



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

RENATA PIRONATO FERREIRA

**Efeito fotodinâmico da curcumina no tratamento da
periodontite induzida em ratos: Análise microbiológica.**

ARAÇATUBA – SP

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

RENATA PIRONATO FERREIRA

**Efeito fotodinâmico da curcumina no tratamento da
periodontite induzida em ratos: Análise microbiológica.**

Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Leticia
Helena Theodoro

ARAÇATUBA – SP

2014

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, **PAULO RENATO FERREIRA**, minha mãe **SONIA ELISA PIRONATO FERREIRA**, e minha irmã **NATHÁLIA PIRONATO FERREIRA PEIXOTO**, as quais são pessoas a quem devo eterna gratidão pelo amor, pela paciência e pelo companheirismo a mim dedicados em todos os momentos. Pessoas que me ensinaram os valores de honestidade, integridade, caridade e perseverança, me guiando sempre no caminho de Deus para que buscasse aperfeiçoamento como ser humano. A vocês dedico tudo o que conquistei e me tornei, pois isso é fruto do que me ensinaram, e reconheço meu eterno carinho, amor e admiração às pessoas maravilhosas com quem me foi permitido trilhar o caminho terreno.

AGRADECIMENTOS

À professora **LETÍCIA HELENA THEODORO** pela disponibilidade em me ajudar com minhas dúvidas, sempre pacienciosa e atenciosa em todos os momentos, me orientando durante todos os anos de convivência, seja na área de pesquisa ou na parte teórica e clínica da graduação, contribuindo grandemente para o meu enriquecimento intelectual e científico.

À professora **CRISTIANE DUQUE**, pela atenção durante todo o andamento da pesquisa, colaborando também para o engrandecimento de meu conhecimento científico com sua disposição e interesse em passar seus ensinamentos.

À doutoranda **MARIÉLLEN LONGO**, pela orientação, amizade e paciência, além da grande dedicação para a conclusão deste trabalho.

À banca examinadora Prof^a Dr^a **LETÍCIA HELENA THEODORO**, Prof^a Dr^a **CRISTIANE DUQUE** e a Doutoranda **MARIÉLLEN LONGO**, pela disponibilidade em avaliar este trabalho, colaborando assim, para o seu aprimoramento e enriquecimento.

À disciplina de **PERIODONTIA** e ao departamento de **CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

À Reitoria da **UNESP** e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** pela concessão de bolsa de iniciação científica (**Processo FAPESP 2012/19241-5**) e pelo auxílio para desenvolvimento desta pesquisa (**Processo FAPESP 2012/ 192413-8**).

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de sua Diretora Prof^a. Dra. Adj. **ANA MARIA PIRES SOUBHIA** e Vice-Diretor Prof. Tit. **WILSON ROBERTO POI**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, **PAULO** e **SONIA**, as primeiras pessoas a me proporcionarem a oportunidade de estar aqui, aqueles que sempre acreditaram em mim mais do que eu mesma e me incentivaram a superar os obstáculos encontrados ao longo dos anos em diferentes momentos de minha vida, inserindo ao meu dia a dia, mesmo com a distância, amor, serenidade e incentivo para prosseguir em direção aos meus ideais. Sem eles não seria possível chegar onde me encontro hoje e devo a eles tudo o que conquistei até o momento.

À minha irmã e sem dúvidas minha melhor amiga **NATHÁLIA**, a qual sempre me apoiou, aconselhou e me deu forças em todos os momentos, fazendo-se presente em todas as minhas decisões, agindo muitas vezes como uma segunda mãe.

Ao meu cunhado **BRUNO**, um presente enviado à nossa família, de um coração e bondade enormes, pela paciência e boa vontade em me ajudar, seja com uma conversa ou em alguma divisão de tarefas comuns.

Às minhas amigas **LÍGIA** e **LUDIMILA**, que além de serem minhas companheiras de sala, tornaram-se companheiras de vida, dividindo comigo todas as etapas transcorridas durante estes cinco anos de convivência em nosso eterno apartamento 131. Tenho um carinho muito grande por vocês e saibam que aqui vocês encontram uma irmã de coração.

Aos companheiros **MAURÍCIO**, **BRUNA**, **MARIANA** e **ANELISE**, grandes amigos que tive a oportunidade de conviver e aprender e que fazem parte da grande família que formei em Araçatuba.

