcançar. Ainda tenho muito o que aprender e, neste caminho, quero que continue sendo meu Mestre. Obrigado pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela companhia e por acreditar em mim!

Muito Obrigado!

À Profa. Leticia Helena Theodoro,

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.

Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

Eu tenho muito a agradecer a você! Em especial devo seu empenho pessoal em fazer realidade o meu estágio no exterior, obrigado por ter transformado este meu plano em plano seu também. Você chegou e rapidamente mostrou para o que veio. Dentre suas inúmeras qualidades, admiro em particular o teu jeito de administrar as situações... sempre atenta, observando, e na hora certa sabe decidir como poucos. É de falar pouco e agir muito! A impressão que eu tenho é que você tem uma bateria que não desliga nunca e foi muito bom sugar desta tua energia produtiva. Agradeço tua preocupação com minha produção, meu currículo e todo teu empenho para que eu crescesse neste curso e estivesse preparado para o que vem depois... Grande parte do que conquistei nestes 5 anos de Araçatuba tem o teu dedo, ou melhor..... a tua mão inteira!

Muito Obrigado!

Ao Prof. Juliano Milanezi de Almeida,

“Não sou nada; sou apenas um instrumento, um pequeno lápis nas mãos do Senhor, com o qual Ele escreve aquilo que deseja. Por mais imperfeitos que sejamos, Ele escreve magnificamente.”

Madre Teresa De Calcutá

A convivência com você me fez admirá-lo a cada dia por sua capacidade de se doar ao “sacerdócio de ensinar.” Tenho você como um grande exemplo de amor a profissão e assim como outros desta casa, você se faz grande na sua humildade e generosidade. Como bom professor que é, você tem o dom de cativar, de envolver as pessoas e assim, sem perceber....naturalmente nos prendemos a você, as tuas idéias, aos teus planos. Isto se perpetua por que você sabe respeitar as diferenças inerentes a cada um. Por tua história e por tua trajetória vejo que teu destino é ser GRANDE! Agradeço os ensinamentos e a convivência. Verdadeiramente espero que estas não sejam palavras de despedida, que sejam apenas palavras de reconhecimento e gratidão.

Grande Abraço!

Ao Prof. Leandro Araújo Fernandes,

Você foi o responsável pelos meus primeiros passos nesta empreitada e se hoje alcanço meu título de Doutor este mérito também é teu. Quero que sinta esta conquista como tua! Obrigado pelos ensinamentos, pelos conselhos pela amizade que não se desfaz com o tempo e nem com a distância. Carrego você dentro de mim e vou ser sempre grato pelo que fez!

Um grande abraço e Obrigado!

Às Minhas fiéis escudeiras

Mariellén Longo, Natália de Campos

e Vivian Novaes,

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.”

Ralph Waldo Emerson

Vocês três acreditaram em mim até mesmo quando eu não acreditava e em inúmeras situações me impediram de desistir dos meus planos. Por várias vezes fraquejei e vocês me levantaram mostrando soluções que eu não conseguia ver. Foram os meus Anjos da Guarda....o meu Porto Seguro!!!

Obrigado.

À Mariellén Longo

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.” (Cora Coralina)

E na minha caminhada eu te encontrei! E você fez dela um caminho mais ameno com um sempre presente sorriso nos lábios que diz....“No fim tudo dá certo!”. Um olhar doce e um coração sincero, próprio dos grandes!!! E como foi bom te ver crescer nestes anos e constatar que hoje você está à frente de muitos projetos e assumindo grandes responsabilidades. Porém, o melhor de tudo foi ver que você me ultrapassou, realizando as suas tarefas de uma maneira melhor do que eu as fazia, e isto me faz sentir um orgulho danado, como se fosse um grande prêmio! Você pra mim é muito especial e ter a tua companhia e a tua amizade é um grande privilégio.

Obrigado!!!

À Natália de Campos

“Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos. Não é o quanto damos, mas quanto amor colocamos em dar.”

Madre Teresa de Calcutá

O meu carinho por você é muito especial. A tua bondade e generosidade são raras! Obrigado por fazer dos meus planos os seus planos também, por ter aberto a tua casa e a tua família para mim, colocando-me como parte da tua vida! Uma parcela das boas lembranças de Araçatuba eu devo a você. Obrigado por ter me dado estes momentos, eles estão bem guardados dentro de mim.

Obrigado!!!

À Vivian Noronha,

“Não devemos permitir que alguém saia da nossa presença sem se sentir melhor e mais feliz.” (Madre Tereza de Calcutá)

Em muitos momentos você foi o modelo a ser seguido... conciliando os difíceis papéis de mãe, mulher e esposa às exigências do teu curso de mestrado. Dentre as tuas inúmeras qualidades, tomo como exemplo a tua responsabilidade e o teu compromisso. Penso que formamos um bom time, Você, Mari e Eu... um complementando o outro para que cada um alcançasse o melhor de si. Você foi uma peça fundamental neste quebra-cabeça, muitas vezes juntando as peças ou colando o que sobrou delas...srsrs! Agradeço as inúmeras vezes que você cuidou de mim para que eu não perdesse o rumo e as inúmeras vezes que tornou a minha “travessia” mais branda! É bom chegar ao fim desta etapa e ver que eu não me fiz só e saber que você sente esta conquista como tua também. Penso que este foi o segredo do nosso time...“o nosso estava acima do meu!” Obrigado pelas inúmeras vezes que me ouviu, pelos conselhos, pelos ensinamentos.... Obrigado especialmente por ter aberto pra mim o teu bem mais precioso....a tua casa e a tua família!

Obrigado!!!

À Carolina Santinone e Paula Faleiros

*M*eu muito e sincero obrigado por todos os momentos que vivemos, pela amizade, pelo convívio, pelo respeito mútuo e pelo aprendizado recíproco. Vocês foram importantes para o meu crescimento durante esta empreitada. Saiba que torço profundamente pelos seus sucessos pessoal e profissional.

Obrigado!!!

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino,

Grande Colaborador deste trabalho

“Nada se obtém sem esforço ... e tudo se pode conseguir com ele.”

Ralph Waldo Emerson

Obrigado por teu trabalho incansável para realizarmos este projeto. O senhor é um dos exemplos de dedicação e respeito à ciência que levo de Araçatuba. Obrigado por não poupar esforços e pelo empenho para que eu absorvesse o máximo de informações durante a minha passagem por esta casa. Conviver com o senhor foi um grande privilégio e um grande aprendizado!

Muito Obrigado!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas da Senhora Diretora **Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia** e do Senhor Vice-Diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** por proporcionarem a realização desta pesquisa e crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa da sua Coordenadora **Prof^a. Adj. Maria José Hitomi Nagata** e de todo seu corpo docente pela contribuição na minha formação.

A Prof^a. Adj. **Sônia Regina Panzarini**, a quem admiro pela humildade e saber.

Ao Prof. Dr. **Guilherme de Paula Nogueira**, por abrir seu laboratório de Endocrinologia Animal para a execução de parte deste trabalho e por estar sempre disposto a contribuir.

Aos Professores **Cláudio Aparecido Casatti, Roelf Justino Cruz Rizzolo, Alaide Gonçalves e José Américo de Oliveira**, aos funcionários **André e Sandra** por tornarem o Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba a minha segunda casa nesta faculdade.

Aos meus amigos **André Braga, Alexandre Monteiro, Josélia Oliveira, Lia Raquel e Zoraia Ibiapina** por compartilharem comigo desde a graduação o objetivo de ser mestre e doutor.

Meu agradecimento especial aos amigos **José Vitorino Araújo Júnior e Cláudio Júlio Lopes** por sempre estarem ao meu lado me apoiando.

A ABO/Pi na pessoa do Prof. **Mylton Mesquita Filho**, pela minha formação como periodontista e pelo apoio nesta empreitada.

Agradecimentos

Aos Professores **César** e **Érica Migliorati** pelo empenho para que tudo desse certo durante o estágio na *The University of Tennessee at Memphis*, EUA.

Aos amigos **Amjad**, **Kaled** e **Nagib** pelo o apoio incondicional durante o meu estágio na *The University of Tennessee at Memphis*, EUA.

Aos pós-graduandos do Curso de Pós-Graduação em Odontologia - área Periodontia – **Thiago Martins**, **Ana Cristina**, **Ricardo**, **Luis Esper**, **Michyele Sbrana**, **Michel Messor**, **Natália Pola**, **Fabrizio**, **Adrieli** e **Naida** pela amizade, pelos ensinamentos e pelo convívio.

Aos amigos de Pós-Graduação **Amilcar Chagas**, **Luís Fernando**, **Bruno Carvalho**, **Erica Almeida**, **Heloisa Marão**, **Valentim Barão**, **Juliana Delben**, **Laércio Dias** e **Renato Bigliazzi** pela amizade e convívio. E foram muitos bons momentos juntos! Obrigado!

Ao **Povo de São Paulo**, que por meio de suas instituições me proporcionaram um ensino de qualidade e ferramentas para competir no mercado de trabalho.

A **Capes** pela concessão de Bolsa de Estudo.

A **FAPESP** pela concessão de Bolsa de Estudo (Processo: [2010/15094-2](#)).

As minhas **Ratas**, pelo aprendizado, pelas respostas dadas e principalmente por me oferecerem inúmeras perguntas!!!!!!!!!!

Obrigado!!!

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

*P*refácio

"Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. **Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.**"

Cora Coralina

Gualberto Júnior, EC. **EFEITOS DO LASER E DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO PERIODONTAL MECÂNICO EM RATAS OVARIETOMIZADAS E SOB INFLUÊNCIA SISTÊMICA DE NICOTINA: Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico** [TESE]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2013.

Este estudo avaliou histomorfometricamente, imunoistoquimicamente e pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR) os efeitos da Terapia com Laser em Baixa Intensidade (LLLT) e da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) adjuvantes ao tratamento mecânico da periodontite experimental (PE) em ratas com deficiência de estrógeno e sob influência sistêmica da nicotina. Foram utilizadas 360 ratas, divididas em 4 grupos: Grupo A (SH-vei) normais, Grupo B (SH-nic) - normais tratadas com nicotina, Grupo C (OVX-vei) - ovariectomizadas e Grupo D (OVX-nic) - ovariectomizadas tratadas com nicotina. A administração de nicotina foi iniciada nos animais do Grupo B (SH-nic) e Grupo D (OVX-nic) 30 dias antes da indução da PE. Os animais dos Grupos OVX-vei e OVX-nic foram submetidos à ovariectomia (OVX) bilateral 21 dias antes da PE realizada por adaptação de fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos. Após 7 dias, a ligadura foi removida e os animais subdivididos de acordo com os seguintes tratamentos locais realizados nos molares inferiores direitos e esquerdos: RAR – Raspagem e alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico; LLLT - RAR e irrigação com soro fisiológico associada à LLLT; aPDT- irrigação com azul de toluidina-O (TBO) e após 1 minuto, irradiação com laser em baixa intensidade. Foram eutanasiados 10 animais de cada subgrupo, aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento local. A perda óssea (PO) na furca foi avaliada por meio de análises histomorfométrica e imunoistoquímica. A expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram avaliadas pela qRT-PCR. Os dados foram submetidos à

Resumo

análise estatística ($\alpha = 5\%$). Os animais do Grupo OVX-nic apresentaram maior PO comparativamente ao grupo SH-vei ($p < 0,05$). O tratamento local com aPDT reduziu a PO, diminuiu a expressão de RANKL e o número células TRAP-positivas e aumentou a expressão de OPG e o número de células PCNA-positivas. Os animais tratados com aPDT demonstraram menor expressão de TNF- α (7 dias), IL-1 β (7 e 30 dias) e IL-6 (7 dias) comparados à RAR no Grupo SH-vei e menor expressão de IL-1 β (7 e 30 dias) comparados à RAR no Grupo SH-nic ($p < 0,05$). Concluiu-se que a LLLT não promoveu efeito adicional à RAR e que aPDT foi um adjuvante efetivo à RAR no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas modificadas sistemicamente com nicotina.

Palavras Chaves: Doenças periodontais, estrogênios, fotoquimioterapia, lasers, nicotina, perda óssea alveolar.

Gualberto Júnior, EC. **Effects of laser and photodynamic antimicrobial therapy in mechanical periodontal treatment in ovariectomized rats and under the influence of nicotine systemic: histomorphometric and immunohistochemistry.** [Tese]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2013.

This study evaluated histomorphometrically, immunohistochemically and by polymerase chain reaction via real-time reverse transcriptase (qRT-PCR) the effects of Laser Therapy in Low Intensity (LLLT) and antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) adjuncts to mechanical treatment of periodontitis experimental (PE) in rats with estrogen deficiency and under the influence of systemic nicotine. It was used 360 rats divided into 4 groups: Group SH-veh: sham treated with saline (vehicle); Group SH-nic: sham treated with nicotine; Group OVX-veh: ovariectomized treated with saline (vehicle) and Group OVX-nic: ovariectomized treated with nicotine. Nicotine was administered to groups SH-nic and OVX-nic 30 days before the induction of PE. The animals in Groups OVX-veh and OVX-nic underwent ovariectomy (OVX) bilaterally 21 days before PE performed by adaptation of cotton thread around the first molars right and left. After 7 days, the ligature was removed and the animals divided according to the following local treatments performed in the right and left molars: RAR - Scaling and root planing and irrigation with saline; LLLT - RAR and irrigation with saline associated with LLLT; aPDT - irrigation with toluidine blue O (TBO) and after 1 minute irradiation with LLLT. Ten animals were euthanized of each group at 7, 15 and 30 days after treatment site. Bone loss (BL) in the furcation was evaluated by histomorphometric and immunohistochemical analyzes. The gene expression of TNF- α ,

Abstract

IL-1 β and IL-6 were measured by qRT-PCR. Data were subjected to statistical analysis ($\alpha = 5\%$). The animals of the OVX-nic group showed higher BL group compared with SH-vei ($p < 0,05$). Local treatment with aPDT showed BL reduced, decreased expression of RANKL and the number of TRAP-positive cells and increased the expression of OPG and the number of PCNA-positive cells. aPDT-treated animals showed reduced expression of TNF- α (7 days), IL-1 β (7 and 30) and IL-6 (7 days) compared to the RAR inside SH-veh group and lower expression of IL- 1 β (7 and 30 days) compared to the RAR inside SH-nic group. It was concluded that LLLT did not promote additional effect on RAR and aPDT was an effective adjuvant in the treatment of the RAR to EP in ovariectomized rats with nicotine modified systemically.

