



Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Paula Delello Macedo

*Avaliação dos efeitos da Terapia Fotodinâmica com
Hipericina-glucamina no tratamento da doença
periodontal induzida em ratos*

Araraquara

2014





Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Paula Delello Macedo

*Avaliação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica com
Hipericina-glucamina no tratamento da Doença
Periodontal induzida em ratos*

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Araraquara

2014

Macedo, Paula Delello

Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica com hipericina
glucamina no tratamento da doença periodontal induzida em ratos /
Paula Delello Macedo - Araraquara: [s.n.], 2014.
100 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Prof. Dr. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

1. Fotoquimioterapia 2. Periodontite 3. Microtomografia por
Raio X I.Título

PAULA DELELLO MACEDO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM
HIPERICINA-GLUCAMINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS

Comissão julgadora

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre

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

2° examinador.....Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

3° examinador.....Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

Araraquara, 24 de março de 2014.

DADOS CURRICULARES

Paula Delello Macedo

- NASCIMENTO:** 28/09/1987 (São Carlos, SP)
- FILIAÇÃO:** Paulo Eduardo Macedo
Maria Isabel Delello Macedo
- 2006-2010:** **Curso de Graduação em Odontologia**
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,
São Paulo, Brasil
- 2012 - atual:** **Pós Graduação em Periodontia – Nível Mestrado**
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,
São Paulo, Brasil
- 2013 - atual:** **Especialização em Periodontia**
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,
São Paulo, Brasil

Dedicatória

À Deus,

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

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

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

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá;

Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos;

Mas, quando vier o que é perfeito, então o que o é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, discorria como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino.

Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.”

1 Coríntios 13:1-13

Agradecimentos especiais

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

O amor de vocês me trouxe até aqui. Meus esforços são e serão sempre para lhes dar orgulho, pois vocês dedicaram sua vida a mim. Obrigada pelo exemplo, graças a vocês eu sei o que é viver em família e tenho valores. Obrigada, muito obrigada, pelos incentivos, pelos puxões de orelha, pelas conversas, pela preocupação. Vocês sabem o motivo dos meus anseios, antes mesmo de mim! **Amo vocês!**

Ao meu irmão **Thiago,**

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

Ao meu namorado **Douglas**,

Meu companheiro de estudos, por ser um pós-graduando tão responsável e comprometido, sempre me impulsiona a ser melhor e querer mais também, é um espelho para mim. Obrigada por sempre estar presente quando eu mais preciso, por tomar meus problemas como seus, pelo apoio, pela compreensão e sobretudo pelo companheirismo. O seu amor me faz bem. Amo você!

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

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

À minha querida amiga **Marcela**,

A distância não nos fez nem cócegas. Obrigada por sempre dar um jeito de estar presente, pelo carinho, pelos conselhos profissionais e pessoais, pela conversa jogada fora, por tudo o que você representa para mim. Você é a irmã que Deus me deu de bônus, uma das maiores bênçãos que já recebi. Amo você!

À minha orientadora **Adriana Marcantonio**,

Mal sabia eu, que o termo “orientadora” ganharia um sentido novo para mim. Como agradecer pelo que fez por mim? Como lhe descrever o que senti diante de atitudes que me ensinaram muito mais do que eu poderia encontrar em qualquer periódico A1? Obrigada, muito obrigada, por cada um dos muitos momentos nos quais me pegou pela mão e me ensinou do mais simples ao mais detalhado, pelas broncas sempre construtivas, por amar aquilo que faz e por isso fazer tão bem, mesmo nas situações mais difíceis. A senhora tem o dom.

Me sinto muito honrada e principalmente abençoada, por ser sua orientada!

Agradecimentos

A Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua Diretora, Prof^a.Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon e Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato pela oportunidade e infra-estrutura oferecidas para realização deste projeto.

Ao Coordenador do Curso de Pós Graduação – Área de Periodontia, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior.

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

Em especial aos meus queridos Mestres **Guilherme Oliveira** e **Jonatas Esteves**,

Vocês são meu modelo na pós-graduação! Obrigada pelos inúmeros ensinamentos, pelas oportunidades, pelo carinho em ensinar. A influência de vocês em meu aprendizado durante todo o mestrado foi grandiosa. Me orgulho e ainda me orgulharei muito de nossa amizade, ela foi o maior ganho da minha pós graduação.

Aos meus amigos da pós-graduação, **Cássio**, **Sâmara**, **Adriana**, **Vinicius Paiva**, **Vinicius Mascarenhas**, **Fabi**, **Suzane** e **Rafael**. Pude vê-los crescer como pesquisadores durante esses anos, honestos, sempre correndo atrás do que fosse melhor para o andamento de suas pesquisas, nunca medindo trabalho ou esforço, tenho orgulho de pertencer a este grupo. Obrigada pelos ótimos momentos, companheirismo e risadas. Adoro vocês!

A todos os meus amigos de pós graduação **Jackeline, Fernanda, Haline, Lelis, Lígia e Patricia**, obrigada pela amizade do dia a dia que tanto facilita a correria que vivemos na pós-graduação.

A Claudinha e Leandro, pela ajuda de sempre, dedicação e profissionalismo. Obrigada pela amizade!

A todos os funcionários do Departamento de Diagnostico e Cirurgia: **Isabela, Zezé, Dona Maria do Rosário e Regina Lúcia**. Com a ajuda e carinho de vocês tudo ficou mais fácil.

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

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

Ao Prof. Anderson Ribeiro de Oliveira, pelo preparo dos fotossensibilizadores.

A Fapesp, pela verba para aquisição do Microtomógrafo in vivo SkyScan 1176 (processo 2009/54080-0)

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida (processo 133436/2012-8).

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Macedo PD. Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica com hipericina-glucamina no tratamento da doença periodontal induzida em ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2014.

Resumo

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem mostrado resultados satisfatórios quando associada ao tratamento mecânico de doenças periodontais. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a TFD com o fotossensibilizador hipericina-glucamina, ativado por LED âmbar ($34,10 \text{ J/cm}^2$) e associada à raspagem e alisamento radicular (RAR), promove melhor reparo da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. Para indução da DP foram instaladas ligaduras no sulco de um dos segundos molares superiores, escolhido randomicamente. Após 15 dias as ligaduras foram removidas e os animais aleatoriamente distribuídos entre 4 grupos experimentais ($n = 5$): Grupo IDP (Indução da Doença Periodontal); Grupo RAR; Grupo TFD; Grupo RAR+TFD. Após 7, 15 e 30 dias da aplicação do tratamento os animais foram eutanasiados. As hemimaxilas foram submetidas a Microtomografia digital e avaliações histométricas. Os dados foram avaliados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os grupos foram avaliados entre si e os dados paramétricos foram avaliados pelo teste ANOVA. Todos os testes foram aplicados com $p < 0,05$. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Concluímos que a TFD como adjunta à RAR ou isolada obteve resultados semelhantes à raspagem e alisamento radicular.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia; Periodontite; Microtomografia por Raio X

Macedo PD. Assessing effects of photodynamic therapy using hypericin-glucamine in the treatment of periodontal disease induced in rats [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2014.

Abstract

The Photodynamic Therapy (TFD) has shown satisfactory results when coupled with mechanical treatment of periodontal diseases. The aim of this work was to evaluate whether PDT with the photosensitizer hypericin-glucamine, enabled by amber LED (34.10 J/cm²) and combined with scaling and root planning (RAR), promotes better repair of the periodontal disease induced experimentally in rats. The periodontal disease was induced by randomly inserting ligatures in the grooves of the superior second molars. The bandages were removed after 15 days and the animals were randomized into 4 experimental groups (n = 5): IPD group (Induced Periodontal Disease); RAR group; TFD group; and RAR+TFD group. The animals were sacrificed after 7, 15 and 30 days of the performed treatment. Digital microtomography and histometric analyses were carried out on their hemimaxillas. Shapiro-Wilk normality test was applied to data. The groups were assessed among each other and parametric data were evaluated using ANOVA test. All tests were conducted with p<0.05. Statistical differences were not observed among the groups. Therefore, we concluded that TFD combined with RAR or isolated obtained similar results to scaling and root planning.

Keywords: Photochemotherapy; Periodontitis; X-ray microtomography

LISTA DE ABREVIATURAS

TFD- Terapia fotodinâmica

aPDT- *Antimicrobial photodynamic therapy* ou Terapia fotodinâmica antimicrobiana

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

HE- Hematoxilina e Eosina

MicroCT (μ CT)- Microtomografia computadorizada ou Microtomografia por raios X

RAR- Raspagem e alisamento radicular

DP- Doença periodontal

IDP- Indução de doença periodontal

RAR- Raspagem e alisamento radicular

ROS- Reactive oxygen species ou Espécies reativas de oxigênio

nm- Nanômetro

J/cm²- Joule por centímetro quadrado

DMSO- Dimetilsulfóxido

μ l- Microlitro

Kv- Kilovolt

nm - Nanômetro

mJ – Mili joule

W – Watts

s – Segundos

% - Porcento (porcentagem)

ml – Mililitro

g – Grama

µm- Micrometros

µs – Microsegundos

mm – Milímetro

EDTA – Etileno-diamino tetra-acetato

¹O₂ - Oxigênio singleto

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Terapia Fotodinâmica	19
2.2 Fotossensibilizador Hipericina-glucamina	21
2.3 Terapia Fotodinâmica no tratamento da Periodontite	23
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODO	26
4.1 Comitê de Ética	26
4.2 Amostra	26
4.3 Preparo do Fotossensibilizador	26
4.4 LED	27
4.5 Preparo dos animais	27
4.6 Grupos Experimentais	28
4.7 Desenho Experimental	30
4.8 Obtenção das peças cirúrgicas	30
4.9 Microtomografia de raios X (μ-CT)	30
4.10 Processamento Histológico	32
4.11 Análise Histológica	32
4.12 Análise Histométrica	33
4.12.1 Área de furca	33
4.12.2 Área proximal	33
4.13 Análises Estatísticas	34
5 RESULTADO	35
5.1 Microtomografia de raios X (μCT)	35
5.2 Análise Histológica	37
5.3 Análise Histométrica – Área de Furca	42
5.4 Análise Histométrica –Áreas Proximais	43
6 DISCUSSÃO	44

7 CONCLUSÃO.....	47
8 REFERÊNCIAS	48
9 ANEXO.....	59

1 INTRODUÇÃO

A Doença periodontal se caracteriza por um conjunto de reações inflamatórias e imunológicas que o indivíduo desenvolve em resposta a agressão causada pelo biofilme bacteriano e seus subprodutos. Sua progressão e desenvolvimento dependem da ocorrência simultânea de fatores como a susceptibilidade local e sistêmica do hospedeiro, e da presença e manutenção de um ambiente adequado para o crescimento polimicrobiano^{2, 4, 26, 58}.