EPÍGRAFE

“Em qualquer dificuldade ou impedimento, não te esqueças de usar um pouco mais de paciência, amor, renúncia e boa vontade, em favor de teu próprio bem-estar. O segredo da vitória, em todos os setores da vida, permanece na arte de aprender, imaginar, esperar e fazer mais um pouco.”

Francisco Cândido Xavier

FERREIRA, R.P. Efeito fotodinâmico da curcumina no tratamento da periodontite induzida em ratos: Análise microbiológica. 2014. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar do ponto vista microbiológico a influência da curcumina como agente fotossensibilizador associada à irradiação com *Light Emitting Diode* (LED), na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), para o tratamento da periodontite experimentalmente induzida em ratos. Noventa e seis animais foram submetidos à indução da periodontite via instalação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores, o qual foi mantido durante 7 dias. A seguir os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos com 24 animais cada um, os quais receberam os seguintes tratamentos, nos períodos de 7, 15 e 30 dias: G1 (n=24) - não sofreram nenhum tratamento local; G2 (n=24) – irrigação com solução de curcumina (40µM); G3 (n=24) – irradiação com LED; G4 (n=24) – irrigação com solução de curcumina (40µM) seguido da irradiação com LED. Os tratamentos locais foram realizados 7 dias após a indução da periodontite. O LED (emissor semiconductor de Nitridio de Índio e Gálio) utilizado no presente estudo para a realização da aPDT, possui comprimento de onda de 465 a 485nm, irradiância de 600mW/cm² e o tratamento usando a irradiação com LED foi realizada durante 60 segundos na face vestibular dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo. O tratamento com LED no G4 foi realizado após 60 segundos da irrigação com o fotossensibilizador curcumina. Foram coletadas amostras de biofilme subgengival utilizando cones de papel absorventes estéreis, os quais foram introduzidos no sulco gengival, em direção apical até que uma leve resistência fosse sentida, permanecendo no local por 30 segundos na região vestibular do primeiro molar inferior esquerdo no baseline, aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento. As amostras obtidas foram processadas para obtenção do DNA bacteriano e submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a identificação das seguintes espécies bacterianas: *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). Os resultados mostraram no baseline a presença de *Aa*. No G1 aos 15 dias, 20% das amostras foram positivas para *Aa* e para *Pg*, enquanto que no mesmo grupo aos 30 dias observou-se uma quantidade maior de bactérias para *Aa*, onde 60% das amostras foram positivas, enquanto que para *Pg* foram mantidos os mesmos 20% de marcação. O G2 foi o único grupo que não foram identificados *Aa* e *Pg* em nenhum dos períodos (7, 15, 30 dias). No G3 aos 15 dias, 20% das amostras

foram positivas para *Aa* e para *Pg* e no período de 7 e 30 dias não foi detectado *Aa* nem *Pg*. No G4 foi possível observar ausência das duas bactérias supracitadas no período de 7 e 15 dias após o tratamento, enquanto que no período de 30 dias houve 20% das amostras positivas tanto para *Aa* quanto para *Pg*. Dentro dos limites deste estudo pode-se concluir que a curcumina isolada ou em associação com LED, foi capaz de produzir uma redução de *Porphyromonas gingivalis* em áreas com periodontite experimentalmente induzida por ligadura em ratos.

Palavras-Chave: Periodontite; Ratos; Fotoquimioterapia; Curcumina; Análise microbiológica.