Key Words: Periodontal disease, estrogens, photochemotherapy, lasers, nicotine, alveolar bone loss.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequência dos Primers utilizados na análise quantitativa da expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 pela qRT-PCR.	76
Tabela 2	Médias e desvio padrão dos dados histométricos da perda óssea alveolar (mm ²) na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com periodontite experimental induzida, de acordo com cada subgrupo/tratamento e período.	77
Tabela 3	Médias e desvio padrão do número de células PCNA-positivas e TRAP-positivas na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com periodontite experimental induzida, de acordo com cada subgrupo/tratamento e período.	78

Figura 1	(A) Esquema resumindo o delineamento experimental. (B-C) aspecto clínico do fragmento de gengiva removido para análise pela qRT-PCR. (D) fotomicrografia evidenciando a área de furca do primeiro molar inferior onde se realizou a mensuração da: perda óssea (PO - delimitação vermelha) e imunomarcção de RANKL (1- delimitação azul), OPG (2- delimitação azul), TRAP (3- delimitação branca) e PCNA (4- delimitação branca).	79
Figura 2	(A) Gráfico evidenciando a evolução do peso corporal das ratas ao longo do período de experimento. (B) Gráfico mostrando o nível sérico de 17β -estradiol nos diferentes grupos experimentais.	80
Figura 3	Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico dos tecidos periodontais 7 dias após raspagem e alisamento radicular isolado ou em associação com a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) nos diferentes grupos experimentais. A-D: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 7 dias após tratamento com RAR em SH-vei (A), SH-nic (B), OVX-vei (C) e OVX-nic (D). E-F: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 7 dias após tratamento com RAR e aPDT em SH-vei (E), SH-nic (F),	80

OVX-vei (G) e OVX-nic (H). A aPDT reduziu a perda óssea alveolar e a resposta imuno inflamatória na maioria dos grupos experimentais. Abreviações e símbolos: pd, polpa dental; oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: 500 µm.

Figura 4

Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico dos tecidos periodontais 30 dias após raspagem e alisamento radicular isolado ou em associação com a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) nos diferentes grupos experimentais. A-D: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 30 dias após tratamento com RAR em SH-vei (A), SH-nic (B), OVX-vei (C) e OVX-nic (D). E-F: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 30 dias após tratamento com RAR e aPDT em SH-vei (E), SH-nic (F), OVX-vei (G) e OVX-nic (H). A aPDT reduziu a perda óssea alveolar e a resposta imuno inflamatória na maioria dos grupos experimentais. Abreviações e símbolos: pd, polpa dental; oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: 500 µm.

Figura 5	Imunomarcção para TRAP, RANKL, OPG e PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP (setas azuis), RANKL (setas vermelhas), OPG (setas verdes) e PCNA (setas pretas) em SH-vei 7 dias após o tratamento com raspagem e alisamento radicular (RAR) (A, D, G e J) e em OVX-nic 7 dias após o tratamento com RAR (B, E, H e K) ou RAR associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) (C, F, I e L). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; setas azuis, osteoclastos TRAP-positivos; setas vermelhas, células RANKL-positivas; setas verdes, células OPG-positivas; setas pretas, células PCNA-positivas. Contra-coloração: hematoxilina (A-I) e fast green (J-L). Barras de escala: 20 μm.	82
Figura 6	Gráficos evidenciando a expressão gênica de TNF-α (A), IL-1β (B) e IL-6 (C) no tecido gengival nos diferentes grupos experimentais, seus respectivos tratamentos e períodos. Abreviações: #, diferença com RAR ($p < 0,05$), mesmo grupo e período; Ω, diferença com LLLT ($p < 0,05$), mesmo grupo e período; €, diferença com SH-vei ($p < 0,05$), mesmo tratamento e período; ¥, diferença com SH-nic ($p < 0,05$), mesmo tratamento e período; £,	83

diferença com OVX-vei ($p < 0,05$), mesmo tratamento e período. Teste estatístico ANOVA e Tukey.

Lista de Abreviaturas

% - Por cento

± - Desvio padrão

< - Menor que

°C - Graus Celcius

$\alpha 7$ nAChR - Receptor de acetilcolina nicotínico alfa sete

Δ Ct - Ciclos threshold

µg – Microgramas, equivalente à 10^{-6} g

µg/ml – Microgramas por mililitros

µL – Microlitro - Unidade de volume equivalente à milionésima parte de um litro

µm - Micrômetro ou Micrómetro - uma unidade de medida (a milionésima parte do metro)

ACh - acetilcolina

AChRs - receptores de acetilcolina

aPDT- Terapia fotodinâmica antimicrobiana

cDNA - DNA complementar

DAB - Diamino benzidimo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

g - Grama

GaAlAs – Gálio, Alumínio, Arsênio (Arseneto de Gálio e Alumínio)

HRP - Horseradish peroxidase

Lista de Abreviaturas

InGaAlP – Índio, Gálio, Alumínio, Fósforo

IL-1 - Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

J - Joule – Unidade de energia

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

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

LLLT – Terapia a Laser em baixa intensidade. Expressa Low Level Laser Therapy

LPS – Lipopolissacarídeo

M - Molar

mg/kg – Miligrama por quilograma

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

mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro

nAChR – Receptor de acetilcolina nicotínico

nm- Nanômetros. Unidade de distância equivalente a $1,0 \times 10^{-9}$ metros

OPG – Osteoprotegerina

OVX – Ovariectomia

Lista de Abreviaturas

OVX-nic – Ratas ovariectomizadas tratadas com nicotina

OVX-vei – Ratas ovariectomizadas tratadas com solução salina

PBS- Tampão fosfato-salino

PCNA - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PE- Periodontite experimental

pH - Potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogênio

PO – Perda óssea

qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real

RANK – Receptor ativador do fator nuclear kappa beta

RANKL – Receptor ativador do fator nuclear kappa beta ligante

RAR – Raspagem e alisamento radicular

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

SH-nic – Ratas sham tratadas com nicotina

SH-vei – Ratas sham tratadas com solução salina

TBO-O – Azul de Orto-Toluidina

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRAP – Fosfatase ácida tartarato resistente

Watt – Unidade de potência

W - Abreviação de Watt; unidade de potência

Lista de Anexos

Anexo A	Comitê de Ética em Experimentação Animal	84
Anexo B	Normas de publicação da Revista Journal of Clinical Periodontology	85

*S*umário

Manuscrito para publicação	36
Resumo	37
Introdução	40
Materiais e Métodos	43
Resultados	55
Discussão	61
Referências	67
Tabelas	76
Figuras	79
Anexos	84

EFEITOS DO LASER E DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO PERIODONTAL MECÂNICO EM RATAS OVARIETOMIZADAS E SOB INFLUÊNCIA SISTÊMICA DE NICOTINA: Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico*

* Erivan Clementino Gualberto Júnior, DDS, MS.

* Maria José Hitomi Nagata, DDS, MS, PhD.

* Valdir Gouveia Garcia, DDS, MS, PhD.

* Letícia Helena Theodoro, DDS, MS, PhD.

* Disciplina de Periodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Título Resumido (“Running title”): LLLT e aPDT na periodontite em ratas ovariectomizadas sob nicotina.

Palavras Chaves: Doenças periodontais, estrogênios, fotoquimioterapia, lasers, nicotina, perda óssea alveolar.

Autor responsável pela correspondência:

Valdir Gouveia Garcia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio, 1193. CEP: 16015- 050. Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: (55) 18 - 36363239

E-mail: vg.garcia@uol.com.br

Número de figuras: 6

Número de tabelas: 3

* Journal of Clinical Periodontology

Resumo

Este estudo avaliou histologicamente, histometricamente, imunoistoquimicamente e pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR) os efeitos da Terapia com Laser em Baixa Intensidade (LLLT) e da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) adjuvantes ao tratamento mecânico da periodontite experimental (PE) em ratas com deficiência de estrógeno e sob influência sistêmica da nicotina. Foram utilizadas 360 ratas, divididas em 4 grupos: Grupo A (SH-vei) normais, Grupo B (SH-nic) - normais tratadas com nicotina, Grupo C (OVX-vei) - ovariectomizadas e Grupo D (OVX-nic) - ovariectomizadas tratadas com nicotina. A nicotina foi administrada aos animais dos grupos SH-nic e OVX-nic 30 dias antes da indução da PE. Os animais dos Grupos OVX-vei e OVX-nic foram submetidos à ovariectomia (OVX) bilateral 21 dias antes da PE realizada por adaptação de fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos. Após 7 dias, a ligadura foi removida e os animais subdivididos de acordo com os seguintes tratamentos locais realizados nos molares inferiores direitos e esquerdos: RAR – Raspagem e alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico; LLLT - RAR e irrigação com soro fisiológico associada à LLLT; aPDT- irrigação com azul de toluidina-O (TBO) e após 1 minuto, irradiação com laser em baixa intensidade. Foram eutanasiados 10 animais de cada subgrupo, aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento local. A perda óssea (PO) na furca foi avaliada por meio de análises histomorfométrica e imunoistoquímica. A expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram avaliadas pela qRT-PCR. Os dados foram submetidos à análise estatística ($\alpha = 5\%$). Os animais do Grupo OVX-nic apresentaram maior PO comparativamente ao grupo SH-vei ($p < 0,05$). O tratamento local com aPDT reduziu a PO, diminuiu a expressão de RANKL e o número de células TRAP-positivas e aumentou a expressão de OPG e o número de células PCNA-

positivas. Os animais tratados com aPDT demonstraram menor expressão de TNF- α (7 dias), IL-1 β (7 e 30 dias) e IL-6 (7 dias) comparados à RAR no Grupo SH-vei e menor expressão de IL-1 β (7 e 30 dias) comparados à RAR no Grupo SH-nic. Concluiu-se que a LLLT não promoveu efeito adicional à RAR e que aPDT foi um adjuvante efetivo à RAR no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas modificadas sistemicamente com nicotina.

Palavras Chaves: Doenças periodontais, estrogênios, fotoquimioterapia, lasers, nicotina, perda óssea alveolar.

A periodontite é uma infecção bacteriana crônica, caracterizada pela inflamação persistente, desorganização do tecido conjuntivo e destruição óssea alveolar, adicionalmente a continua regulação positiva da resposta pró-inflamatória e dos mediadores imunes (Gupta, 2013). O cigarro é um fator de risco para a doença periodontal (Kibayashi et al., 2007). A nicotina, um dos produtos tóxicos do cigarro, tem sido investigada por seu possível papel no processo de destruição periodontal (Liu et al., 2010), pois está relacionada à diminuição do número e da proliferação de fibroblastos gengivais (Milanezi de Almeida et al., 2011) e ao aumento da atividade clástica e perda óssea alveolar (Garcia et al., 2011). Por outro lado, o estrógeno pode ter um importante papel na doença periodontal inflamatória crônica (Liang et al., 2008) em parte por regular o metabolismo ósseo alveolar (Liang et al., 2008; Garcia et al., 2013; Su et al., 2013). A deficiência de estrógeno provoca um desequilíbrio na sequência de remodelação dos tecidos periodontais (Lerner et al., 2006). Contudo, os efeitos diretos da nicotina e da deficiência de estrógeno sobre o processo de reparo dos tecidos periodontais ainda não estão bem entendidos.

As células do ligamento periodontal expressam e secretam OPG e RANKL, sugerindo que elas podem regular o metabolismo ósseo alveolar através do sistema RANK/RANKL/OPG (Liang et al., 2008). A ovariectomia e a nicotina interferem no metabolismo ósseo, através da regulação do sistema RANK/RANKL/OPG, levando a regulação negativa de OPG e regulação positiva de RANKL, favorecendo o aumento de células clásticas TRAP-positivas (Lee et al., 2009; Garcia et al., 2011; Said et al., 2012; Garcia et al., 2013; Su et al., 2013). A ovariectomia leva ao aumento de citocinas inflamatórias, entre elas a IL-1 β e o TNF- α que são os mais potentes estimuladores osteoclastogênicos sob condições de deficiência de estrógeno (Tyagi et al., 2012; Su et

al., 2013). Por outro lado, a nicotina está relacionada com a inibição da resposta inflamatória protetora por diminuir o nível de citocinas inflamatórias, entre elas o TNF- α , IL-1e IL-6 (Breivik et al., 2009; Chen et al. 2011; Hao et al., 2011; Lee et al, 2013).