O tratamento mais indicado para a doença periodontal é a terapia baseada na raspagem e alisamento radicular (RAR)²⁵. A RAR visa a total remoção de substratos, deixando a superfície radicular lisa e descontaminada para que ocorra a diminuição da resposta inflamatória do hospedeiro, e assim, a regressão dos sinais clínicos com a reparação dos tecidos periodontais que foram afetados^{18, 25, 26, 30}.

No entanto, em exames de reavaliação clinicamente se observa que muitos sítios parecem não ser capazes de recuperar e manter a saúde periodontal²⁵. Estes sítios, em sua maioria, são profundos ou envolvem regiões de furca, invaginações e concavidades, o que dificulta o acesso para a realização de uma instrumentação adequada^{52, 58, 64}. Deste modo, é grande o número de profissionais que optam por métodos auxiliares à terapia periodontal.

O presente trabalho avaliou em ratos o efeito do uso da terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador hipericina-glucamina como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento da doença periodontal

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é parte da fotomedicina, divisão da medicina que utiliza a luz como tratamento. Os primeiros relatos de experimentos baseados na terapia fotodinâmica datam de 1900, quando Raab e Von Tappeiner avaliaram o efeito da acridina vermelha em cultura de paramécios, o causador da malária, e suspeitaram que a luminosidade do ambiente estaria alterando os resultados do experimento. Postularam portanto que haveria transferência de energia da luz para a substância química, assim como ocorre nos processos de fotossíntese. Deste modo, Von Tappeiner chamou o processo de “Ação Fotodinâmica”, e os estudos prosseguiram com novos corantes, agora denominados fotossensibilizadores e lâmpadas convencionais. Observou-se que, no entanto, a luz branca provocava aquecimento e conseqüentemente danos teciduais¹⁴. Hoje sabe-se que a TFD deve ser realizada com fonte de luz capaz de ser absorvida pelo fotossensibilizador, obtendo-se melhores resultados com lasers e LEDs¹³.

Quando a TFD é indicada para o tratamento de lesões infectadas, é chamada de terapia fotodinâmica antimicrobiana ou “aPDT” (do inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy*), sendo direcionada para o controle microbiano e indução da morte celular bacteriana^{11, 34, 52, 53, 55, 57}.

Na TFD, o fármaco denominado fotossensibilizador (FS), é aplicado sobre a lesão e após um período de incubação no escuro é aplicada uma fonte de luz com comprimento de onda capaz de ativar o FS utilizado. Ao ser estimulado, o fotossensibilizador transfere energia às moléculas circundantes, geralmente ao oxigênio molecular, produzindo radicais livres e moléculas altamente reativas e citotóxicas, como o oxigênio singlete^{11, 34, 52, 53, 55, 57}, que podem modificar as estruturas das membranas plasmáticas⁴⁸ e causar morte celular através de diversos mecanismos

incluindo: peroxidação lipídica, inibição do sistema enzimático, aglutinação proteica e pela reação com outros sistemas biológicos^{4, 51}.

A eficácia do tratamento com terapia fotodinâmica depende de fatores como o comprimento de luz, intensidade, tempo de exposição e modo de operação da fonte de luz utilizada, podendo ser proveniente de laser ou díodos emissores de luz (LEDs)^{3, 7, 12, 15, 19, 27, 28, 62, 66}.

A literatura comprova a eficácia do laser para acelerar a reparação tecidual em áreas normais ou infectadas, com ou sem o uso de fotossensibilizantes¹². De um modo geral, os lasers terapêuticos apresentam uma série de indicações, podendo ser usados isoladamente ou como coadjuvante de outros tratamentos, sempre que se necessite de efeito biológico local, uma vez que, modulam as células do sistema imune, estimulam a microcirculação, ativam a liberação de endorfinas e estimulam também a proliferação e a migração celular, desempenhando ação analgésica, anti-inflamatória e bioestimulante ou cicatrizante^{15, 66}. Estes efeitos estão provavelmente relacionados com a capacidade do laser em promover angiogênese, proliferação celular, aceleração da síntese de colágeno, inflamação, e aceleração de eventos envolvidos na reparação de tecidos^{3, 7, 62, 27}.

Choi et al.¹⁹ (2012) avaliaram a aplicação de LED (635nm) sobre fibroblastos gengivais humanos tratados ou não com LPS (lipopolissacarídeo) de *porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), inibiu a ativação de citocinas pró-inflamatórias, mostrando novamente que a irradiação com LED pode ser clinicamente útil como ferramenta anti-inflamatória. E Fonseca²⁸, em 2013, analisou o efeito da aplicação de LED (940nm) na cicatrização periodontal após tração ortodôntica experimental em ratos, e observou menor número de osteoclastos e células inflamatórias, além de apresentar mais vasos sanguíneos, sugerindo diminuição da inflamação e reabsorção radicular.

Oliveira Sampaio⁵³ em 2013, avaliou o efeito do laser (λ 660 nm) e do LED (λ 700 nm), sobre a proliferação de fibroblastos em feridas cutâneas em roedores com deficiência de ferro, e

observou que a aplicação de laser foi mais eficaz no aumento da proliferação de fibroblastos em ratos não-anêmicos, e a de LED, causou uma biomodulação positiva significativa da proliferação fibroblástica em animais anêmicos.

2.2 Fotossensibilizador Hipericina-glucamina

A Hipericina é um fotossensibilizador natural, presente em plantas herbáceas conhecidas como erva de São João (gênero *Hypericum perforatum*)³³. Possui propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, anti-infecciosas, antivirais, estimula a circulação sanguínea e elimina hematomas⁵⁴. Atualmente é utilizado como medicamento fitoterápico em quadros de distúrbios psicovegetativos, estados depressivos, medo e/ou ansiedade¹.

Na TFD, estudos têm mostrado o grande poder fototóxico da hipericina no tratamento da psoríase e outras doenças de pele³⁶, potente atividade anticâncer induzindo tanto apoptose quanto a necrose de células tumorais³¹, e capacidade de promover a inativação de microrganismos⁸², sendo considerado como um dos mais potentes fotossensibilizadores encontrados na natureza^{55, 61}.

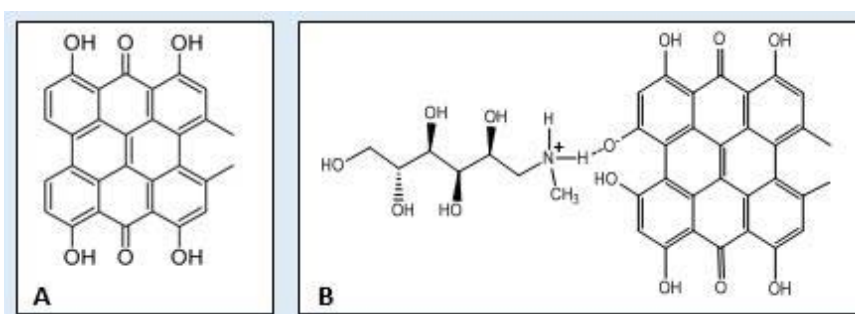
Yow⁶⁸, 2011, determinou o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica com hipericina em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e observou que a eficácia da terapia foi fortemente afetada pela estrutura celular e absorção do fotossensibilizador. A combinação da hipericina com a irradiação de luz induziu morte celular de *S. aureus* (Gram positivas), mas não foi efetiva para as células de *E.coli* (Gram negativas). A autora atribuiu tal resultado as diferenças estruturais de parede celular/membrana, que afetaram a captação celular de hipericina.

São parâmetros importantes para a ação do fotossensibilizador: solubilidade relativa em água e lipídios, constante de ionização, fatores específicos como as características de absorção

de luz, e a eficiência da formação do estado excitado tripleto ou da produção de oxigênio singlete^{22, 39}. Portanto, para uma maior eficiência da inativação dos microrganismos essas diferenças devem ser superadas modificando o FS quanto a sua hidrofobicidade e carga, de acordo com a característica celular de cada microrganismo^{24, 41}.

O fotossensibilizador hipericina possui característica hidrofóbica e perde a sua ação fotossensibilizadora quando em meio biológico, devido a auto agregação em meio aquoso e em muitos casos a uma subsequente precipitação que reduz drasticamente a capacidade de gerar oxigênio singlete, diminuindo sua efetividade na aPDT^{42, 60}. Uma estratégia proposta por estudiosos em química é a indução da formação de espécies supramoleculares hidrofílicas. Supramolécula é uma espécie química constituída por duas ou mais moléculas, unidas por interações moleculares, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade. No caso da hipericina (Figura 1A), para a formação de uma supramolécula hidrofílica, é induzida uma reação a partir do grupo fenólico, que cede o próton H^+ , formando a hipericina-glucamina (Figura 1B). A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula hipericina-glucamina, fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio serão estabelecidas, aumentando sua hidrofiliidade⁹.

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



2.3 Terapia Fotodinâmica no tratamento da Periodontite

Wilson⁶⁷, 1993, em um artigo de revisão sobre fotólise em bactérias orais, expôs que algumas bactérias que possuem compostos endógenos, podem absorver luz de comprimento de onda visível, o que levaria a excitação das moléculas destes pigmentos, que poderiam interagir com oxigênio molecular formando oxigênio singlete reativo e consequente morte celular⁵⁶.

A eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana, depende do tipo, da concentração e do modo de ação do fotossensibilizador, que por sua vez é influenciado pelo sítio de ação. O sítio de ação depende das características físico-químicas da interação microrganismo-fotossensibilizador, o que significa que deve-se considerar: a coloração do tecido, presença de sangramento ou fluidos, a condutividade térmica, pH, entre outros fatores locais⁶.

Devem ser levadas em consideração o tipo de bactéria, em qual meio se encontra, em biofilme ou suspensão planctônica. A literatura mostra que as bactérias Gram-positivas podem ser eliminadas por vários fotossensibilizadores em doses mais baixas de irradiação do que bactérias Gram-negativas³³.