FERREIRA, R.P. Curcumin photodynamic effect in the treatment of induced periodontitis in rats: a microbiological analysis. In 2014. 39 f. Completion of course work - School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the viewpoint microbiological the influence of curcumin as a photosensitizing agent associated with irradiation *Light Emitting Diode* (LED), in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), for the treatment of experimentally induced periodontitis in rats. Ninety-six animals were subjected to induction of periodontitis installation via a cotton thread around the first molars, which was maintained for 7 days. Then the animals were randomly divided into 4 groups of 24 animals each, which received the following treatments, at 7, 15 and 30 days: G1 (n = 24) - represented by animals suffered no local treatment; G2 (n = 24) – irrigation with a solution of curcumin (40µM); G3 (n = 24) - irradiation with LED; G4 (n = 24) - irrigation with a solution of curcumin (40µM) followed by irradiation with LED. Local treatments were carried out 7 days after the induction of periodontitis. The LED (semiconductor Nitridio emitter of indium gallium) used in this study for the realization of aPDT, has a wavelength of 465 to 485nm, irradiance of 600 mW / cm² and the treatment using the LED irradiation was performed for 60 seconds at buccal face of the first lower left molars. Treatment with the LED G4 was performed after 60 seconds of irrigation with the photosensitizer curcumin. Subgingival biofilm samples were collected using sterile absorbent paper cones, which were introduced into the gingival sulcus in apical direction until a slight resistance was felt, remaining in place for 30 seconds in the vestibular region of the left mandibular first molar at baseline, the post-treatment 7 days 15 and 30. The samples were processed by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) researching the presence of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). Was not detected at baseline the presence of *Aa*. The results showed the presence at baseline of *Aa*. In G1 at 15 days, 20% of samples were positive for *Aa* and *Pg*, whereas the same group at day 30 there was a higher amount of bacteria *Aa*, where 60% of the samples were positive, while for *Pg* are kept the same 20% markup. G2 was the only group that does not *Aa* and *Pg* have been identified in any of the periods (7, 15, 30 days). G3 in 15 days 20% of the samples were positive for *Aa* and *Pg* and after 7 and 30 days was not detected *Aa* or *Pg*. G4 was observed in the absence of the aforementioned two bacteria after 7 and 15 days after treatment, whereas in the period of 30 days was 20% of positive samples for both *Pg* to as

Within the limits of this study it can be concluded that isolated or in association with LED, curcumin was able to produce a reduction of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis areas with experimentally induced in rats by ligation.

Key- Words: Periodontitis; Rats; Photochemotherapy; Curcumin; Microbiological analysis.

Lista de Figuras

- Figura 1** Técnica de indução da periodontite. (A) Posicionamento do animal na mesa cirúrgica; (B) Acesso ao primeiro molar inferior onde será induzida a periodontite; (C) Pinça modificada usada para adaptação do fio de algodão em torno do primeiro molar inferior esquerdo; (D) Adaptação do fio de algodão inicialmente pela distal do molar; (E) Adaptação do fio em torno do dente; (F) Fio de algodão adaptado. 19
- Figura 2** Realização dos tratamentos locais. (A) G2 - Irrigação com solução de Curcumina (40 μ M). (B) G3 - Irradiação com LED. (C) G4 - Irrigação com solução de Curcumina (40 μ M) seguido da irradiação com LED (Kon-lux; 465 a 485 nm). 20
- Figura 3** (A) Fotossensibilizador curcumina Sigma. (B) Pó da curcumina. (C) Preparo da solução da curcumina na concentração de 40 μ M. 21
- Figura 4** LED (Kon-lux, 600 mW/cm², Kondortech Equipamentos Odontológicos Ltda., São Carlos, SP, Brasil). 21
- Figura 5** (A) Coleta de amostras de biofilme subgingival na região vestibular do primeiro molar inferior de cada animal de todos os grupos experimentais, no baseline, aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento. (B) Amostras coletadas e armazenadas em microtubos tipo eppendorfs contendo 500 μ L de solução salina tamponada (PBS, pH 7.0) e congelados a 80°C negativos. 22
- Figura 6** Protocolo de Extração de DNA. A) Amostras no microtubo tipo eppendorf; B) Agitação das amostras em Vortex; C) Remoção do cone de papel com auxílio de uma pinça clínica; D) Remoção do sobrenadante (fase aquosa) correspondente aos ácidos nucléicos para outro microtubo; E) Centrifugação das amostras; F) Presença do DNA precipitado. 24
- Figura 7** Reação de PCR. A) Amostras de DNA no aparelho termociclador; B) Programação da amplificação; C) Fonte de eletroforese; D) Cuba para corrida eletroforética horizontal; E) Bandas no gel observadas em um transiluminador de luz ultravioleta. 24
- Figura 8** Marcações positivas das bactérias *Aa* e *Pg* vistas por transiluminador ultravioleta. 25
- Figura 9** Porcentagem de sítios positivos de *Aa* e *Pg* em todos os grupos experimentais no baseline e no período de 15 dias. 27
- Figura 10** Porcentagem de sítios positivos de *Aa* e *Pg* em todos os grupos experimentais no baseline e no período de 30 dias. 27

Lista de Abreviaturas

Aa = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

aPDT = Terapia fotodinâmica antimicrobiana

CUR = Curcumina

LED = Light Emitting Diode

PBS = Solução salina, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e, em algumas formulações, cloreto de potássio e fosfato de potássio