A nicotina (Garcia et al., 2011) e a deficiência de estrógeno (Garcia et al., 2013) atrasam o processo de reparo periodontal após a raspagem e alisamento radicular (RAR). Apesar da RAR, na grande maioria dos casos, resultar em melhora clínica, nenhuma das técnicas de instrumentação atualmente avaliadas são capazes de atingir a eliminação completa das bactérias e cálculo subgengival (Drisko et al., 2001). Estas limitações poderiam ser atribuídas a vários fatores como a complexa anatomia dos dentes, invasão dos patógenos periodontais para os tecidos moles adjacentes ou possível recolonização da bolsa periodontal de outro sítio doente ou nicho intraoral (Ramfjord et al., 1987; Giannobile, 2008). Adicionalmente, a instrumentação mecânica pode não alcançar sítios de difícil acesso como bolsas profundas e região de furca (Fleischer et al., 1989; Brayer et al., 1989). Por conta destas limitações, vários tratamentos adjuvantes tem sido desenvolvidos com o intuito de melhorar a efetividade clínica da RAR (Sanz et al., 2008).

A terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) é reconhecida pelo seu efeito bioestimulador sobre os estágios do processo de reparação (Sanz et al., 2008). Na periodontia a LLLT tem sido usado como tratamento periodontal adjuvante, após a terapia periodontal não cirúrgica (Qadri et al., 2005; Aykol et al., 2011), para alcançar melhor cicatrização da ferida periodontal (Ishikawa et al., 2009; de Paula Eduardo et al., 2010). A LLLT reduz a inflamação gengival (Obradović et al., 2012) e melhores resultados terapêuticos foram alcançados quando a LLLT foi aplicada durante a terapia

periodontal básica comparada a terapia periodontal básica sozinha (Qadri et al., 2005; Aykol et al., 2011).

A Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma técnica que combina a energia de um laser com um fotossensibilizador, produzindo oxigênio singlete e radicais livres capazes de induzirem a morte de células alvos (Konopka et al., 2007). Devido seu efeito antibacteriano, incluindo a habilidade de matar bactérias periodontopatogênicas, esta técnica está sendo estudada por seu potencial para o tratamento da doença periodontal. Estudos em animais mostraram que a aPDT foi efetiva no controle da periodontite experimental (PE) (de Almeida et al., 2008a; de Almeida et al., 2008b; Fernandes et al., 2009; Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2013) e tem ação reguladora no metabolismo ósseo alveolar aumentando a expressão de OPG e diminuindo a expressão de RANKL e o número de células clásticas TRAP-positivas (Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análises histológica, histométrica, imunoistoquímica e de expressão gênica via qRT-PCR, o efeito da LLLT e da aPDT como adjuvante a RAR no tratamento da periodontite experimental induzida em ratas ovariectomizadas sistemicamente modificadas com nicotina.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - Protocolo 2010- 005074).

Modelo experimental

Neste estudo, foram utilizadas 360 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 275 g. Os animais apresentaram-se saudáveis e em condições de serem submetidos aos procedimentos operatórios. Eles foram mantidos em gaiolas plásticas com cinco animais cada, em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), com água e ração *ad libitum*. As ratas foram divididas aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: Grupo A (SH-vei) normais, Grupo B (SH-nic) - normais tratadas com nicotina, Grupo C (OVX-vei) - ovariectomizadas e Grupo D (OVX-nic) - ovariectomizadas tratadas com nicotina.

Administração da nicotina

As ratas dos grupos B (SH-nic) e D (OVX-nic) receberam duas injeções subcutâneas diárias de nicotina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) na dosagem de 3 mg/kg de peso corporal, com intervalo de 12 horas entre as aplicações (Bosco et al., 2007). As injeções foram iniciadas 30 dias antes da indução da periodontite experimental e mantidas até os respectivos períodos de eutanásia. As injeções foram aplicadas no dorso dos animais. As ratas foram pesadas semanalmente durante todo o período experimental para garantir a manutenção da dose de nicotina aplicada. O preparo da nicotina foi realizado através da diluição desta em solução fisiológica na concentração de 5 mg/ml (BOSCO et al., 2007).

Objetivando produzir o mesmo nível de estresse provocado nas ratas dos grupos B e D, as ratas dos grupos A (SH-vei) e C (OVX-vei) receberam duas injeções subcutâneas diárias de soro fisiológico estéril, com intervalo de 12 horas entre as aplicações, também iniciadas 30 dias antes da indução da PE e mantidas até os respectivos períodos de eutanásia.

Procedimento cirúrgico da ovariectomia

As ratas dos grupos OVX-vei e OVX-nic foram submetidas à ovariectomia (OVX) bilateral 21 dias antes da indução da PE (Duarte et al., 2004; Garcia et al, 2013) (Figura 1A). Antes da realização do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Ketamina (70 mg/kg peso corporal) (Dopalen, AgribRANDS Purina do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina (6 mg/kg peso corporal) (Anasedan, AgribRANDS Purina do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil). Em seguida, foi realizada a tricotomia bilateral da região ventral e anti-sepsia com solução de digluconato de clorexidina a 0,12% (Farmácia de Manipulação Aphoticário, Araçatuba, SP, Brasil). O ovário e a gordura circundante foram excisados. As suturas internas foram realizadas com fio absorvível Vicryl 4-0 (Vicryl 4-0, Ethicon Products, Johnson & Johnson, Somerville, NJ, EUA) e as suturas externas com fio de seda 4-0 (Ethicon Products, Johnson & Johnson, Somerville, NJ, EUA). Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24.000 UI de penicilina (Pentabiotico* Veterinario Pequeno Porte, Fort DodgeR Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) no pós-operatório imediato.

Objetivando produzir o mesmo nível de estresse provocado nas ratas dos grupos OVX-vei e OVX-nic, as ratas dos grupos SH-vei e SH-nic foram submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a remoção dos ovários (SHAM).

Ciclo estral e radioimunoensaio

Os sucessos dos procedimentos de OVX e SHAM foram confirmados pelo monitoramento do ciclo estral e pela dosagem dos níveis de estrógeno circulante por radioimunoensaio.

Duas semanas após as cirurgias OVX e SHAM, todas as ratas foram submetidas ao exame de esfregaço vaginal para avaliação do ciclo estral durante cinco dias consecutivos. Este procedimento foi repetido cinco dias após a realização de cada um dos tratamentos locais. Para realização desse exame, uma pequena quantidade de solução salina foi depositada no interior da vagina da rata e rapidamente aspirada. (Garcia et al. 2013). Além disso, amostras do sangue periférico foram coletadas por punção cardíaca, no momento da eutanásia, para análise dos níveis séricos de estradiol por radioimunoensaio.

O radioimunoensaio foi realizado para dosagem dos níveis séricos de 17β -estradiol e confirmação do sucesso das cirurgias de OVX e SHAM. As amostras de soro foram analisadas com o Kit Coat-A-Count Estradiol (17β -estradiol double antibody, KE2D; Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, EUA) e medidas por 60s em um contador gama (Packard Cobra™ II Auto Gamma Counter; Packard Bioscience, Meriden, CT, EUA). A menor concentração alcançada neste exame foi de 2,8087 pg/mL. Os coeficientes intraensaio variaram de 6,29% (controle alto) para 0,04%

(controle baixo). Todos os kits usados foram provenientes do mesmo número de lote.

Um volume de 100 µL de soro foi usado em cada tubo.

Protocolo da periodontite experimental (PE)

Decorridos 30 dias do início da administração de nicotina (Garcia et al., 2011) e 21 dias da realização das cirurgias de OVX ou SHAM (Duarte et al., 2004; Garcia et al., 2013), a PE foi induzida em todos os grupos de animais (Figura 1A). Após a realização da anestesia geral como descrita para os procedimentos de OVX e SHAM, uma ligadura de algodão (Corrente Algodão nº.24; Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) foi adaptada ao redor dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos, com auxílio de uma pinça modificada para este fim e mantida em posição subgengival por meio de nós cirúrgicos durante 7 dias para a indução da PE.

Subgrupos experimentais

Após 7 dias de indução da PE, a ligadura adaptada nos primeiros molares inferiores esquerdos e direitos dos animais de todos os grupos foi removida. Os animais de cada grupo foram, subdivididos aleatoriamente, seguindo uma tabela gerada em computador, em subgrupos de acordo com os seguintes tratamentos locais que foram realizados nos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos: RAR (n=30): Raspagem e alisamento radicular e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; LLLT (n=30): RAR e irrigação com 1 ml de soro fisiológico associada à LLLT; aPDT (n=30): irrigação com 1 ml de azul de toluidina-O na concentração de 100 µg/ml e após 1 minuto, aplicação da LLLT (aPDT) (Figura 1A).

O procedimento de RAR foi executado com cureta manual “mini – five” n°. 5 e 6 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, EUA), realizando 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com a mesma cureta realizando dez movimentos de tração cérvico-oclusais (Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2013).

As soluções de soro fisiológico e TBO foram depositadas, lentamente, no interior da bolsa periodontal, utilizando uma seringa e agulha de insulina sem bisel.

O Laser de baixa potência utilizado no presente estudo foi o THERA LASE® (TheraLase®, DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil), que possui as seguintes características: Emissores InGaAlP (660 nm, laser visível) e GaAsAl (808 nm, laser infravermelho), emissão contínua e pulsada, sistema de entrega com fibra ótica, diâmetro do spot 0,0283 cm². Nos animais tratados com LLLT e aPDT a irradiação laser foi realizada em 3 pontos equidistantes na face vestibular e lingual, do primeiro molar inferior direito e esquerdo, utilizando o seguinte protocolo:

- Emissor : InGaAlP
- Comprimento de onda: 660 nm (laser visível)
- Potência: 35 mW (0,035W)
- Modo de operação: laser contínuo
- Modo de irradiação: laser contato, pontual
- Energia: 0,14 J/ponto
- Tempo de exposição por ponto: 4 s
- Número de sessões de aplicações: única
- Quantidade de pontos de aplicação: 6
- Tempo de exposição total: 24 s
- Densidade energética / ponto: 4,9 J/cm²
- Densidade energética total: 29,4 J/cm²
- Irradiância: 1,23 W/cm²

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

Após 1 minuto da irrigação subgengival com 1mL de TBO (TBO - Toluidine Blue-O, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), a irradiação laser (29,4 J/cm²) foi realizada em 3 pontos equidistantes na face vestibular e lingual dos molares inferiores direitos e esquerdos com os mesmos parâmetros de irradiação descritos anteriormente.

Períodos experimentais

Dez animais de cada subgrupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos locais da PE (Figura 1A) pela administração de uma dose letal de Tiopental (150 mg/kg de peso corporal) (Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil). As mandíbulas foram removidas e separadas. As hemimandíbulas direitas foram destinadas à análise da expressão gênica por meio da qRT-PCR. As hemimandíbulas esquerdas foram destinadas às análises histológica, histométrica e imunoistoquímica.

Coleta do tecido gengival para a análise da expressão gênica

Imediatamente após a eutanásia dos animais, amostras do tecido gengival ao redor do primeiro molar inferior direito (Figura 1B-C), foram coletadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi 15C (Swann-Morton[®] Ltda., Sheffield, Inglaterra) e destinadas para a extração gênica de RNA total. Durante a coleta, as amostras foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS). Posteriormente, as amostras coletadas foram armazenadas em microtubos “PCR clean” de 1,5 mL (Eppendorf AG , Hamburgo, Alemanha) estéreis contendo 500µL de Trizol (TRIzol[®], Life Technologies/Invitrogen[™], Carlsbad, CA, EUA) e mantidas em nitrogênio líquido até serem armazenadas em freezer a -80°C.

Procedimentos laboratoriais

As hemimandíbulas esquerdas foram fixadas em formaldeído 4% por um período de 48 horas. Após fixação, os espécimes obtidos foram lavados em água corrente e descalcificados em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%. A solução de EDTA foi trocada semanalmente por 8 semanas. Após inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados (4 µm) foram obtidos no sentido mésio-distal. Os cortes foram corados com Tricrômico de Masson (TM), ou hematoxilina e eosina (HE), ou submetidos à técnica imunoistoquímica.

Para as reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em uma série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada pela imersão das lâminas histológicas em solução de tampão citrato (pH 6,0) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chambre, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95° C durante 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica as lâminas histológicas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com 3% de peróxido de hidrogênio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), durante 1 hora, e 1% de soro albumina bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), durante 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários, durante 24 horas, em câmara úmida (Easy Path® – Erviegas, DuraEdge, Birgminham, AL, EUA); anti-Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP) do rato gerada em cabra (1:100; SC 30833 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β

(RANKL) do rato gerado em cabra (1:100; SC 7628 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-Osteoprotegerina (OPG) do rato gerada em cabra (1:100; SC 8468 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) do rato gerado em camundongo (1:100; VP 980 - Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Em seguida os cortes histológicos foram incubados em anticorpo secundário, durante 1 hora, e posteriormente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), durante 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit, Dako Laboratories, Carpinteria, CA, EUA). A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada com o cromógeno 3, 3' – tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração foi efetuada com hematoxilina, para TRAP, RANKL e OPG, e *fast green*, para PCNA. Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, onde se suprimiu a utilização dos anticorpos primários.

Análise dos Resultados

Análise histológica e histométrica

Os cortes histológicos foram analisados sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Axiostar plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). Os cortes corados pela técnica de TM foram utilizados para a análise da área de perda óssea (PO) alveolar, em mm², na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos (Figura 1D). Os cortes corados pela técnica da HE foram utilizados para a análise

histopatológica do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos.

Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistante de cada espécime foram selecionados para análise histológica e histométrica (Garcia et al, 2011). Esta seleção foi realizada por um examinador (LHT) treinado e cego ao tratamento efetuado. Outro examinador (ECGJ) calibrado e cego ao tratamento efetuado realizou a análise histológica e histométrica. A PO alveolar na região de furca foi determinada utilizando um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). A PO alveolar de cada espécime foi medida três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados (Garcia et al, 2013). As três medidas obtidas foram submetidas à análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa).