Fontana et al.²⁹, 2009, avaliaram qual a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre espécies subgingivais em biofilmes e em fase planctônica. As amostras foram obtidas de pacientes com periodontite crônica. Para a TFD, foi empregado o corante azul de metileno (25µg / ml), incubação durante 5 min e exposição a luz vermelha. Os autores concluíram que bactérias em fase planctônica são mais afetadas pela TFD do que em biofilmes. No entanto, a efetividade do tratamento com TFD em biofilmes não é tão prejudicada quanto o tratamento com antibióticos para condições semelhantes²⁹.

Braun et al.¹¹, 2008, concluíram que a aplicação adicional de um único episódio de TDF à raspagem e alisamento radicular, resulta em maior redução dos escores de sangramento, do

que os sítios tratados apenas por raspagem e alisamento radicular. E Chondros et al.²⁰, 2009, observaram que 3 meses após a terapia, houve redução de *Fusobacterium nucleatum* e *Eubacterium nodatum* no grupo tratado com raspagem e alisamento radicular associada a TFD.

Os estudos do grupo de pesquisa de Garcia et al.³², 2013 e Theodoro et al.⁶³, 2013 que avaliaram a utilização da terapia fotodinâmica em associação a raspagem e alisamento radicular, em modelo experimental animal, concluíram que a aplicação de aPDT como tratamento adjunto à RAR reduziu significativamente os níveis de *A. actinomycetemcomitans*⁶³, além de observarem menor perda óssea em área de furca quando realizada apenas uma aplicação da TFD, não havendo melhoria no caso de aplicações sucessivas de TFD³².

Em suma, observa-se que a aPDT demonstrou efeito bactericida contra periodontopatogenos como *P. gingivalis*, *Agregactibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis*^{17, 35, 57}. Além de ser capaz de reduzir fatores-chave de virulência como lipopolisacarídeos e proteases^{10, 35, 38, 59}, e inativar citocinas inflamatórias do hospedeiro, tais como interleucina 1 β e TNF α ¹⁰.

Sabendo das propriedades hidrofílicas e anti-inflamatórias do fotossensibilizador hipericina-glucamina e que a TFD agrega benefícios ao tratamento mecânico em sítios de difícil acesso, diminuindo as indicações de tratamentos cirúrgicos a retalho, reduzindo o tempo de trabalho e o risco de bacteremia no ato do tratamento da doença periodontal⁴³, e observando que estudos clínicos demonstram que a RAR apresenta resultados melhorados quando associada a TFD^{5, 11, 20, 21}, objetivamos avaliar in vivo a influência da TFD, utilizando o fotossensibilizador hipericina-glucamina, no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica (TFD) com o fotossensibilizador hipericina-glucamina ativado por LED ($34,10 \text{ J/cm}^2$) associada ou não ao tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular no tratamento da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Comitê de Ética

O estudo foi submetido ao Conselho de Ética no Uso de Animal da FOAr-UNESP (CEUA) e aprovado em 09/05/2012. Proc. CEUA n° 07/2012 (Anexo 1).

4.2 Amostra

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

4.3 Preparo do Fotossensibilizador

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

4.4 LED

A fonte de luz utilizada neste experimento possui comprimento de onda 590nm, coincidindo com a banda de absorção máxima da hipericina, que não se altera para a hipericina-glucamina. Para isso, foi desenvolvido um LED de cor ambar, corrente de 700mA, comprimento de onda 590nm e potência convertida de 90mW (MM Optics, São Carlos/SP – Brasil). O LED foi aplicado por 6 minutos na dosagem de 34,10 J/cm².

4.5 Preparo dos animais

Cada animal foi pesado e em seguida anestesiado por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina, Cetamin, Syntec) e 0,04ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina, Xilazin, Syntec). Posteriormente, cada rato foi colocado em posição supina na mesa operatória. Para facilitar a abertura bucal e acesso a região posterior da maxila foi utilizado um retrator que afasta queixo e língua. As ligaduras (fios de algodão nº24) foram inseridas na região subgengival, em volta de um dos segundos molares superiores, escolhido de forma randômica (Figura 2). O tempo de indução da doença (permanência da ligadura) foi de 15 dias.

Figura 2 - Ligaduras inseridas no 2° molar superior.



4.6 Grupos Experimentais

Na Figura 3A, observamos a inflamação gengival presente no dia da remoção das ligaduras. Um dia após a remoção das ligaduras (Figura 3B), os animais foram novamente anestesiados para a realização dos tratamentos de acordo com o protocolo proposto para cada grupo, “baseline”.

Figura 3A - Segundo molar superior no momento da remoção da ligadura. Figura 3B. Segundo molar no dia seguinte a remoção da ligadura (observa-se margem gengival retraída e avermelhada na face palatina do 2º molar).



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

INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL (IDP): Somente indução da doença periodontal, não houve tratamento.

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

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

Figura 4 - Aplicação do LED sobre a oclusal do 2º molar superior.



GRUPO RASPAGEM + TFD (RAR+TFD): Raspagem e alisamento radicular (segundo protocolo do Grupo RAR) e, em seguida, aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (segundo protocolo do Grupo TFD).

4.7 Desenho Experimental



-15° dia: Inserção das ligaduras

Dia 0: Remoção das ligaduras

1° dia(Baseline): Aplicação dos tratamentos de acordo com o grupo ao qual o animal foi destinado.

7° dia: Eutanásia

15° dia: Eutanásia

30° dia: Eutanásia

4.8 Obtenção das peças cirúrgicas

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

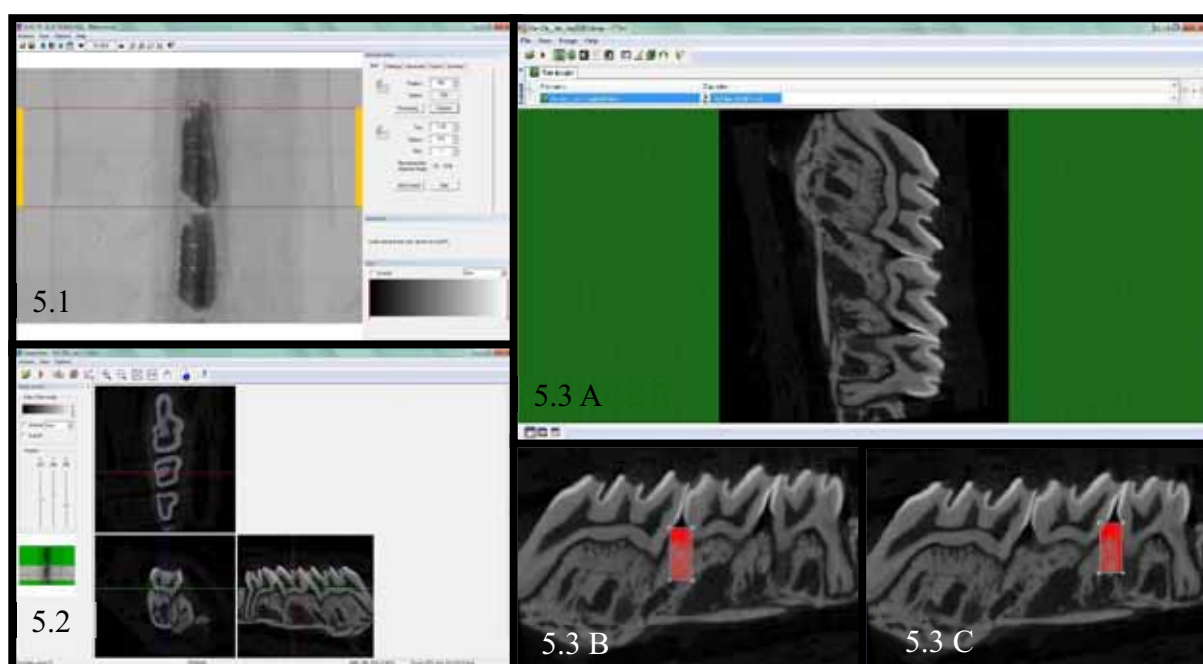
4.9 Microtomografia de raios X (μ -CT)

As hemimaxilas, armazenadas em álcool 70%, foram primeiramente submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de radiografia tridimensional (microtomografia digital computadorizada – MicroCt)⁵⁴. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 18 μ m (50Kv e 500 μ), as imagens obtidas pela projeção dos raios X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon (Figura 5.1).

Em seguida, por meio do software DataViewer (Figura 5.2), com a peça escaneada em imagens reconstruídas e reorientadas, delimitou-se uma área de interesse “ROI” com dimensões padronizadas de 1,26mm de altura por 0,56mm de largura nas áreas proximais (mesial e distal) do segundo molar, (Figuras 5.3 B e 5.3 C)⁴⁰. As medições foram realizadas por um examinador cego e calibrado.

O software CTAn (Figura 5.3 A), a partir da delimitação da região de interesse em 2D, promoveu a análise em 3D da mesma, pela soma coletiva de todos os “ROI”s de um conjunto contíguo de fatias de imagens transversais. Deste modo, com o threshold 55-250 na escala de tons de cinza, foi obtido o percentual de volume do tecido ósseo presente nas áreas de interesse previamente delimitadas (ROIs). Para a análise, foi utilizado o valor médio entre ROI mesial e distal.

Figura 5.1 - Software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). 5.2 - Software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit). 5.3 A - Software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012



Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0). 5.4 B - ROI posicionado na face mesial do 2° molar. 5.5 C - ROI posicionado na face distal do 2° molar.

4.10 Processamento Histológico

Após o período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 24h e submersas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) para descalcificação por um período de 11 semanas, com 3 trocas semanais. Posteriormente, as peças foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados da face vestibular para a palatina, ao longo do eixo do dente com 4 µm de espessura. As cortes começaram a ser montados em lâmina assim que fosse possível visualizar o primeiro terço das raízes do segundo molar. Foram obtidas para cada bloco, 10 lâminas com 3 cortes cada. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

4.11 Análise Histológica

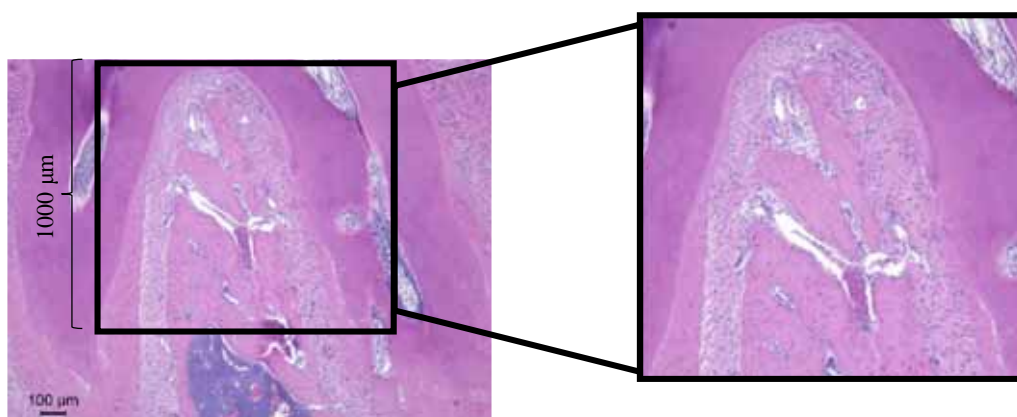
As lâminas foram posicionadas no microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes, através do qual as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão).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

4.12 Análise Histométrica

4.12.1 Área de furca

Para realização da histometria, um examinador cego e calibrado selecionou 2 lâminas de cada grupo, tendo por critério a presença da porção central da polpa. A área da região de furca foi delimitada de acordo com a metodologia de Cesar Neto et al.¹⁶ 2006 (Figura 6). Para mensurar a porcentagem de osso nas maxilas tratadas, foi delimitada a área total da furca, e em seguida somente o osso presente na furca.

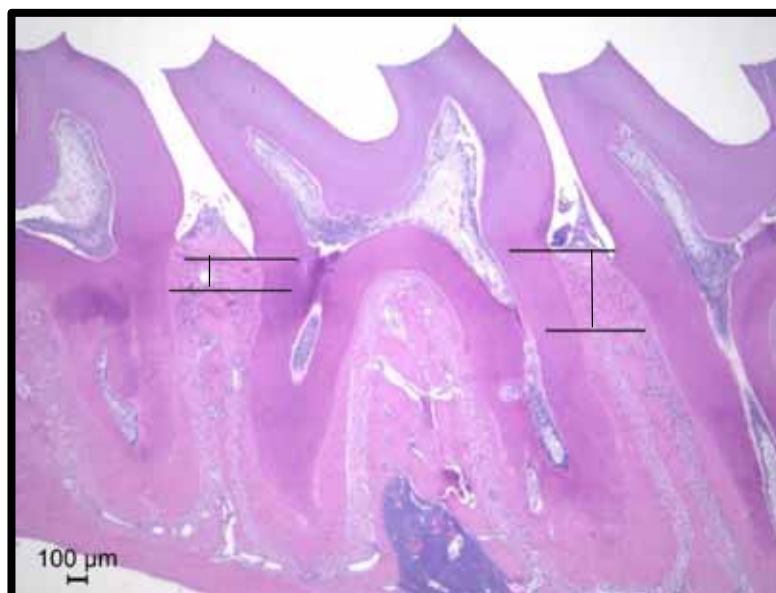
Figura 6 - Delimitação da área de furca para análise de porcentagem de perda óssea.



4.12.2 Área proximal

Os valores da extensão da perda óssea para a área proximal foram obtidos de imagens com aumento de 10 vezes. Foram traçadas linhas na altura da junção cimento-esmalte, e na altura da crista óssea (Figura 7). Com a ajuda do software Image J a distância entre elas foi medida, inicialmente em micrometros e posteriormente transformados em milímetros.

Figura 7 - Medida da perda óssea interproximal mesial e distal.



4.13 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Graphpad 5.0* (Graphpad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA. Todas as análises foram aplicadas com nível de significância de 95%.

5 RESULTADO

5.1 Microtomografia de raios X (μ CT)

O teste ANOVA ($p < 0.05$) foi utilizado para a análise de porcentagem de volume ósseo e não demonstrou haver diferenças significativas entre os grupos. A Figura 8 e a Tabela 1 mostram uma representação das amostras dos grupos experimentais. Na Figura 9 temos um esquema representativo das amostras em 3D geradas pela Microtomia de raios X.

Figura 8– Porcentagem de tecido ósseo presente nas regiões proximais em todos os grupos e períodos avaliados. Dados expressos em média.

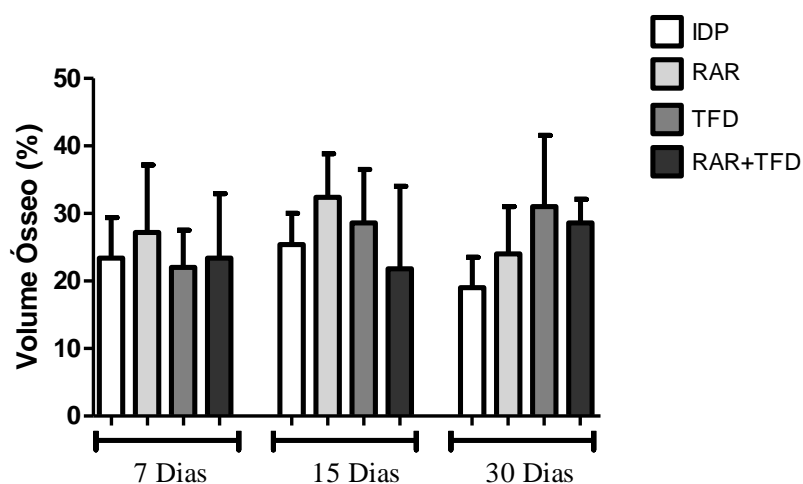
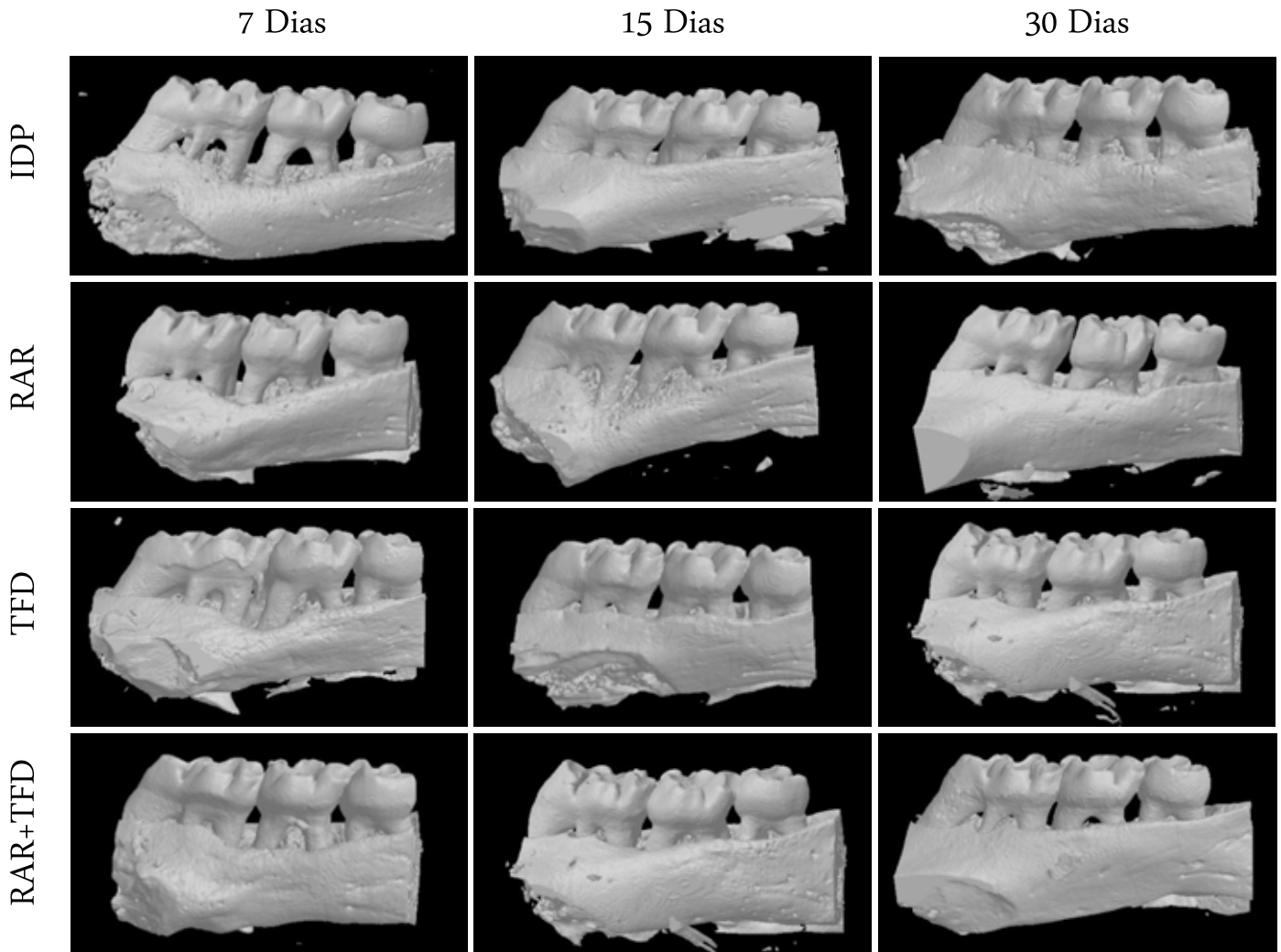


Tabela 1 – Área de tecido ósseo presente na região proximal do primeiro molar superior, referente aos diferentes grupos e períodos experimentais avaliados. Dados expressos em média (porcentagem) \pm desvio padrão

Período (dias)	Grupos			
	IDP	RAR	TFD	RAR + TFD
7	24 \pm 5.33	27 \pm 8.8	22 \pm 5.03	23 \pm 8.4
15	26 \pm 4.0	32 \pm 5.75	29 \pm 7.1	22 \pm 10.9
30	19 \pm 4.2	24 \pm 6.1	31 \pm 9.4	29 \pm 3.3

Figura 9- Esquema representativo das amostras em 3D geradas pela Microtomia de raios X