Análise imunoistoquímica

Os cortes histológicos foram analisados sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Axiostar plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). A imumarcacão foi definida como aquela de coloração acastanhada. A imunomarcacão para TRAP e PCNA foi realizada pela contagem de células TRAP-positivas e PCNA-positivas localizadas no centro do septo interradicular do primeiro molar inferior esquerdo de uma área de 1000µm x 1000µm (Figura 1D), com um aumento de 200x (Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2013) em três cortes histológicos equidistante. O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 1000µm (Figura 1D). Foi efetuada uma análise

quantitativa das células multinucleadas TRAP-positivas (Hassumi et al, 2009). A imunomarcção para RANKL e OPG foi realizada empregando-se uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcção constatado no tecido ósseo e no ligamento periodontal dos dois terços coronários da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo (Figura 1D). Foram utilizadas três secções equidistantes de cada animal e o critério para o estabelecimento do padrão de imunomarcção foi modificado de Kim et al. (2007) e Garcia et al. (2013), onde: alto padrão de imunomarcção (cerca de $\frac{3}{4}$ das células imunorreativas por área), moderado padrão de imunomarcção (cerca de $\frac{1}{2}$ das células imunorreativas por área), baixo padrão de imunomarcção (cerca de $\frac{1}{4}$ das células imunorreativas por área) e, padrão de imunomarcção nulo (ausência total de células imunorreativas).

Um examinador (LHT) treinado e cego aos tratamentos selecionou as lâminas para as análises imunoistoquímica. Um outro examinador (ECGJ) calibrado e cego aos tratamentos, conduziu a análise dos dados. Os valores de cada espécime foram atribuídos três vezes pelo mesmo examinador em dias diferentes para reduzir a variação nos dados. As três medidas obtidas foram submetidas à análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa).

Reprodutibilidade Intraexaminador

Antes das análises histométrica e imunoistoquímica serem realizadas, o examinador foi treinado pela dupla medida de 30 espécimes com uma semana de intervalo. A paridade foi calculada pelo teste T-student e não foram observadas diferenças entre a média dos valores das duas medidas ($P < 0,05$). Adicionalmente o coeficiente de correlação de

Pearson revelou alta correlação (0,95) entre as duas medidas para as análises histométrica e imunoistoquímica.

Detecção da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 pela qRT-PCR

Para avaliar a resposta inflamatória, utilizou-se a detecção da expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 por meio da qRT-PCR. O RNA foi isolado da gengiva das ratas por meio de processamento automatizado (QIAcube[®], QIAgen, Hamburgo, Alemanha) usando RNasy Lipid Kit (QIAgen, Hamburgo, Alemanha). A qualidade do RNA obtido foi avaliada pelo equipamento NanoDrop 1000 (ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado de 7,7 μ L do total de RNA diluído, DNase-tratado, usando o MultiScribe[™] Reverse Transcriptase reagente kit (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, EUA). O cDNA resultante foi submetido à qRT-PCR usando o TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix Kit (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, EUA). As reações foram realizadas em um volume total de 10 μ L contendo 5 μ L de TaqMan[®] Master Mix; 0,1 μ L de “right primer”; 0,1 μ L de “left primer”; 0,1 μ L da sonda; 2,7 μ L de água e 2 μ L de DNA (Tabela 1). A qRT-PCR foi realizada no equipamento Bio-Rad CFX96[™] Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories Inc., Berkeley, CA, EUA) e analisada usando o software Bio Rad CFX manager (Bio-Rad Laboratories Inc., Berkeley, CA, EUA). O protocolo consistiu de 50 ciclos de 95°C por 5 minutos, 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 10 segundos. Todo o experimento da qRT-PCR foi realizado em duplicata. O cálculo para o valor dos níveis da expressão gênica foram normalizados para os níveis do gene Cyclophilin B. Foram feitos testes com os genes endógenos Cyclophilin B, Tubulin, β -actin, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), TATA binding

protein (TBP) e proteína ribossomal S19. A Cyclophilin B foi escolhida para o controle endógeno por apresentar a menor variação entre os genes testados. A normalização para Cyclophilin B foi feita por meio do Ciclo Threshold (CT) através da equação $\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{controle endógeno})}$. Os dados obtidos em cada tratamento e período foram submetidos à análise estatística.

Análise estatística

A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa nos dados das análises propostas entre os grupos e tratamentos foi testada pelo “software” BioEstat 5.0 (Bioestat, Sonopress Indústria Brasileira, Manaus, AM, Brasil). Para a avaliação da normalidade, os dados histométricos e imunoistoquímicos quantitativos foram analisados usando o teste de Shapiro-Wilk. As análises histométrica e imunoistoquímica quantitativa intergrupo e intragrupo foram feitas com uma análise de variância a dois critérios (ANOVA; $P < 0,05$). Quando o teste ANOVA detectou uma diferença significativa, múltiplas comparações foram feitas usando o teste Tukey (para histometria da PO e imunoistoquímica para TRAP) e Bonferroni (para imunoistoquímica PCNA) com nível de significância de 5%. A expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi analisada com ANOVA ($P < 0,05$) a dois critérios com nível de significância de 5%. Quando ANOVA detectou uma significativa diferença foi realizado o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Análise do Peso corporal dos animais

A nicotina afetou negativamente o peso dos animais nos grupos SH-nic e OVX-nic. Este efeito aumentou com o tempo (Figura 2A).

Análise do Ciclo Estral e Radioimunoensaio

Durante a realização do ciclo estral os animais dos grupos SH-vei e SH-nic apresentaram mudanças nos tipos celulares no esfregaço vaginal, demonstrando os quatro estágios do ciclo estral (estro, metaestro, diestro e proestro). A fase diestro, que consiste principalmente em leucócitos e algumas células epiteliais, sendo marcada por baixos níveis de estrógeno, se manteve nos animais dos grupos OVX-vei e OVX-nic.

A análise de radioimunoensaio mostrou que a média dos níveis séricos de 17β -estradiol circulantes nos grupos SH-vei (45,74 pg/mL), SH-nic (43,08 pg/mL), OVX-vei (22,10 pg/mL) e OVX-nic (20,78 pg/mL) (Figura 2B).

Análise Histológica

Raspagem e alisamento radicular (RAR): Aos 7 e 15 dias os grupos SH-vei, SH-nic, OVX-vei e OVX-nic apresentaram um tecido conjuntivo composto por uma delicada rede de fibras colágenas, uma moderada quantidade de fibroblastos e um intenso infiltrado inflamatório, composto predominantemente por polimorfonucleares neutrófilos, que se mostrou exacerbado nos grupos que receberam a nicotina (SH-nic e OVX-nic). O septo interradicular se mostrou constituído por delgadas trabéculas ósseas, de contorno externo bastante irregular em função da grande quantidade de osteoclastos em fraca atividade, em

especial nos grupos SH-nic, OVX-vei e OVX-nic (Figura 3 A-D). Em alguns espécimes foram observadas espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias na região da furca, principalmente no Grupo SH-nic e OVX-nic. Aos 30 dias o grupo SH-vei apresentou um tecido conjuntivo mais organizado, rico em fibras colágenas, com moderada quantidade de fibroblastos e com um infiltrado inflamatório crônico mais discreto. Neste período os grupos SH-nic, OVX-vei e OVX-nic apresentaram um tecido conjuntivo ainda desorganizado e com um moderado infiltrado inflamatório, composto por células mononucleadas e polimorfonucleares neutrófilos (Figura 4 A-D). Em todos os grupos experimentais neste período a espessura das trabéculas ósseas foi progressivamente aumentada, exceto em OVX-nic.

Terapia com laser em baixa intensidade (LLLT): Aos 7 dias o grupo SH-vei apresentou um tecido conjuntivo fibroso na região de furca com um discreto infiltrado inflamatório. Neste mesmo período os grupos SH-nic, OVX-vei e OVX-nic apresentaram um tecido conjuntivo composto por uma rede mais delicada de fibras colágenas, uma moderada quantidade de fibroblastos e um infiltrado inflamatório moderado em SH-nic e OVX-vei, e intenso em OVX-nic. O septo interradicular se mostrou constituído por finas trabéculas ósseas em todos os grupos experimentais, especialmente em OVX-nic, onde a quantidade de osteoclastos mostrou-se muito elevada. Aos 15 dias as características histológicas foram similares as descritas no período anterior, no entanto, houve uma redução proporcional no volume ocupado pelo do infiltrado inflamatório. Aos 30 dias o grupo SH-vei apresentou um tecido conjuntivo com grande quantidade de fibras colágenas, com poucos fibroblastos e raros focos isolados de células inflamatórias. Nos grupos SH-nic, OVX-vei e OVX-nic o tecido conjuntivo se mostrou constituído por uma moderada

quantidade de fibroblastos, riqueza de fibras colágenas e um infiltrado inflamatório mais discreto que o apresentado anteriormente. O tecido ósseo do septo interradicular se apresentou composto por trabéculas ósseas mais espessas em todos os grupos, especialmente em SH-vei.

Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT): Aos 7 dias pós-tratamento os grupos experimentais apresentaram um tecido conjuntivo com moderada quantidade de fibras colágenas, rico em fibroblastos e com um infiltrado inflamatório discreto nos grupos SH-vei e OVX-vei, e moderado nos grupos SH-nic e OVX-nic (Figura 3 E-H). Aos 15 dias o volume do infiltrado inflamatório sofreu uma redução proporcional nos respectivos grupos experimentais. O contorno do septo interradicular se mostrou bastante irregular especialmente no grupo OVX-nic, onde se observou muitos osteoclastos em franca atividade. O osso do septo interradicular se mostrava constituído por trabéculas ósseas mais finas aos 7 dias e que se tornaram mais espessas aos 15 dias. Em alguns espécimes do grupo SH-vei foi observado osso neoformado na porção mais coronária do septo interradicular. Aos 30 dias o tecido conjuntivo na região de furca se mostrou composto por uma grande quantidade de fibras colágenas, poucos fibroblastos e diminutos focos isolados de células inflamatórias e as trabéculas ósseas se mostraram proporcionalmente mais espessas (Figura 4 E-H).

Análise histométrica

Os animais dos grupos SH-nic (RAR, LLLT e aPDT) e OVX-nic (RAR) mostraram maior PO após os tratamentos locais, quando comparados aos animais dos grupos SH-vei aos 15 dias ($p < 0,05$). Os animais OVX-vei e OVX-nic mostraram maior PO,

quando comparados aos animais do grupo SH-vei aos 7 dias ($p < 0,05$), exceto os tratados com aPDT do grupo OVX-vei. Os animais dos grupos OVX-vei e OVX-nic mostraram menor PO, quando comparados aos animais do grupo SH-nic aos 15 dias ($p < 0,05$), exceto os animais do Grupo OVX-nic tratados com RAR (Tabela 2).

Os animais tratados com a aPDT mostraram menor PO quando comparados aos animais tratados com RAR nos grupos SH-vei (7 dias), OVX-vei (7 e 30 dias) e OVX-nic (7 e 15 dias). Os animais tratados com LLLT mostraram menor PO quando comparados aos animais tratados com RAR no grupo OVX-vei aos 7 dias (Tabela 2).

Avaliação Imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de TRAP, RANKL, OPG e PCNA mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo. As células imunorreativas apresentaram uma coloração acastanhada. A imunomarcação foi expressa predominantemente em osteoclastos, para TRAP (Figura 5 A-C); osteoblastos e fibroblastos, para RANKL (Figura 5 D-F) e OPG (Figura 5 G-I), e células conjuntivas e da superfície do osso, para PCNA (Figura 5 J-L).

Os animais dos grupos SH-nic e OVX-nic mostraram maior número de células TRAP-positivas após as terapias locais, quando comparados aos animais dos grupos SH-vei e OVX-vei, respectivamente, em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Os animais tratados com aPDT mostraram menor número de células TRAP-positivas quando comparados aos animais tratados com RAR aos 7 dias em todos os grupos

experimentais ($p < 0,05$). Os animais tratados com LLLT mostraram menor número de células TRAP-positivas quando comparados aos animais tratados com RAR aos 7 dias nos Grupos SH-vei, OVX-vei e OVX-nic ($p < 0,05$) (Tabela 3, Figura 5 A-C).

O padrão de imunomarcção para RANKL se mostrou moderado aos 7 dias pós-tratamento, decrescendo gradativamente aos 15 e 30 dias pós-tratamento em SH-vei e OVX-vei em todos os tratamentos, em especial na aPDT. Nos grupos SH-nic e OVX-nic o padrão de imunomarcção se mostrou alto em todos os períodos experimentais nos animais tratados com RAR e LLLT. Nos animais tratados com aPDT o padrão de imunomarcção sofreu uma redução gradativa (Figura 5 D-F).

O padrão de imunomarcção para OPG se mostrou baixo aos 7 e 15 dias pós-tratamento, sofrendo um discreto aumento aos 30 dias em todos os grupos experimentais tratados com RAR e LLLT. Nos animais tratados com aPDT a imunomarcção se mostrou baixa aos 7 dias, sofrendo uma elevação aos 15 e 30 dias em todos os grupos experimentais (Figura 5 G-I).

Os animais do grupo SH-vei mostraram maior número de células PCNA positiva aos 7 dias comparados aos animais do grupo SH-nic ($p < 0,05$). Aos 15 dias os animais do grupo SH-nic e OVX-nic mostraram maior número de células PCNA-positivas comparados SH-vei ($p < 0,05$), exceto os animais do grupo OVX-nic tratados com RAR. Nos grupos SH-vei, OVX-vei e OVX-nic, os animais tratados com a aPDT mostraram maior número de células PCNA-positivas aos 7 dias, quando comparados a RAR ($p < 0,05$). Aos 15 dias, os animais tratados com a aPDT dos grupos SH-vei e SH-nic apresentaram maior número de células PCNA-positivas quando comparados a RAR ($p <$

0,05). Os animais tratados com LLLT nos grupos SH-vei (7 e 15 dias), SH-nic e OVX-nic aos 15 dias apresentaram maior número de células PCNA-positivas quando comparados a RAR ($p < 0,05$) (Tabela 3; Figura 5 J-L).

Avaliação da detecção da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por PCR-RT

Neste estudo os animais do grupo SH-nic, tratados com RAR, apresentaram uma menor expressão gênica das citocinas TNF- α (7 e 15 dias), IL-1 β (30 dias) e IL-6 (7 dias), comparados aos animais do grupo SH-vei ($p < 0,05$). Os animais do grupo OVX-vei, tratados com RAR, apresentaram maior expressão gênica de IL-6 (7 dias) comparados aos animais dos grupos SH-vei, SH-nic e OVX-nic ($p < 0,05$). Os animais do grupo OVX-nic, tratados com RAR, mostraram menor expressão gênica de TNF- α (7 dias), IL-1 β (7 dias) e IL-6 (7 dias) comparados aos animais do grupo SH-vei e SH-nic ($p < 0,05$).

Os animais tratados com aPDT demonstraram menor expressão de TNF- α (7 dias), IL-1 β (7 e 30 dias) e IL-6 (7 dias) comparados à RAR no Grupo SH-vei e menor expressão de IL-1 β (7 e 30 dias) comparados à RAR no Grupo SH-nic ($p < 0,05$).

Os animais tratados com LLLT demonstraram menor expressão de TNF- α (7 dias) e IL-1 β (7 dias) comparados à RAR no Grupo SH-vei e menor expressão de IL-1 β (7 e 30 dias) e IL-6 (7 dias) comparados à RAR no Grupo SH-nic ($p < 0,05$). Os resultados da expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão apresentados na Figura 6.

Este estudo avaliou o efeito da LLLT e da aPDT como adjuvantes a RAR no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas modificadas sistemicamente por nicotina. A nicotina é a substância farmacologicamente mais ativa do cigarro e seu efeito ao nível celular e tecidual ainda não foi totalmente elucidado e se mostra controverso (Henemyre et al., 2003). A prevalência e severidade da doença periodontal (DP) é maior em fumantes que em não fumantes (Papapanou, 1996). Além disso, o tratamento da doença periodontal (DP) é menos efetivo em fumantes quando comparado a não fumantes (Preshaw et al., 2005). Adicionalmente, após a menopausa a mulher torna-se mais susceptível a DP e este problema é devido, em parte, à deficiência de estrógeno, que resulta em perda óssea e processo inflamatório (Buencamino et al., 2009), e também pode ser considerada um fator de risco para a DP (Genco e Grossi, 1998). Neste estudo a aPDT adjuvante à RAR minimizou os efeitos deletérios da nicotina e da deficiência de estrógeno por modular o metabolismo ósseo pela regulação do sistema RANK/RANKL/OPG.

A dose diária de 6mg/kg de nicotina foi escolhida por produzir níveis séricos de cotinina correspondente ao consumo humano de 10 a 20 cigarros por dia (Gonzalez et al., 1996; César-Neto et al., 2003). Vários estudos relataram efeitos deletérios da nicotina quando administrada nesta dose (Bosco et al., 2007; Bonfante et al., 2008; Machado et al., 2010; Yamano et al., 2010; Milanezi de Almeida et al., 2011; Garcia et al., 2011).

Os resultados deste estudo, demonstraram maior PO nos animais tratados com nicotina após os tratamentos locais, quando comparados aos animais tratados com solução salina, o que corrobora os achados de outros estudos (Bosco et al., 2007; Garcia et al., 2011). Sabe-se que o efeito deletério da nicotina é dose dependente e está relacionado a duração do seu uso (Scott et al., 2001; Meisel et al., 2004) e que este efeito é maior no

osso trabecular do que no osso cortical (Vogel et al., 1997; César-Neto et al., 2003). A nicotina diminui significativamente o volume do osso trabecular, a espessura das trabéculas, a superfície mineralizada, bem como a taxa de aposição mineral e formação de novo osso e leva ao aumento da área de osteoclastos (Hapidin et al., 2007). Neste estudo a liberação da nicotina foi iniciada 30 dias antes da indução da PE e seu efeito afetou negativamente a resposta aos tratamentos locais.

Os resultados também demonstraram que os animais tratados com nicotina exibiram maior expressão de RANKL. O aumento de RANKL leva a ativação da RANK, o que ocasiona o aumento da osteoclastogênese, ativação de osteoclastos maduros e inibição de sua apoptose (Henemyre et al., 2003; Cochran, 2008) o que explicaria o maior aumento de células TRAP-positivas observado neste estudo. Por sua vez, o lipopolissacarídeo (LPS), um componente estrutural biologicamente ativo da membrana celular de bactérias gram-negativas, na presença de nicotina, estimula a formação de osteoclastos pelo aumento da produção do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e prostaglandina 2 (PGE₂) pelos osteoblastos. PGE₂ é uma das vias que leva a inibição da produção de OPG e aumento da expressão de RANKL e da quantidade de células clásticas TRAP-positivas (Tanaka et al., 2006; Lee et al, 2013).

A resposta imuno-inflamatória pode sofrer regulação através da via anti-inflamatória colinérgica. Esta via leva a liberação de acetilcolina (ACh) que se liga aos seus receptores (AChRs), dentre os quais o subtipo nicotínico (nAChRs) (Breivik et al, 2009; Hao et al., 2011). A nicotina é um potente agonista nAChR, especialmente do receptor $\alpha 7$ nAChR. A ativação de $\alpha 7$ nAChR inibe a via NF- κ B (inflamatória) e ativa a via JaK2-STAT3 (anti-inflamatória), levando a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais o TNF- α (Breivik et al., 2009; Chen et al., 2011). Desta

forma, a nicotina aumenta a susceptibilidade à periodontite suprimindo a resposta inflamatória protetora (Breivik et al., 2009). Neste estudo os animais do grupo SH-nic, tratados com RAR, apresentaram uma menor expressão gênica das citocinas TNF- α (7 e 15 dias), IL-1 β (30 dias) e IL-6 (7 dias), comparados aos animais do grupo SH-vei ($p<0,05$).

Com relação a deficiência de estrógeno, os animais ovariectomizados mostraram maior PO quando comparados aos animais do grupo SH-vei aos 7 dias, exceto os tratados com a aPDT do grupo OVX-vei. Nos grupos OVX-vei e OVX-nic houve uma maior expressão de RANKL e células TRAP-positivas quando comparados aos animais do grupo SH-vei e SH-nic respectivamente. Estes resultados corroboram estudos anteriores (Garcia et al. 2013; Su et al. 2013). A ovariectomia interfere no metabolismo ósseo, através da regulação do sistema RANK/RANKL/OPG, levando a uma regulação negativa de OPG e regulação positiva de RANKL, favorecendo o aumento de células clásticas TRAP positiva (Said et al., 2012; Garcia et al., 2013; Su et al., 2013). Além disso, citocinas como IL-1 e TNF- α também podem promover a formação e ativação de osteoclastos de uma maneira parcialmente independente da via RANK/RANKL/OPG (Tyagi et al., 2012). IL-1 β e TNF- α são reconhecidos por serem fatores osteoreabsortivos que estimulam a osteoclastogênese e a maturação de osteoclastos, via indução de RANKL em osteoblastos (Su et al., 2013). Por sua vez, o TNF- α e IL-1 β estimulam a produção de IL-6 (Seemann et al., 2013). Neste estudo, os animais do grupo OVX-vei, tratados com RAR, apresentaram maior expressão gênica de IL-6 (7 dias) comparados aos animais dos grupos SH-vei, SH-nic e OVX-nic ($p<0,05$).

A OVX leva ao aumento de citocinas inflamatórias, entre elas a IL-1 β e o TNF- α que são os mais potentes estimuladores osteoclastogênicos sob condições de depleção de

estrógeno (Tyagi et al., 2012; Su et al., 2013). Paradoxalmente, a nicotina suprime a produção de IL-1 e IL-8 e de IL-2 e TNF- α (Chen et al., 2011; Mabley et al., 2011). No presente estudo, os animais do grupo OVX-nic, tratados com RAR, mostraram menor expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 comparados aos animais do grupo SH-vei e SH-nic aos 7 dias ($p < 0,05$).

Nos grupos SH-nic e OVX-vei os animais tratados com aPDT apresentaram menor quantidade de células TRAP-positivas quando comparados aos animais tratados com RAR no período de 7 dias. Nestes grupos a aPDT provocou, uma diminuição de RANKL e um aumento de OPG, o que explica a diminuição do número de osteoclastos, o que é corroborado por estudos anteriores (Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2013). No Grupo SH-nic, os animais tratados com aPDT demonstraram menor expressão de IL-1 β (7 e 30 dias) comparados à RAR ($p < 0,05$). Braham et al., (2009) demonstraram que a aPDT pode contribuir para o processo de cicatrização periodontal pela inativação das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α . Em contraposição, Oliveira et al., (2011) e Sorkhdini et al. (2013) não encontraram efeito adicional da aPDT sobre estas citocinas na PE em cães.

Os animais tratados localmente com aPDT no Grupo OVX-nic, mostraram menor PO quando comparados aos animais tratados com RAR no período de 7 e 15 dias ($p < 0,05$). Neste grupo, os animais tratados com a aPDT mostraram maior expressão de OPG, menor expressão de RANKL e de células TRAP-positivas. O efeito da aPDT como terapia adjuvante ao tratamento mecânico da doença periodontal, pode ser explicado por sua ação antimicrobiana (Hamblin e Hasan, 2004) e bioestimuladora (Braham et al., 2009). A morte bacteriana promovida pela aPDT inativa fatores de virulência e citocinas inflamatórias do hospedeiro, modulando a resposta imuno-inflamatória

exarcebada iniciada pela ação do LPS, criando um ambiente favorável ao reparo periodontal (Braham et al., 2009). Somando-se a este efeito, a ação imunoestimuladora da aPDT age sobre a resposta imune celular estimulando a ação dos macrófagos (Song et al., 2013) e o efeito bioestimulador da LLLT age sobre o sistema imune aumentando a fagocitose e quimiotaxia de leucócitos (Tadakuma et al., 1993). Neste estudo, os animais do grupo OVX-nic tratados com LLLT demonstraram menor número de células TRAP-positivas (7 dias) e maior número de células PCNA-positivas (15 dias) comparados a RAR.

Os animais do grupo SH-vei mostraram maior número de células PCNA-positivas aos 7 dias comparados aos animais do grupo SH-nic em todos os tratamentos. Aos 15 dias, os animais do grupo SH-nic e OVX-nic mostraram maior número de células PCNA-positivas comparados ao Grupo SH-vei, exceto os animais do grupo OVX-nic tratados com RAR. Este resultado mostra que a nicotina atrasa o pico da proliferação celular, essencial ao reparo. Um dos motivos deste atraso pode ser explicado pela atividade reabsortiva sustentada, demonstrada através da imunomarcção para TRAP nestes grupos, o que desfavorece sobremaneira o processo de reparo tecidual. Estes achados estão de acordo com Ma et al. (2011) que mostraram que a nicotina atrasou o reparo ósseo.

No Grupo OVX-nic, o tratamento com a aPDT mostrou, no período de 7 dias, maior número de células PCNA-positivas comparado a RAR e LLLT. Além disso, neste grupo a quantidade de células TRAP-positivas, mantidas estáveis ao longo do tempo, foi significativamente menor nos animais tratado com aPDT, em comparação aos

tratados com a RAR, em todos os períodos experimentais. Este fato justifica a melhora no processo de reparo tecidual proporcionada pela aPDT.

Dentro dos limites deste estudo, concluiu-se que a LLLT não promoveu efeito adicional à RAR e que aPDT foi um adjuvante efetivo à RAR no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas modificadas sistemicamente com nicotina, pois diminuiu a perda óssea alveolar, aumentou a expressão de OPG e PCNA, diminuiu a expressão de RANKL e células TRAP-positivas em ratas com deficiência de estrógeno e sob o efeito sistêmico de nicotina.

Agradecimentos

Ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - UNESP/FOA, Araçatuba, São Paulo. À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - UNESP/FMVA, Araçatuba, São Paulo. À *The University of Tennessee* - Health Science Center (UTHSC) at Memphis - College of Dentistry, Memphis, Tennessee, EUA. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** (**Processo 2010/15094-2**). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Conflitos de Interesses e fonte de financiamento

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2010/15094-2). Os autores informam não haver conflitos de interesses neste estudo.

Referências

- Aykol, G., Baser, U., Maden, I., Kazak, Z., Onan, U., Tanrikulu-Kucuk, S., Ademoglu, E., Issever, H., Yalcin, F. (2011) The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *Journal of periodontology* **82**, 481-488.
- Bonfante, S., Bosco, A.F., Luize, D.S., de Almeida, J.M., Cestari, T.M., Taga, R. (2008) Influence of nicotine on healing process of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in rats. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **23**, 437-444.
- Bosco, A.F., Bonfante, S., de Almeida, J.M., Luize, D.S., Nagata, M.J., Garcia, V.G. (2007) A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *Journal of periodontology* **78**, 527-532.
- Braham, P., Herron, C., Street, C., Darveau, R. (2009) Antimicrobial Photodynamic Therapy May Promote Periodontal Healing Through Multiple Mechanisms. *Journal of periodontology* **80**, 1790-1798.
- Brayer, W.K., Mellonig, J.T., Dunlap, R.M., Marinak, K.W., Carson, R.E. (1989) Scaling and root planing effectiveness: the effect of root surface access and operator experience. *Journal of periodontology* **60**, 67-72.
- Breivik, T., Gundersen, Y., Gjermo, P., von Horsten, S., Opstad, P.K. (2009) Nicotinic acetylcholine receptor activation mediates nicotine-induced enhancement of experimental periodontitis. *Journal of periodontal research* **44**, 110-116.
- Buencamino, M.C., Palomo, L., Thacker, H.L. (2009) How menopause affects oral health, and what we can do about it. *Cleveland Clinic journal of medicine* **76**, 467-475.