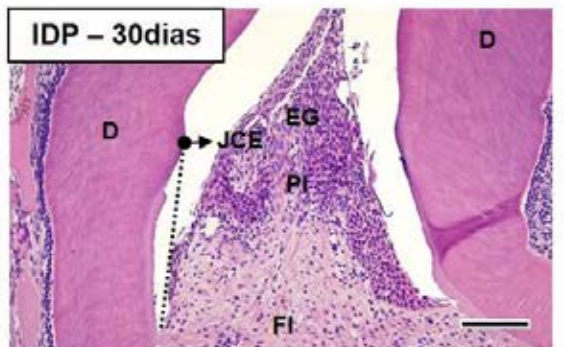
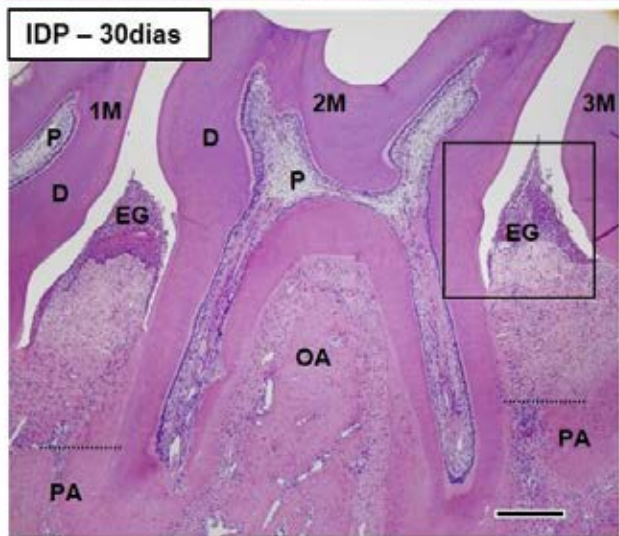
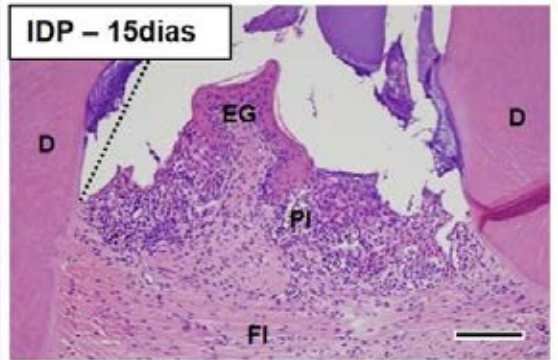
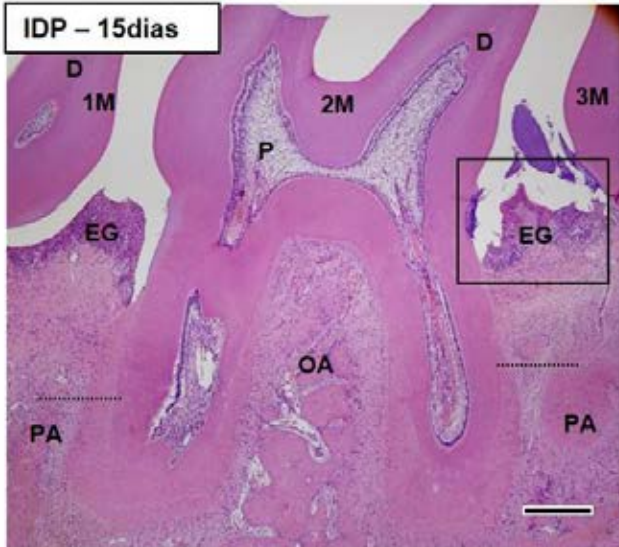
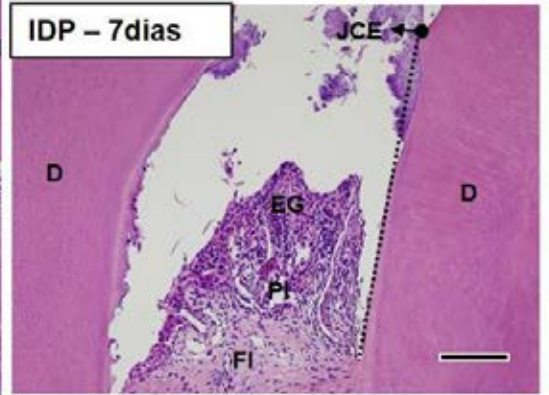
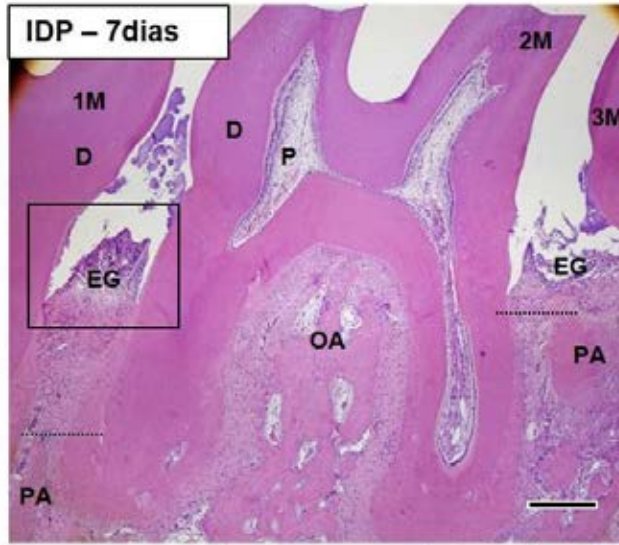


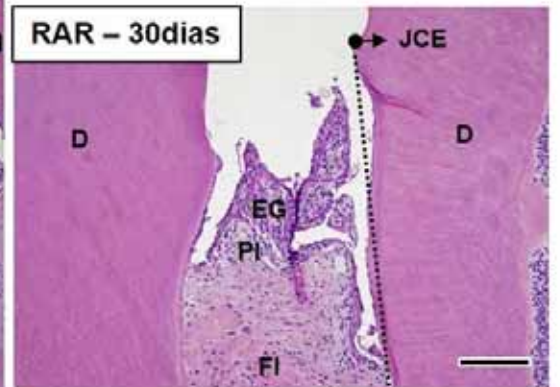
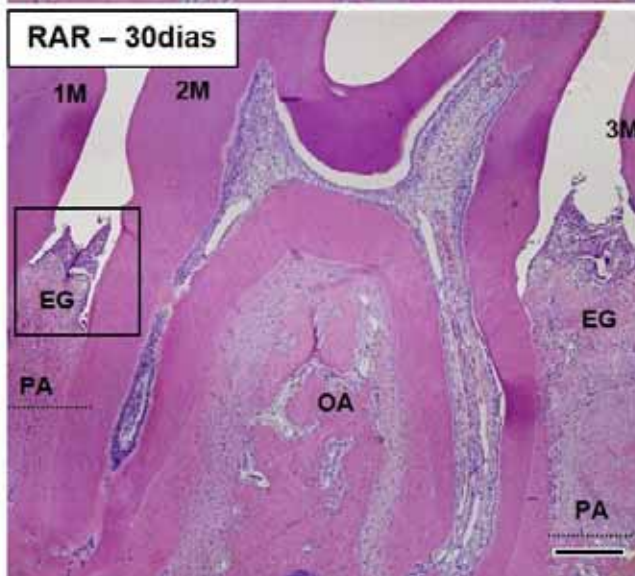
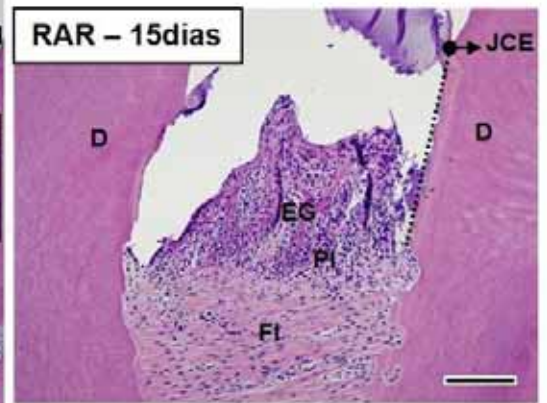
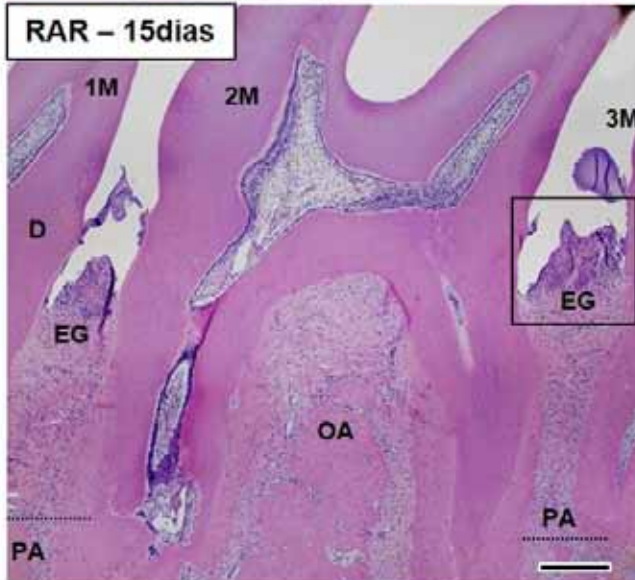
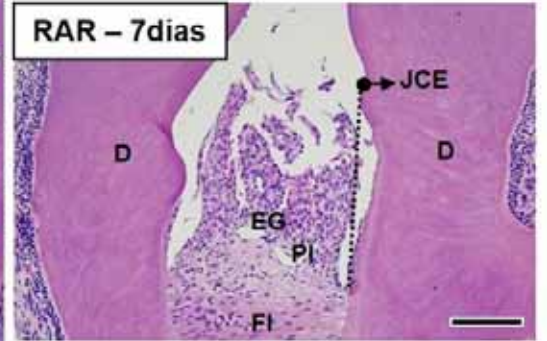
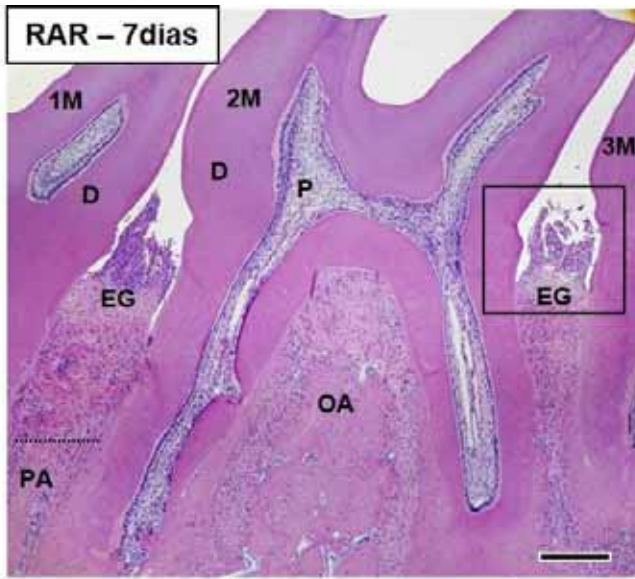
5.2 Análise Histológica

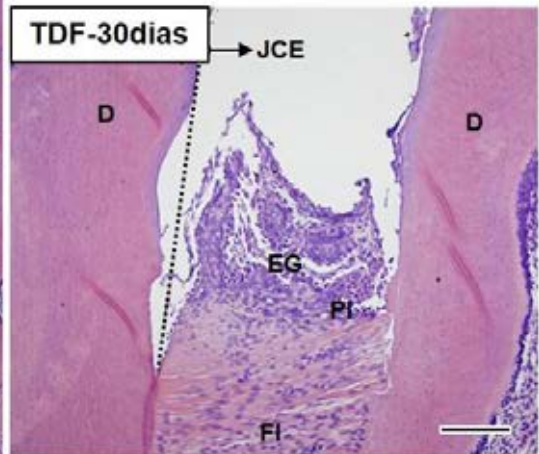
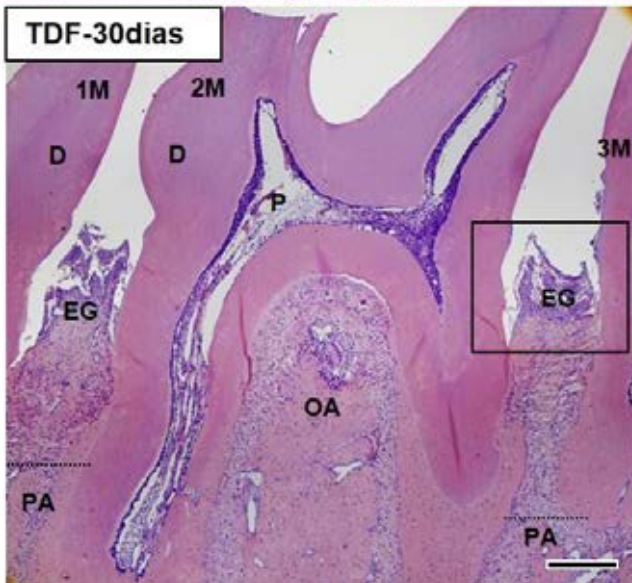
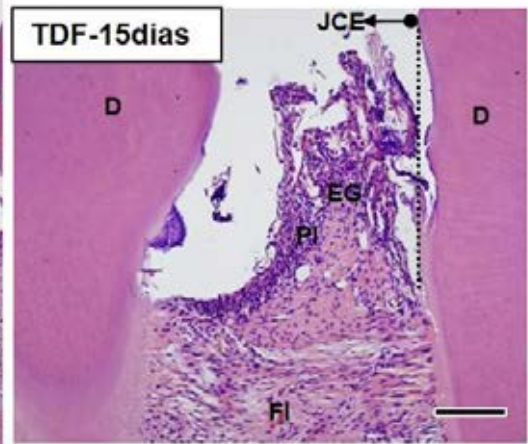
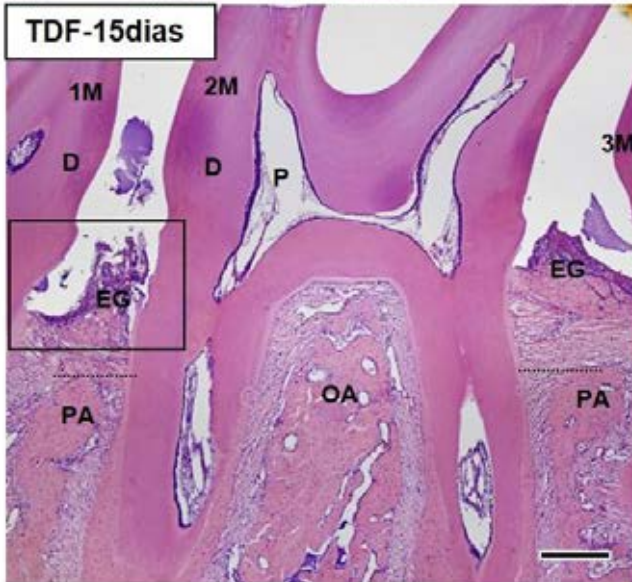
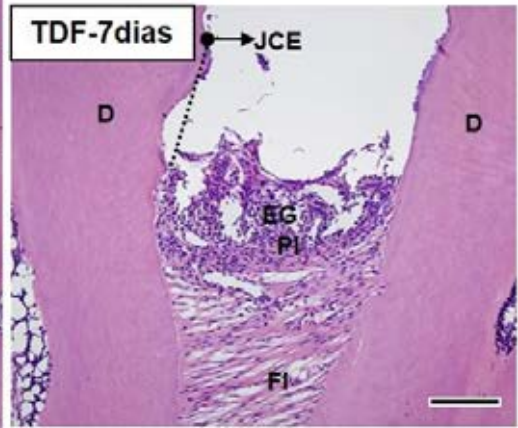
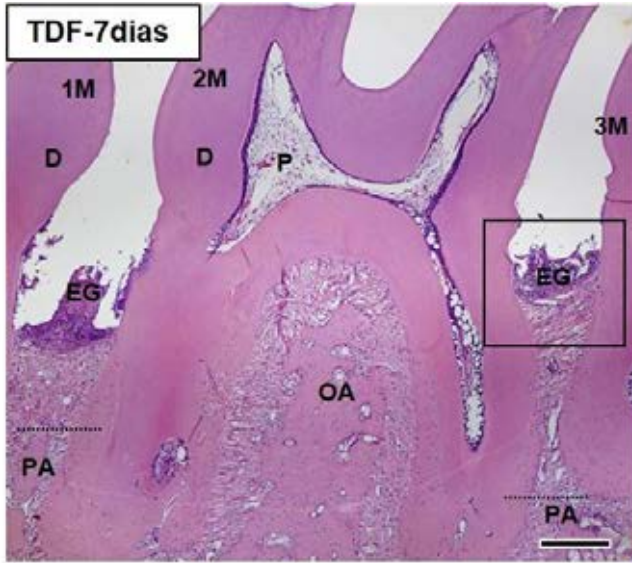
O periodonto dos animais do grupo IDP (Figura 10) mostrou várias alterações morfológicas. Aos 7 dias, um intenso processo inflamatório foi observado na lâmina própria da gengiva interdentária nos animais. A gengiva interdentária, frequentemente, apresentou-se ulcerada; o epitélio gengival estava adjacente à superfície do cimento acelular, ou seja, apicalmente à junção cimento-esmalte. Uma evidente redução no processo inflamatório foi observada nos períodos subsequentes, de maneira gradativa.

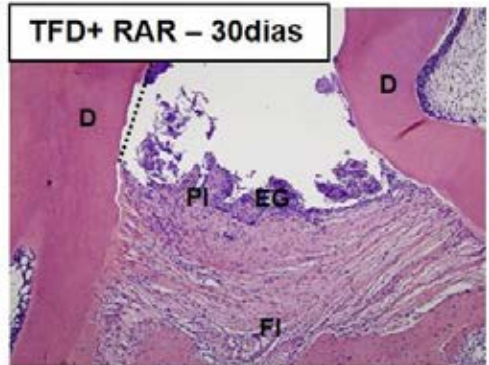
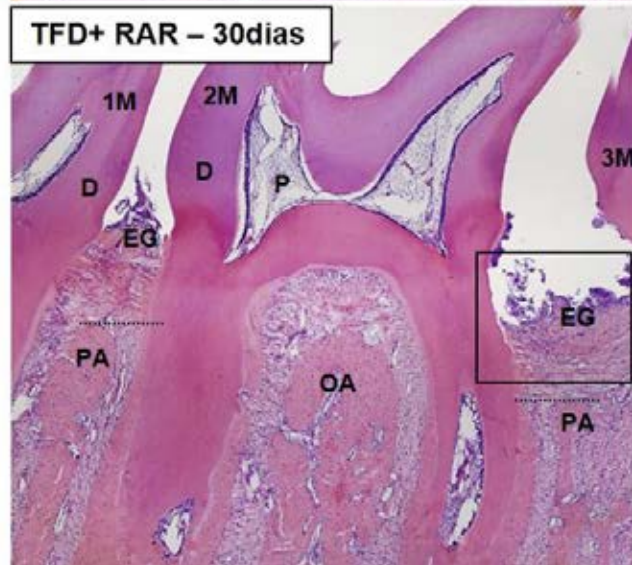
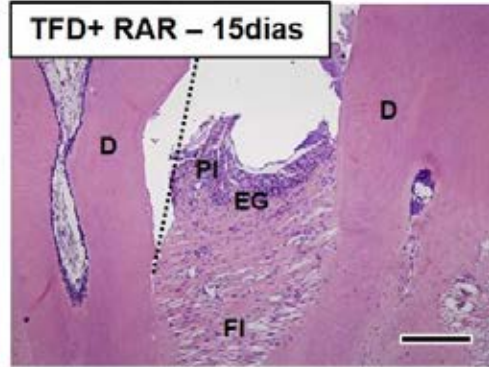
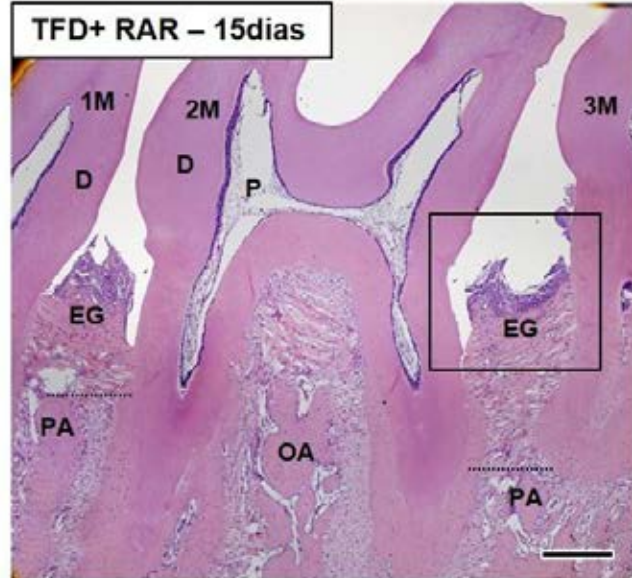
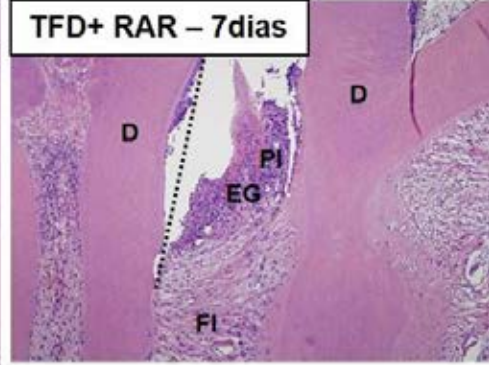
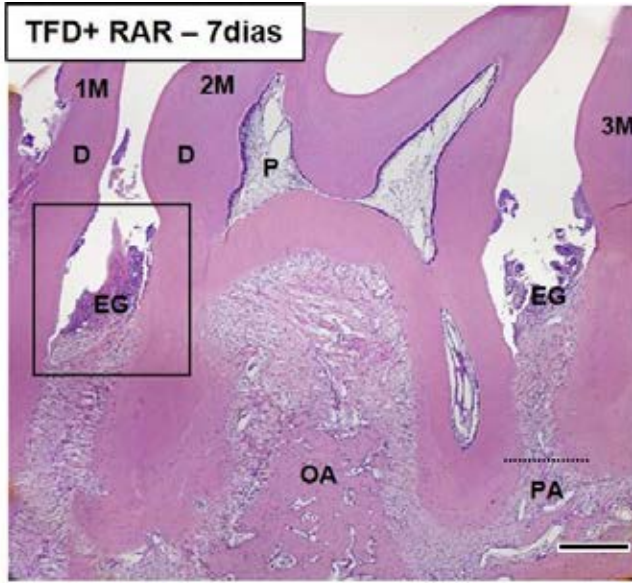
A análise dos grupos RAR, TFD e RAR+TFD (Figuras 11, 12 e 13) apresentou as mesmas características histológicas encontradas para o grupo IDP, no entanto, com menor intensidade, deste modo as descrições histológicas foram semelhantes para todos os grupos experimentais. As imagens têm o objetivo de ilustrar os tecidos periodontais dentro de cada tratamento nos diferentes períodos.