- César-Neto, J.B., Duarte, P.M., Sallum, E.A., Barbieri, D., Moreno, H. Jr., Nociti, F.H. Jr. (2003) A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *Journal of periodontology* **74**, 1454-1459.
- Chen, Y., Guo, Q., Pan, X., Qin, L., Zhang, P. (2011) Smoking and impaired bone healing: will activation of cholinergic anti-inflammatory pathway be the bridge? *International orthopaedics* **35**, 1267- 1270.
- Cochran, D.L. (2008) Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology* **79**(8 Suppl), 1569-1576.
- de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Bonfante, S., Garcia, V.G. (2008a) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *Journal of periodontology* **79**, 2156-2165.
- de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Oshiiwa, M., Garcia, V.G. (2008b) In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *Journal of periodontology* **79**, 1081-1088.
- de Paula Eduardo, C., de Freitas, P.M., Esteves-Oliveira, M., Aranha, A.C., Ramalho, K.M., Simões, A., Bello-Silva, M.S., Tunér, J. (2010) Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease: a review. *Lasers in medical science* **25**, 781–792.
- Drisko, C.H. Nonsurgical periodontal therapy. (2001) *Periodontology 2000* **25**, 77-88.
- Duarte, P.M., Gonçalves, P.F., Sallum, A.W., Sallum, E.A., Casati, M.Z., Humberto Nociti, F. Jr. (2004) Effect of an estrogen-deficient state and its

- therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontal research* **39**,107-110.
- Fernandes, L.A., de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Martins, T.M., Okamoto, T., Garcia, V.G. (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *Journal of clinical periodontology* **36**, 219-228.
- Fleischer, H.C., Mellonig, J.T., Brayer, W.K., Gray, J.L., Barnett, J.D. (1989) Scaling and root planing efficacy in multirrooted teeth. *Journal of periodontology* **60**, 402–409.
- Garcia, V.G., Fernandes, L.A., Macarini, V.C., de Almeida, J.M., Martins, T.M., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Cirelli, J.A., Theodoro, L.H. (2011) Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *Journal of clinical periodontology* **38**,1106-1114.
- Garcia, V.G., Gualberto Júnior, E.C., Fernandes, L.A., Bosco, A.F., Hitomi Nagata, M.J., Casatti, C.A., Ervolino, E., Theodoro, L.H. (2013) Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *Journal of periodontology* **84**, 556-565.
- Genco, R.J., Grossi, S.G. (1998) Is estrogen deficiency a risk factor for periodontal disease? *Compendium of continuing education in dentistry* **22**:S23– S29.
- Giannobile, W.V. (2008) Host-response therapeutics for periodontal diseases. *Journal of periodontology* **79**, 1592–1600.

Referências

- González, Y.M., De Nardin, A., Grossi, S.G., Machtei, E.E., Genco, R.J., De Nardin, E. (1996) Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *Journal of dental research* **75**, 796-802.
- Gupta G. (2013) Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- II: Inflammatory mediators, host-response modifiers and chair side diagnostic aids. *Journal of medicine and life* **15**, 7-13.
- Hamblin, M.R., Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & photobiological sciences* **3**, 436-450.
- Hao, J., Simard, A.R., Turner, G.H., Wu, J., Whiteaker, P., Lukas, R.J., Shi, F.D. (2011) Attenuation of CNS inflammatory responses by nicotine involves $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Experimental neurology* **227**, 110-119.
- Hapidin, H., Othman, F., Soelaiman, I.N., Shuid, A.N., Luke, D.A., Mohamed, N. (2007) Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *Journal of bone and mineral metabolism* **25**, 93–98.
- Hassumi, M.Y., Silva-Filho, V.J., Campos-Júnior, J.C. (2009) PPAR-gamma agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. *International Immunopharmacology* **9**:1150-1158.
- Henemyre, C.L., Scales, D.K., Hokett, S.D., Cuenin, M.F., Peacock, M.E., Parker M.H, Brewer, P.D., Chuang, A.H. (2003) Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *Journal of periodontology* **74**, 1440-1446.

Referências

- Ishikawa, I., Aoki, A., Takasaki, A.A., Mizutani, K., Sasaki, K.M., Izumi, Y. (2009) Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontology 2000* **50**, 90–126.
- Kibayashi, M., Tanaka, M., Nishida, N., Kuboniwa, M., Kataoka, K., Nagata, H., Nakayama, K., Morimoto, K., Shizukuishi, S. (2007) Longitudinal study of the association between smoking as a periodontitis risk and salivary biomarkers related to periodontitis. *Journal of periodontology* **78**, 859–867.
- Kim, Y. D., Kim, S. S., Hwang, D. S., Kim, S.G., Kwon, Y. H., Shin, S. H., Kim, U. K., Kim, J. R. & Chung, I. K. (2007) Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**, 441–450.
- Konopka, K., Goslinski, T. Photodynamic therapy in dentistry. (2007) *Journal of dental research* **86**, 694–707.
- Lee, H.J., Pi, S.H., Kim, Y., Kim, H.S., Kim, S.J., Kim, Y.S., Lee, S.K., Kim, E.C. (2009) Effects of nicotine on antioxidant defense enzymes and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *Journal of periodontology* **80**, 1281-1288.
- Lee, S.K., Chung, J.H., Choi, S.C., Auh, Q.S., Lee, Y.M., Lee, S.I., Kim, E.C. (2013) Sodium hydrogen sulfide inhibits nicotine and lipopolysaccharide-induced osteoclastic differentiation and reversed osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *Journal of cellular biochemistry* **114**, 1183-1193.

Referências

- Lerner, U.H. (2006) Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of postmenopausal osteoporosis. *Journal of dental research* **85**, 596-607.
- Liang, L., Yu, J.F., Wang, Y., Ding, Y. (2008) Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *Journal of periodontology* **79**, 1745-1751.
- Liu, Y.F., Wu, L.A., Wang, J., Wen, L.Y., Wang, X.J. (2010) Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontal research* **45**, 714-719.
- Ma, L., Sham, M.H., Zheng, L.W., Cheung, L.K. (2011) Influence of low-dose nicotine on bone healing. *The Journal of trauma* **70**, E117-121.
- Mabley, J., Gordon, S., Pacher, P. (2011) Nicotine Exerts an Anti-inflammatory Effect in a Murine Model of Acute Lung Injury. *Inflammation* **34**, 231-237.
- Machado, G.J., Dias, S.M., Bosco, A.F., Okamoto, T., Bedran de Castro, J.C., Dornelles, R.C. (2010) Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. *Journal of oral and maxillofacial surgery* **68**, 2675-2681.
- Meisel, P., Schwahn, C., Gesch, D., Bernhardt, O., John, U., Kocher, T. (2004) Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *Journal of periodontology* **75**, 236-242.
- Milanezi de Almeida, J., Bosco, A.F., Bonfante, S., Theodoro, L.H., Nagata, M.J., Garcia, V.G. (2011) Nicotine-induced damage affects gingival fibroblasts in the gingival tissue of rats. *Journal of periodontology* **82**, 1206-1211.

- Murrin, L.C., Ferrer, J.R., Zeng, W.Y., Haley, N.J. (1987) Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life sciences* **40**, 1699-1708.
- Obradović, R., Kesić, L., Mihailović, D., Jovanović, G., Antić, S., Brkić, Z. (2012) Low-level lasers as an adjunct in periodontal therapy in patients with diabetes mellitus. *Diabetes technology & therapeutics* **14**, 799-803.
- Oliveira, R.R., Novaes Jr, A.B., Garlet, G.P., Souza, R.F., Taba Jr, M., Sato, S., Souza, S.L.S., Palioto, D.B., Grisi, M.F.M., Feres, M. (2011) The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers in medical Science* **26**, 359–367
- Papapanou, P.N. (1996) Periodontal diseases: Epidemiology. *Annals of periodontology* **1**, 1 – 36.
- Preshaw, P.M., Heasman, L., Stacey, F., Steen, N., McCracken, G.I., Heasman, P.A. (2005) The effect of quitting smoking on chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology* **32**, 869-879.
- Qadri, T., Miranda, L., Tunér, J., Gustafsson, A. (2005) The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *Journal of clinical periodontology* **32**, 714–719.
- Ramfjord, S.P., Caffesse, R.G., Morrison, E.C., Hill, R.W., Kerry, G.J., Appleberry, E.A., Nissle, R.R., Stults, D.L. (1987) 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *Journal of clinical periodontology* **14**, 445–452.

- Said, F., Ghoul-Mazgar, S., Khemiss, F., El Ayeb, H., Saidane, D., Berdal, A., Ruhin-Poncet, B. (2012) The effect of etidronate on the periodontium of ovariectomized rats. *Journal of periodontology* **83**, 1063-1068.
- Sanz, M., Teughels, W. (2008) Innovations in nonsurgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology* **35**, 3–7.
- Scott, D.A., Palmer, R.M., Stapleton, J.A. (2001) Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* **28**, 715-722.
- Seemann, F., Knigge, T., Rocher, B., Minier, C., Monsinjon, T. (2013) 17 β -Estradiol induces changes in cytokine levels in head kidney and blood of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L., 1758). *Marine environmental research*. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.03.003. Epub 2013 Apr 6.
- Song, S., Zhou, F., Chen, W.R., Xing, D. (2013) PDT-induced HSP70 externalization up-regulates NO production via TLR2 signal pathway in macrophages. *Federation of European Biochemical Societies* **587**:128-135.
- Sorkhdini, P., Moslemi, N., Jamshidi, S., Jamali, R., Amirzargar, A.A., Fekrazad R. (2013) Effect of hydrosoluble chlorine-mediated antimicrobial photodynamic therapy on clinical parameters and cytokine profile in ligature-induced periodontitis in dogs. *Journal of periodontology* **84**, 793-800.
- Su, S.J., Yeh, Y.T., Shyu, H.W. (2013) The preventive effect of biochanin a on bone loss in ovariectomized rats: involvement in regulation of growth and activity of osteoblasts and osteoclasts. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. doi: 10.1155/2013/594857. Epub 2013 Feb 21.

- Tadakuma, T. (1993) Possible application of the laser in immunobiology. *The Keio journal of medicine* **42**, 180-182.
- Tanaka, H., Tanabe, N., Shoji, M., Suzuki, N., Katono, T., Sato, S. (2006). Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E production by osteoblasts. *Life sciences* **78**, 1733–1740.
- Tyagi, A.M., Srivastava, K., Kureel, J., Kumar, A., Raghuvanshi, A., Yadav, D., Maurya, R., Goel, A., Singh, D. (2012) Premature T cell senescence in Ovx mice is inhibited by repletion of estrogen and medicarpin: a possible mechanism for alleviating bone loss. *Osteoporosis international* **23**, 1151-1161.
- Vogel, J.M., Davis, J.W., Nomura, A., Wasnich, R.D., Ross, P.D. (1997) The effects of smoking on bone mass and the rates of bone loss among elderly Japanese-American men. *Journal of bone and mineral research* **12**, 1495-1501.
- Yamano, S., Berley, J.A., Kuo, W.P., Gallucci, G.O., Weber, H.P., Sukotjo, C. (2010) Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clinical oral implants research* **21**, 1353-1359.

Relevância Clínica

Razão científica para este estudo: O fumo é fator de risco para doença periodontal e a deficiência de estrógeno tem sido associada à perda óssea alveolar. Nestes casos a raspagem e alisamento radicular pode não ser efetiva devido suas limitações. A aPDT tem se mostrado um

efetivo adjuvante na terapia periodontal devido suas propriedades antimicrobianas, no entanto a ação da aPDT, adjuvante ao tratamento periodontal, frente ao efeito combinado da nicotina e deficiência de estrógeno precisa ser estudado.

Principais resultados: A aPDT foi efetiva como

adjuvante a raspagem no tratamento da periodontite experimental em animais com deficiência de estrógeno e sistemicamente modificados com nicotina. **Implicações práticas:** A aPDT pode ser usada como adjuvante no tratamento periodontal de pacientes fumantes com deficiência de estrógeno.

Tabela 01: Sequência dos Primers utilizados na análise quantitativa da expressão gênica das citocina TNF- α , IL-1 β e IL-6 pela qRT-PCR.

Gene Alvo	Sequência do Primer – Left/Right
IL-1 β L	CCC TTC AGG AAC AGC TAT GAA
IL-1 β R	ACA ACA TCA GTC CCA AGA AGG
IL-6 L	AAA TAC TCA GCT CTT TGT GAG TGC
IL-6 R	TGT GAT GAG TTT TGG TGT TTC C
TNF- α L	TGA ACT TCG GGG TGA TCG
TNF- α R	GGG CTT GTC ACT CGA GTT TT

Legenda da Tabela 2

Diferença com a RAR, mesmo grupo e período (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

€ Diferença com o grupo SH-vei, mesmo tratamento e período (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

¥ Diferença com o grupo SH-nic, mesmo tratamento e período (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

7abelas

Tabela 2: Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos da perda óssea alveolar (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, de acordo com cada grupo, tratamento e período.