Figuras 10, 11, 12 – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas de ratos dos grupos IDP, RAR, TFD e TFD + RAR, respectivamente, nos diferentes períodos de 7, 15 e 30 dias, no aumento de 10x, mostrando o processo alveolar (PA) formado por trabéculas ósseas irregulares, situado entre os 1º (1M) e 2º (2M) e entre os 2º (2M) e 3º (3M) molares. A porção cervical do processo alveolar (PA) situa-se junto ao terço apical das raízes do 2M. Foi observado reabsorção do osso alveolar (OA) na região de furca. No aumento de 4x, o epitélio gengival (EG) está situado apicalmente à junção cimento-esmalte (JCE), em que a mucosa gengival exibe processo inflamatório (PI) evidente e a papila interdentária destruída. JCE, junção cimento-esmalte; EG, epitélio gengival; D, dentina; P, polpa dentária; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar da região de furca. HE. x10 – Bar: 80. x4 – Bar: 330.









5.3 Análise Histométrica – Área de Furca

Para a análise de volume ósseo presente em área de furca, o teste ANOVA ($p < 0.05$), foi utilizado e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A Figura 14 e a Tabela 2 mostram uma representação das amostras dos grupos experimentais.

Figura 14 – Porcentagem de volume ósseo na região de furca em todos os grupos e períodos avaliados. Dados expressos em média.

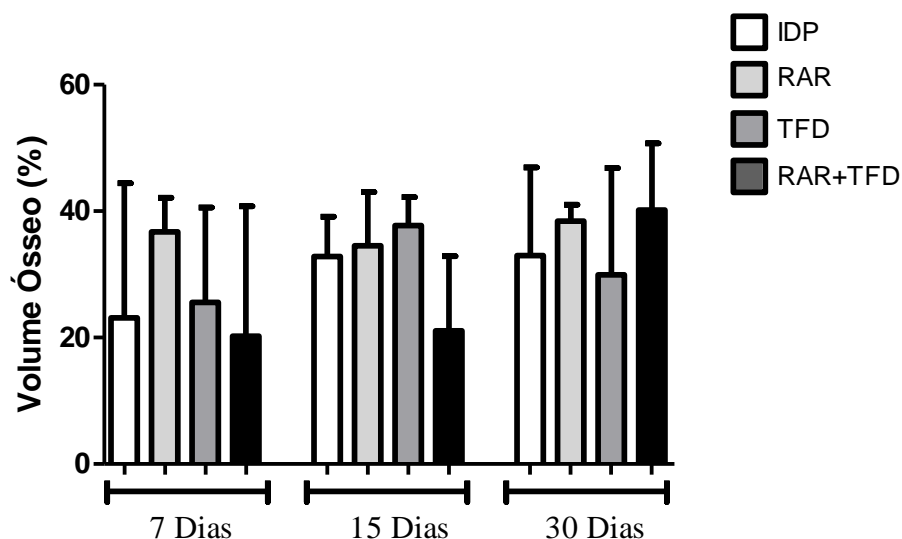


Tabela 2 – Porcentagem de volume ósseo na região de furca do segundo molar superior, referente aos diferentes grupos e períodos experimentais avaliados. Dados expressos em média (porcentagem) \pm desvio padrão.

Período (dias)	Grupos			
	IDP	RAR	TFD	RAR + TFD
7	23 \pm 19	36 \pm 5	25 \pm 13	20 \pm 18
15	32 \pm 5	34 \pm 7	37 \pm 4	21 \pm 10
30	32 \pm 12	38 \pm 2	29 \pm 15	40 \pm 8

5.4 Análise Histométrica – Áreas Proximais

O teste ANOVA ($p < 0.05$) foi utilizado para a análise da distância média entre junção cemento-esmalte (JCE) e crista óssea das faces proximais de cada dente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A Figura 15 e a Tabela 3 mostram uma representação das amostras dos grupos experimentais.

Figura 15 – Distância entre JCE à crista óssea nas regiões proximais (média entre face proximal e mesial) em todos os grupos e períodos avaliados. Dados expressos em média.

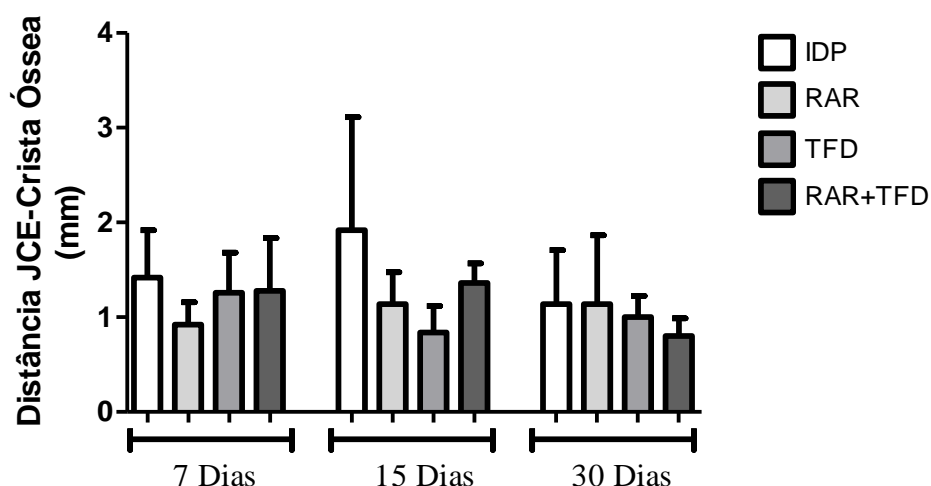


Tabela 3 – Distância entre JCE à crista óssea nas regiões proximais (média entre face proximal e mesial) referente aos diferentes grupos e períodos experimentais avaliados. Dados expressos em média (porcentagem) \pm desvio padrão

Período (dias)	Grupos			
	IDP	RAR	TFD	RAR + TFD
7	1.4 \pm 1.5	0.9 \pm 0.2	1.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.5
15	1.9 \pm 1.2	1.1 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2
30	1.1 \pm 0.6	1.1 \pm 0.7	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2

6 DISCUSSÃO

O tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular com a aplicação de terapia fotodinâmica tem demonstrado resultados promissores no tratamento da doença periodontal^{5, 11, 20, 21, 32, 63}.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica associada ao fotossensibilizador hipericina-glucamina, como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento da doença periodontal. Os achados histológicos, histométricos e microtomografia de raio X não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

Os grupos nos quais foi aplicado o tratamento com terapia fotodinâmica (TFD e RAR+TFD) apresentaram resultados semelhantes aos obtidos no grupo onde foi realizada apenas a raspagem e alisamento radicular (RAR). Estes resultados demonstram que o fotossensibilizador hipericina-glucamina não acarretou nenhum dano aos tecidos periodontais. Melo et al.⁴⁴, 2014 avaliou a hipericina com relação à hipericina-glucamina em cultura de células epiteliais e os resultados obtidos demonstraram que a hidrofiliabilidade é uma característica que aumenta a eficiência do fotossensibilizador, conservando sua seletividade. Outra justificativa para estes resultados é o tempo de ação do fotossensibilizador, onde o oxigênio singleto formado na reação durante a ativação da hipericina pela luz, tem um tempo de ação curto e por isso, seu raio de ação é limitado (20nm), o que significa que ele só agirá no local onde a hipericina-glucamina for exposta a luz. A este fato devemos a alta seletividade da terapia fotodinâmica com hipericina-glucamina⁴⁴, pois evita interações com os tecidos adjacentes.