Grupo SH-vei			
Períodos	7	15	30
Tratamentos			
RAR	1,06± 0,11	0,99± 0,08	0,85± 0,22
LLLT	0,79± 0,21	0,78 ± 0,21	0,73± 0,19
aPDT	0,71± 0,12 [#]	0,68±0,12	0,65±0,06
Grupo SH-nic			
Períodos	7	15	30
Tratamentos			
RAR	1,27±0,27	1,59±0,11 [€]	1,08±0,24
LLLT	1,05±0,04	1,56±0,25 [€]	1,03±0,19
aPDT	0,94±0,19	1,26±0,19 [€]	0,65±0,33
Grupo OVX-vei			
Períodos	7	15	30
Tratamentos			
RAR	1,34±0,07 [€]	1,02±0,23 [¥]	1,07±0,4
LLLT	0,91±0,06 ^{#€}	0,7±0,35 [¥]	0,73±0,17
aPDT	0,88±0,15 [#]	0,83±0,15 [¥]	0,62±0,11 [#]
Grupo OVX-nic			
Períodos	7	15	30
Tratamentos			
RAR	1,50±0,12 [€]	1,62±0,16 [€]	1,26±0,09
LLLT	1,31±0,48 [€]	1,01±0,47 [¥]	1,04±0,41
aPDT	1,05±0,15 ^{#€}	1,10±0,1 ^{#¥}	0,88±0,22
N	120	120	120

Legenda da tabela 3

*Diferença com 7 dias, mesmo grupo e tratamento (PCNA: ANOVA e Bonferroni; TRAP: ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

§ Diferença com 15 dias, mesmo grupo e tratamento (PCNA: ANOVA e Bonferroni; TRAP: ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

Diferença com a RAR, mesmo grupo e período (PCNA: ANOVA e Bonferroni; TRAP: ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

Ω Diferença com a LLLT, mesmo grupo e período (PCNA: ANOVA e Bonferroni; TRAP: ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

€ Diferença com o Grupo SH-vei, mesmo tratamento e período. (PCNA: ANOVA e Bonferroni; TRAP: ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

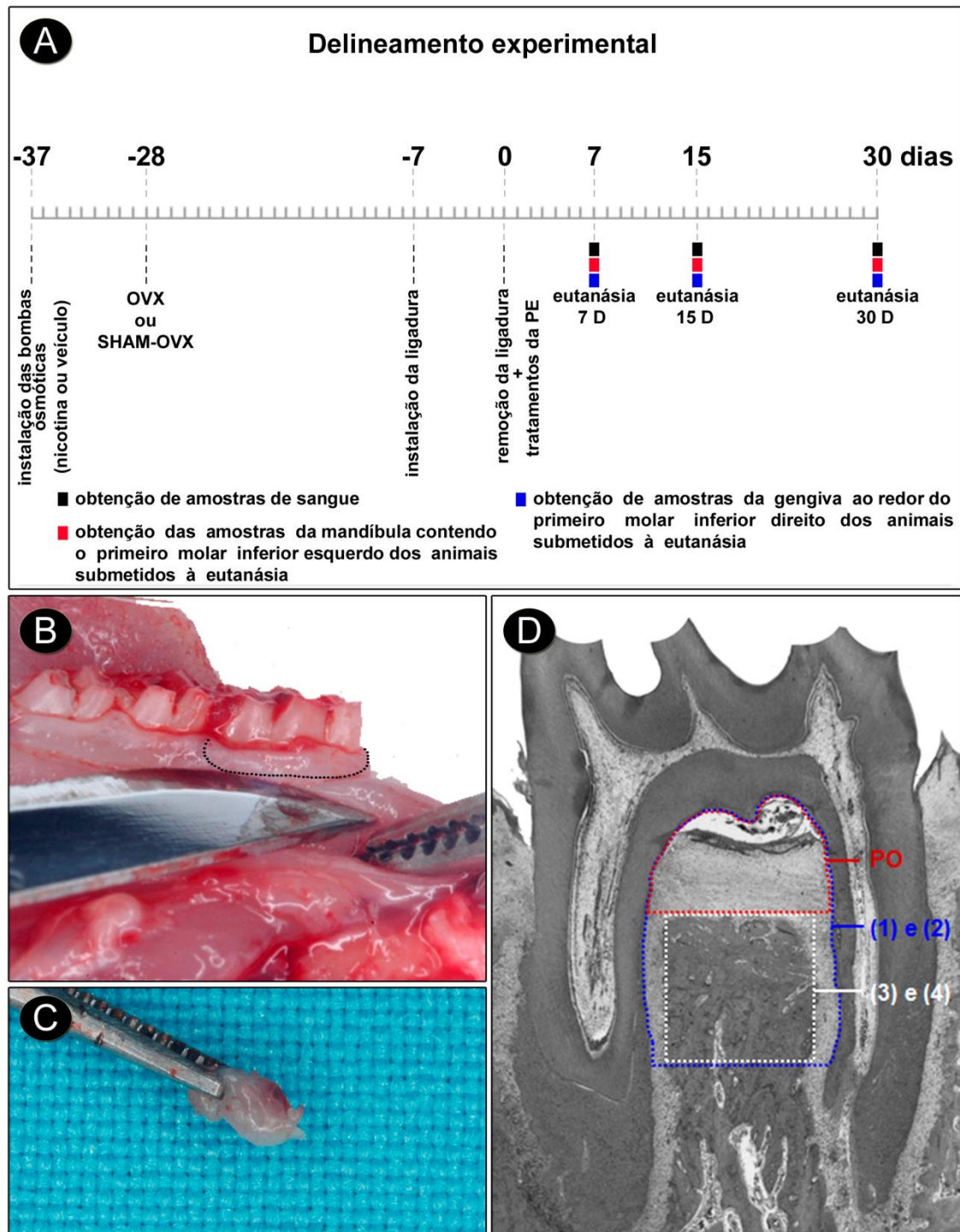
¥ Diferença com o Grupo SH-nic, mesmo tratamento e período. (PCNA: ANOVA e Bonferroni; TRAP: ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

£ Diferença com o Grupo OVX-vei, mesmo tratamento e período. (PCNA: ANOVA e Bonferroni; TRAP: ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

Tabela 3: Médias e desvio padrão (M±DP) do número de células TRAP-positivas e PCNA-positivas na região da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, de acordo com cada grupo, tratamento e período.

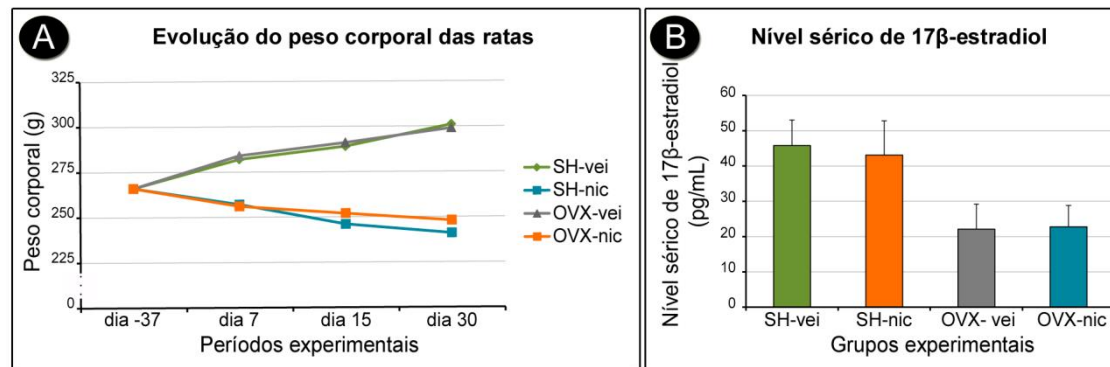
Grupo	PCNA				TRAP		
	Tratamento	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias
SH-vei	RAR	6,2±2,2	6±1	2,8±1,0	15,4±0,5	9,6±1,5	3,33±1,1
	LLLT	24,4±2,8 #	15±3,5 * #	4,4±1,1 *§	6,4±2,5 #	1,4±0,5	2,2±1,3
	aPDT	33,4±2,5 #Ω	9,8±0,8 * #	5,6±0,8 *	7,4±1,1 #	2,6±0,8	3,8±1,3
SH-nic	RAR	1,8±0,4 €	17,6±4,8 *€	2,2±1,3 §	21,6±1,5 €	22,2±3,5 €£	18±2,9 €
	LLLT	1±0,7 €	26±6,5 *#€	0,8±0,4 §	16±1 €	18,6±2,9 €£	16±1,8 €
	aPDT	4,4±1,1 €	36,6±5,5 *#Ω€	6,4±1,6	14,6±3,9 #€	23,4±1,5 €£	11,6±4,1 €
OVX-vei	RAR	14,6±6,3 €¥	7,4±4,5 ¥	5,8±1,4 *	24,8±1,9 €	13±2,2 €¥	4±2 €¥
	LLLT	20,4±6,1 ¥	11,6±4,1 *¥	5±1,2 *§	11,2±3,4 #€	9,2±3,1 €¥	4,4±0,5 €¥
	aPDT	28±4,1 #Ω€¥	8,6±2,5 *¥	6±1 *	13,4±2,3 #€	5,6±2,5 €¥	5±0,7 €
OVX-nic	RAR	8±1 ¥	12,2±4,0	18,6±1,9 *€¥£	40,4±4,5 €¥£	31,6±3,8 €¥£	34,2±12,4 €¥£
	LLLT	9,8±3,1 €¥£	26,4±2,5 *#€£	7,4±1,1 #§	34,2±3,5 #€¥£	24,4±11,7 €£	28,4±5,5 €¥£
	aPDT	19,4±5,0 #Ω€¥	18,2±2,7 Ω€¥£	5,2±2,3 *§#	27,2±2,2 #Ω€¥£	17,8±2,6 #€£	21,2±0,8 #€¥£
Total		120	120	120	120	120	120

Figura 1



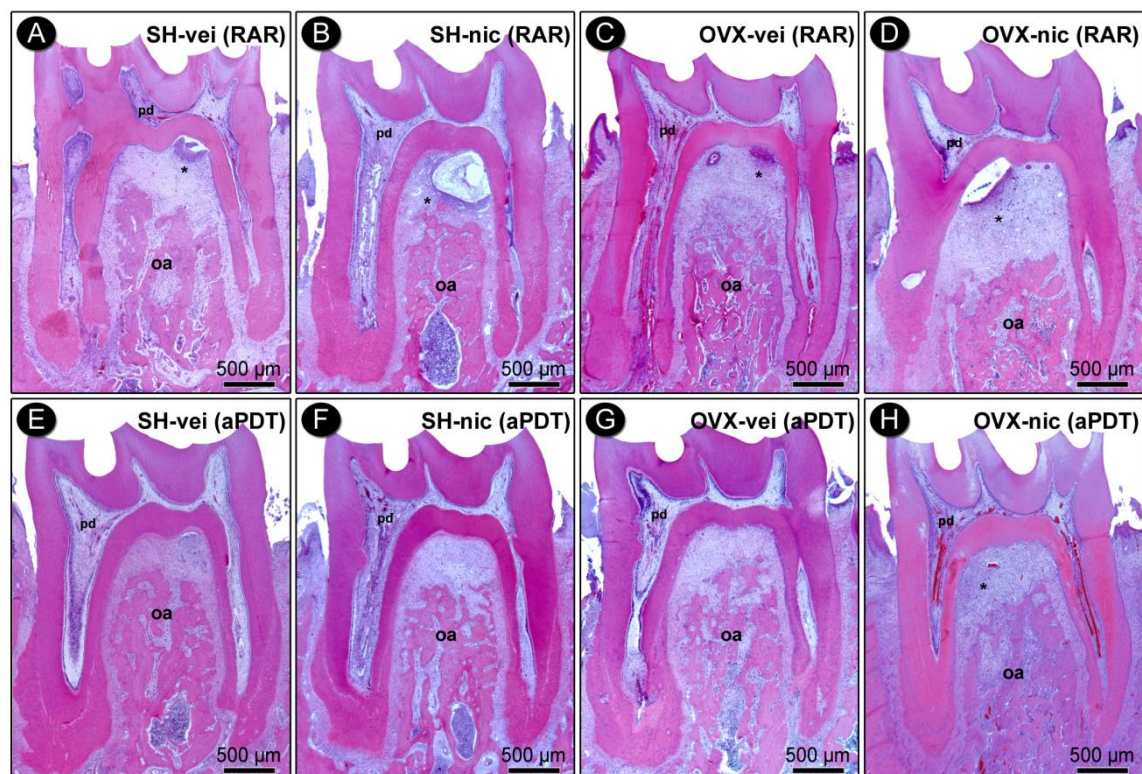
(A) Esquema resumindo o delineamento experimental. (B-C) aspecto clínico do fragmento de gengiva removido para análise pela qRT-PCR. (D) fotomicrografia evidenciando a área de furca do primeiro molar inferior onde se realizou a mensuração da: perda óssea (PO - delimitação vermelha) e imunomarcagem de RANKL (1- delimitação azul), OPG (2- delimitação azul), TRAP (3- delimitação branca) e PCNA (4- delimitação branca).

Figura 2



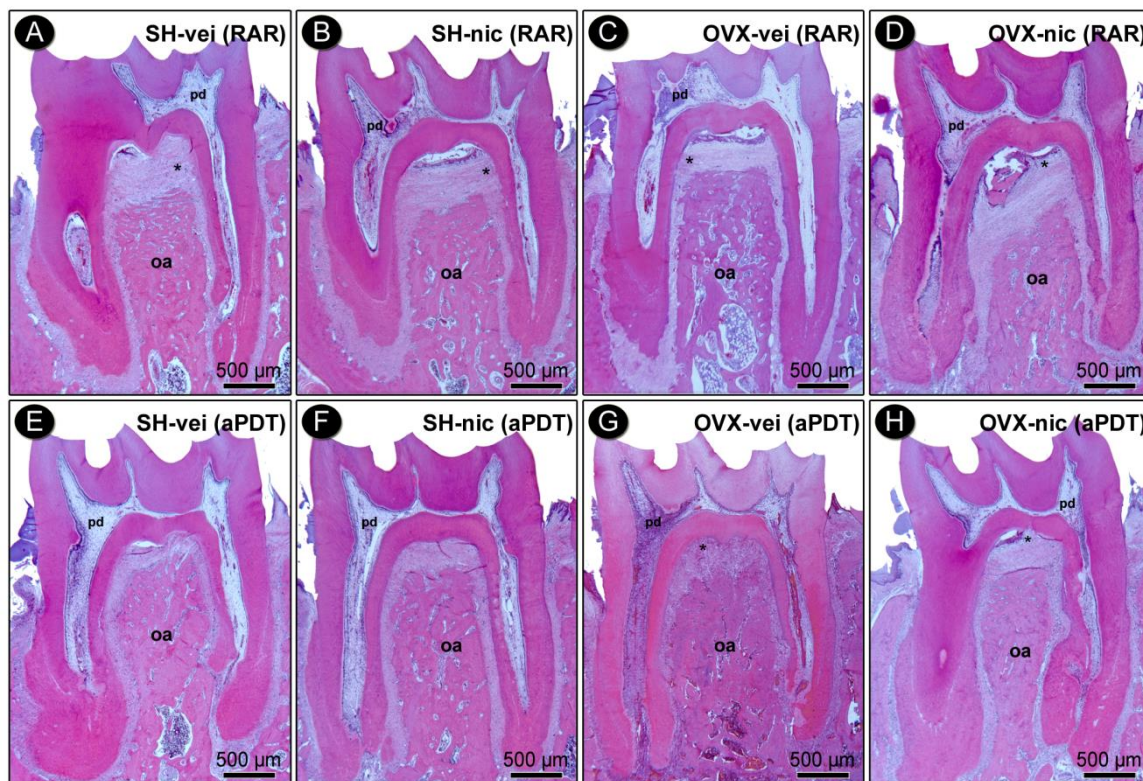
(A) Gráfico evidenciando a evolução do peso corporal das ratas ao longo do período de experimento.
 (B) Gráfico mostrando o nível sérico de 17β-estradiol nos diferentes grupos experimentais.

Figura 3



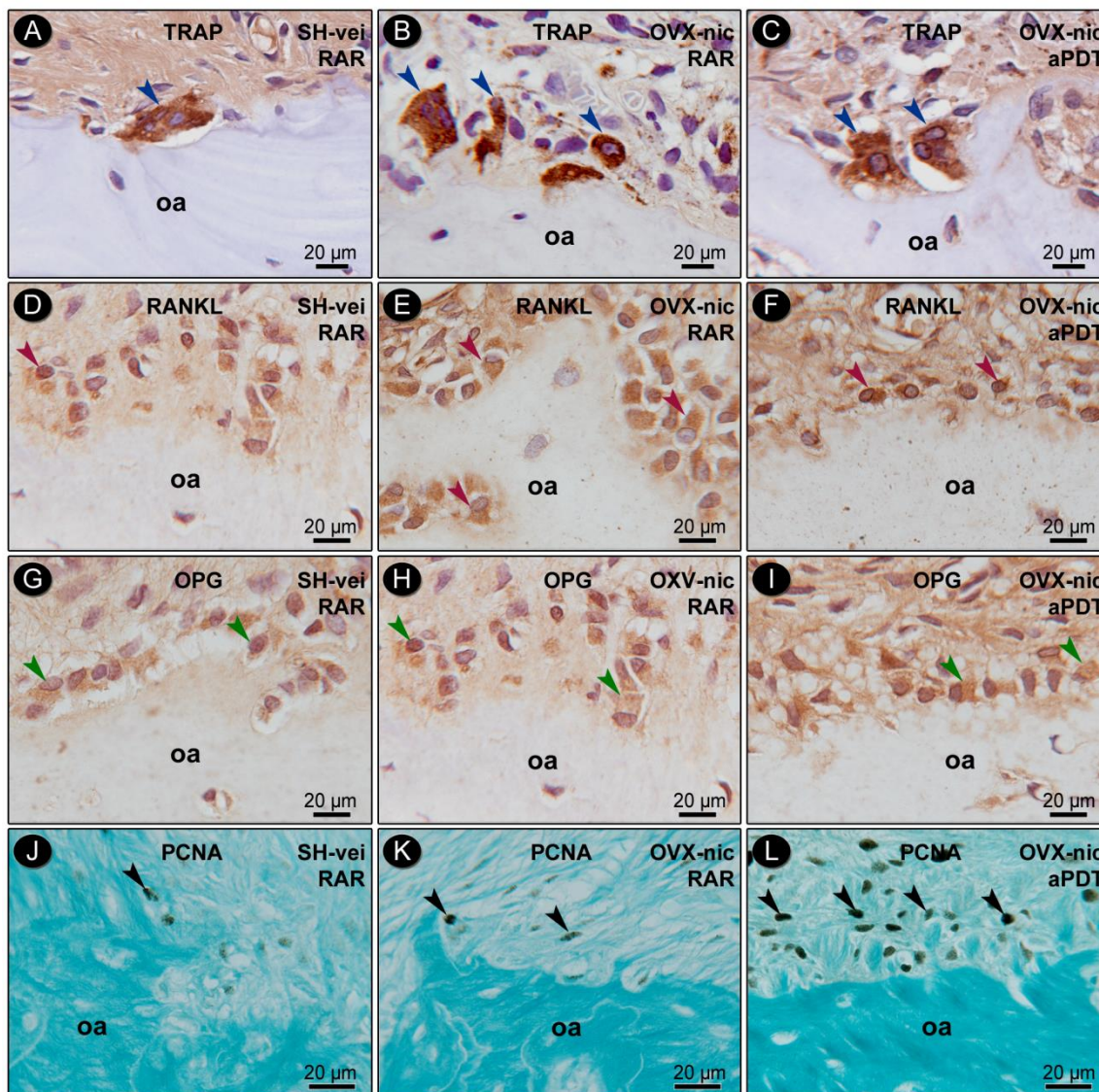
Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico dos tecidos periodontais 7 dias após raspagem e alisamento radicular isolado ou em associação com a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) nos diferentes grupos experimentais. A-D: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 7 dias após tratamento com RAR em SH-vei (A), SH-nic (B), OVX-vei (C) e OVX-nic (D). E-F: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 7 dias após tratamento com RAR e aPDT em SH-vei (E), SH-nic (F), OVX-vei (G) e OVX-nic (H). A aPDT reduz a perda óssea alveolar e a resposta imune inflamatória na maioria dos grupos experimentais. Abreviações e símbolos: pd, polpa dental; oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: 500 μm.

Figura 4



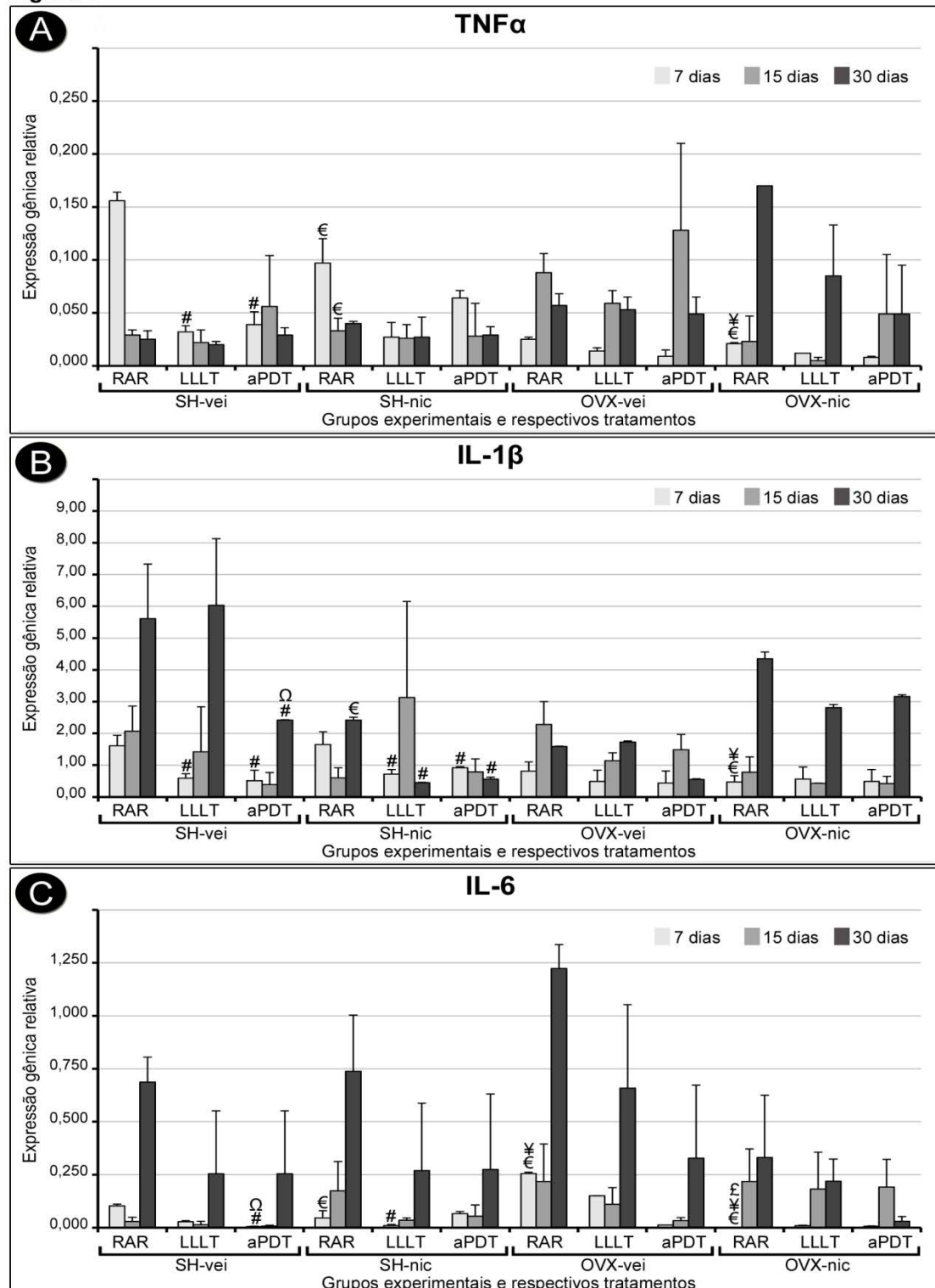
Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico dos tecidos periodontais 30 dias após raspagem e alisamento radicular isolado ou em associação com a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) nos diferentes grupos experimentais. A-D: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 30 dias após tratamento com RAR em SH-vei (A), SH-nic (B), OVX-vei (C) e OVX-nic (D). E-F: características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo 30 dias após tratamento com RAR e aPDT em SH-vei (E), SH-nic (F), OVX-vei (G) e OVX-nic (H). A aPDT reduz a perda óssea alveolar e a resposta imune inflamatória na maioria dos grupos experimentais. Abreviações e símbolos: pd, polpa dental; oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: 500 µm.

Figura 5



Imunomarcacão para TRAP, RANKL, OPG e PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TRAP (setas azuis), RANKL (setas vermelhas), OPG (setas verdes) e PCNA (setas pretas) em SH-vei 7 dias após o tratamento com raspagem e alisamento radicular (RAR) (A, D, G e J) e em OVX-nic 7 dias após o tratamento com RAR (B, E, H e K) ou RAR associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) (C, F, I e L). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; setas azuis, osteoclastos TRAP-positivos; setas vermelhas, células RANKL-positivas; setas verdes, células OPG-positivas; setas pretas, células PCNA-positivas. Contra-coloração: hematoxilina (A-I) e *fast green* (J-L). Barras de escala: 20 µm.

Figura 6



Gráficos evidenciando a expressão gênica de TNFα (A), IL-1β (B) e IL-6 (C) no tecido gengival nos diferentes grupos experimentais, seus respectivos tratamento e períodos. Abreviações: #, diferença com RAR ($p < 0,05$), mesmo grupo e período; Ω, diferença com LLLT ($p < 0,05$), mesmo grupo e período; €, diferença com SH-vei ($p < 0,05$), mesmo tratamento e período; ¥, diferença com SH-nic ($p < 0,05$), mesmo tratamento e período; £, diferença com OVX-vei ($p < 0,05$), mesmo tratamento e período. Teste estatístico: Anova e Tukey.

Anexo A - Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"EFEITOS DO LASER E DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO PERIODONTAL DE RATAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS OU NÃO COM NICOTINA: ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO"** sob responsabilidade do Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata e colaboração de Erivan Clementino Gualberto Júnior acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-005074

Araçatuba, 21 de Julho de 2010

Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 783 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (16) 3636-1355 Fax (16) 3636-1352 E-mail: cda@foa.unesp.br



Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Relevant Document: Sample Manuscript (CPE_samplemanuscript.pdf)

Useful Websites: Submission Site (<http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>), Articles published in Journal of Clinical Periodontology

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1600-051X](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1600-051X)), Author Services

(<http://authorservices.wiley.com/bauthor/author.asp>), Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/publicationethics.asp>), Guidelines for Figures (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Journal of Clinical Periodontology publishes original contributions of high scientific

merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Journal of Clinical Periodontology. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell's Author Services (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/>) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Clinical Periodontology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. Journal of Clinical Periodontology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.