O princípio de ação da terapia fotodinâmica está na formação das ROS do inglês *reactive oxygen species*, ou espécies reativas de oxigênio. A hipericina é uma quinona policíclica, que quando ativada reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio

induzindo a produção do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) mesmo em baixas concentrações ($<0.1 \mu\text{g/mL}$), sendo considerada mais potente⁶⁸, e fotoestável que a maioria dos fotossensibilizadores^{9, 44, 65, 69}. O fotossensibilizador hipericina-glucanina utilizada no nosso estudo apresenta em relação a hipericina a vantagem de poder ser utilizado em menores concentrações devido sua característica hidrofílica, permitindo que o fotossensibilizador possa penetrar na célula alvo com maior facilidade e com menor agregação^{37, 49}. Sendo que a hipericina-glucanina é uma modificação do fotossensibilizador hipericina, mantivemos a concentração de 10mcg/mL para a hipericina-glucanina utilizada neste estudo.

Melo et al.⁴⁴, em 2014, avaliaram a ação da hipericina, em comparação a hipericina-glucaminana, seu derivado mais hidrossolúvel, na inativação seletiva das bactérias *S. aureus* e *E. coli*. O estudo concluiu que a hidrofiliidade é uma característica que aumenta a eficiência fotodinâmica dos fotossensibilizadores, sugerindo que essa inativação esteja relacionada à maior acumulação intracelular do fotossensibilizador hidrofílico pelas bactérias. Esse fato pôde ser observado nos ensaios de fotoinativação de *E. coli* e *S. aureus*, uma vez que a hipericina-glucanina provocou maior inibição das bactérias que a hipericina, sem que houvesse prejuízo da seletividade do fotossensibilizador⁴⁴.

Embora os resultados obtidos nos grupos com a terapia fotodinâmica tenham sido iguais ao grupo RAR, alguns fatores devem ser discutidos. A metodologia utilizada constou de somente uma aplicação da TFD, e embora estudos demonstrem resultados positivos com apenas uma aplicação^{20, 32}, a maioria dos relatos com TFD, em odontologia ou para tratamentos de câncer, apresentam melhora gradativa dos resultados quando são realizadas aplicações consecutivas²³. Outros fatores importantes para a técnica de TFD, são a concentração do fotossensibilizador e o tempo de incubação aguardado para aplicação da luz. Por se tratar de um sítio doente, com processo

inflamatório crônico presente, mesmo aguardando-se um dia de intervalo entre remoção da ligadura e aplicação dos tratamentos, pode ter ocorrido interação do fotossensibilizador com a hemoglobina presente no sulco gengival, antes que ele pudesse reagir com os microorganismos presentes no sítio, diminuindo sua eficácia⁶.

Na análise por microtomografia computadorizada, não foram encontradas diferenças estatísticas, no entanto, observamos que o grupo com tendência a menor volume ósseo foi o grupo IDP. Os grupos RAR e TFD apresentaram proximidade de resultados nos três períodos experimentais, tendo uma tendência à maior porcentagem de volume ósseo nas proximais dos grupos tratados com RAR nos períodos de 7 e 15 dias, sendo que em 30 dias a tendência se voltou para o grupo TFD.

A diferença de resultados entre a análise histométrica e microCT, pode estar relacionada com as características das avaliações. O exame utilizando a microtomografia promove uma varredura em 3D de toda a amostra, obtendo um volume ósseo total ao redor do dente. Na avaliação histométrica, foram escolhidos dois cortes para representar todo o dente, sendo que estes podem não representar o que estava ocorrendo ao longo de toda a furca.

Embora os dados obtidos no presente estudo não apontem diferenças estatisticamente significantes, demonstram tendências de que a terapia fotodinâmica adjunta ou não ao tratamento mecânico, apresenta resultados comparáveis ao tratamento com raspagem e alisamento radicular. Deste modo, sendo o método promissor, mais estudos são necessários, alterando concentração, tempo de incubação do fotossensibilizador e dose de luz empregada.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, concluímos que a terapia fotodinâmica com hipericina-glucamina, adjunta ou não ao tratamento mecânico, apresenta resultados comparáveis ao tratamento com raspagem e alisamento radicular. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entendimento e aperfeiçoamento da terapia.

8 REFERÊNCIAS*

1. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(3): 221-41.
2. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007; 78(3): 566-75.
3. Al-Watban FAH, Zhang XY. Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg.* 1997; 15(5): 209-15.
4. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planning. *J Clin Dent.* 2007; 18(2): 1-5.
5. Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(4): 605-13.
6. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2010; 81(1): 4-14.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.

Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

7. Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995; 16(4): 331-42.
8. Bernal C, Rodrigues JAO, Guimarães APP, Ribeiro AO, Oliveira KT, Imasato H, et al. Selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin. *Laser Physics.* 2011; 21(1): 245-9.
9. Bernal C, Tominagal TT, Ribeiro AO, Imasato H, Perussi JR. Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8(2): 190.
10. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009; 80(11): 1790-8.
11. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(10): 877-84.
12. Breivik T, Thrane OS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci* 1996; 104(4 (Pt 1)): 327-34.
13. Brundish DE, Love WG, Photodynamic therapy comes of age. *IDrugs.* 2000; 3(12): 1487-508.

14. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 78(1): 1-6.
15. Catão MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral* 2004; 3(85): 214-8.
16. César Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr FH. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodont Res*. 2006; 41(2): 118-23.
17. Chan Y, Lai C. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2003; 18(1): 51-5.
18. Checchi L, Montevicchi M, Gatto RM, Moreschi A, Checchi V. Clinical efficacy of two toothbrushes with different bristles. *Int J Dent Hyg* 2007; 5(4): 242-6.
19. Choi H, Lim W, Kim I, Kim J, Ko Y, Kwon H, et al. Inflammatory cytokines are suppressed by light-emitting diode irradiation of *P. gingivalis* LPS-treated human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(2): 459-67.

20. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rossler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to nonsurgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med. Sci.* 2009; 24(5): 681-8.
21. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2008; 79(9): 1638-44.
22. Corona MC, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95(2): 71-80.
23. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009; 6(3-4): 170-88.
24. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of Cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2329-35.
25. Drisko CH. The use of locally-delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(11): 947-52.

26. Echeverría JJ, Sanz M. Controle mecânico da placa supragengival. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 435-45.
27. Enwemeka CS. Laser photostimulation. Clin Lab Manage Rev. 1990; 10(3): 24-9.
28. Fonseca PD, de Lima FM, Higashi DT, Koyama DF, Togninho Filho de O, Dias IF, et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats. Lasers Med Sci. 2013; 28(1): 49-55.
29. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. J Periodontal Res. 2009; 44(6): 751-9.
30. Franzò D, Philpotts CJ, Cox TF, Joiner A. The effect of toothpaste concentration on enamel and dentine wear in vitro. J Dent 2010; 38(12): 974-9.
31. Fox FE, Niu Z, Tobia A, Rook AH. Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. J Invest Dermatol. 1998; 111(2): 327-32.

32. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, Santinoni Cdos S, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(1): 143-50.
33. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 436-50.
34. Hayek RRA, Araújo NS, Glosso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol.* 2005; 76(8): 1275-81.
35. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5): 468-81.
36. Kamuhabwa AR, Roelandts R, de Witte PA. Skin photosensitization with topical hypericin in hairless mice. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 53(1-3): 110-4.
37. Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2010; 11(2): 562-94.
38. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000; 72(5): 676-80.

39. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 294(2): 133-40.
40. Macedo PD, Tsurumaki JN, Rossa-Junior C, Marcantonio RAC. Quantificação de volume ósseo em microtomografia computadorizada: comparação entre diferentes áreas de interesse (ROI). *Proceedings of the 30 th SBPqO Annual Meeting; 2013. Braz Oral Res.* 2013; 27(Suppl. 1) :294
41. Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of Novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4): 1542-52.
42. Malkin J, Mazur Y. Hypericin derived triplet states and transients in alcohols and water. *Photochem Photobiol.* 1993; 57(1): 929-33.
43. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 79(2): 159-70.
44. Melo WCMA. Fotoinativação seletiva dos microrganismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* [tese de doutorado]. São Carlos: Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC da USP; 2014.

45. Melo WCMA, Castro LF, Dal'Mas MTS, Perussi JR. Effectiveness of photodynamic therapy on Gram-negative bacteria. In: Méndez-Vilas A. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex; 2011. p. 262-7.
46. Melo WCMAM, Perussi JR. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2012; 33(3): 331-40.
47. Melo WCMA, Perussi JR, Hamblin MR. Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin. Photodiag Photodyn Ther. 2013; 10(4): 647-50.
48. Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 2000; 57(1): 1-13.
49. Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RS, Graciano AX, et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. Photodiag Photodyn Ther. 2012; 9(2): 122-31.
50. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. J Photochem Photobiol B Biol. 1997; 39(1): 1-18.

51. Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminar randomized controlled clinical study. *J Periodontal Res.* 2007; 78(6): 965-73.
52. Oliveira Sampaio SC, de C Monteiro JS, Cangussú MC, Pires Santos GM, dos Santos MA, dos Santos JN, et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(3): 799-806.
53. Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol.* 2007; 78(2): 273-81.
54. Perussi, JR. Inativação fotodinâmica de microorganismos. *Quim Nova.* 2007; 30(4): 988-94.
55. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(5-6): 551-6.
56. Pfitzner A, Sigush BH, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol Res.* 2004; 75(10): 1343-9.
57. Quin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YK, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontol Res.* 2008; 43(2): 162-7.

58. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*. 2005; 76(7): 1100-5.
59. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*. 2002; 25(5): 801-7.
60. Stupáková V, Varinská L, Mirossay A, Sarisský M, Mojzis J, Dankovcík R, et al. Photodynamic effect of hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. *Phytother Res*. 2009; 23(6): 827-32.
61. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE, Belkin M. Effect of low-level energy laser on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers Surg Med* 1983; 2(3): 267-274.
62. Theodoro LH, Pires JR, Fernandes LA, Gualberto-Júnior EC, Longo M, Almeida JM, et al. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci*. 2013 Aug 3. [Epub ahead of print]
63. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000*. 2004; 36(1): 98-120.

64. Vuong TT, Vever-Bizet C, Bonneau S, Bourg-Heckly G. Hypericin incorporation and localization in fixed HeLa cells for various conditions of fixation and incubation. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10(4): 561-8.
65. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Austr Dental J* 1997; 42(4): 247-54.
66. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol.* 1993; 75(4): 299-306.
67. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z, Christine MN. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3): 626-32.
68. Zanolli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev.* 2004; 10(3): 203-18.

9 ANEXO

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 07/2012

Araraquara, 09 de Maio de 2012

Senhores Pesquisadores:

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

Atenciosamente.


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

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

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 24/03/2017

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 24 de março de 2014

Paula Delello Macedo