PCR = Reação em cadeia da polimerase

Pg = *Porphyromonas gingivalis*

TBE = Solução tamponante de Tris-ácido bórico e EDTA

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivo	17
3. Material e método	18
3.1 Animais	18
3.2 Periodontite experimental induzida	18
3.3 Grupos experimentais	19
3.4 Preparação do composto fotossensível	20
3.5 aPDT (Terapia fotodinâmica antimicrobiana)	20
3.6 LED (Light-Emitting Diode)	21
3.7 Coleta do conteúdo do líquido crevicular	22
3.8 Processamento microbiológico	23
4 Resultados	26
5 Discussão	28
6 Conclusão	32
Referências	33
Anexos	39

1 Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória que resulta na destruição dos tecidos periodontais como consequência da resposta do hospedeiro ao biofilme microbiano contendo bactérias patogênicas (SCHENKEIN, 2006).

O estado da periodontite impacta marcadamente sobre a composição do biofilme. Com o amadurecimento gradual do biofilme dental ocorrem sucessões bacterianas que alteram a ecologia do biofilme relacionado à saúde periodontal, primariamente constituído por bactérias gram-positivas aeróbias, para um biofilme mais complexo composto de bactérias gram-negativas anaeróbias (LÖE *et al.*, 1965; SOCKRANSKY *et al.*, 1998). É geralmente aceito que um pequeno grupo de anaeróbios predominantemente gram-negativos ou bactérias microaerófilas está associado com a iniciação e progressão da periodontite (EICK *et al.*, 2013). Organismos fortemente associados com formas crônicas e agressivas da periodontite incluem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (EICK *et al.*, 2013). *Porphyromonas gingivalis* (Pg) é um anaeróbio assacarolítico, com elevado nível de atividade proteolítica, o qual é considerado um dos mais importantes fatores de virulência. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) sintetiza muitas toxinas, como leucotoxina e citotoxina (EICK *et al.*, 2013). Tem-se observado que *Fusobacterium nucleatum* se coagrega com várias espécies de bactérias e pode funcionar como uma ponte entre a primeira e a última espécies para colonizar o biofilme. Desta forma, estudos anteriores relataram que a colonização por *Fusobacterium spp.* é um pré-requisito para o surgimento de conhecidos patógenos periodontais, como *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (DUARTE *et al.*, 2010).

O controle microbiológico do biofilme é, portanto, o foco da terapia periodontal no qual a cura da doença está intimamente relacionada. Clinicamente, há evidências de que a Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) com instrumentos manuais é a terapia mais efetiva no tratamento da periodontite (AINAMO *et al.*, 1992; CATON *et al.*, 2001). Porém, a efetividade deste procedimento é limitada em determinadas condições clínicas como em áreas de bi ou trifurcações, depressões radiculares ou até mesmo por condições relativas à dimensão da ponta ativa dos instrumentos periodontais que mostram-se incapazes de atingir a plenitude de efetividade nestas áreas (MATIA *et al.*, 1986, ADRIAENS *et al.*, 1988).

Estudos recentes têm apresentado resultados satisfatórios com a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na periodontite experimental induzida em animais (KOMERIK *et al.*, 2003; SIGUSH *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.* 2009; LUAN *et al.* 2009; GARCIA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2013). Esta terapia utiliza a luz visível com comprimento de onda adequado para ativar o fotossensibilizador (corante) que, em seguida, medeia um efeito terapêutico através de uma reação fotoquímica. Na aPDT, a absorção de luz muitas vezes desencadeia a decomposição do fotossensibilizador e gera radicais livres altamente reativos, que afetam tanto as células diretamente, ou reagem com o oxigênio para criar espécies reativas de oxigênio, tais como os radicais livres e de oxigênio singleto, os quais exercem um efeito bactericida que não são tóxicos para as células hospedeiras, mas sim para os microrganismos e os quais posteriormente irão alterar a função das células (OCHSNER 1997; OCHSNER *et al.*, 1997; MAISCH *et al.*, 2007; GIORGIO *et al.*, 2012). Uma vantagem significativa desta terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre terapias antimicrobianas convencionais é que as bactérias não são susceptíveis de desenvolver resistência a espécies reativas de oxigênio (GIORGIO *et al.*, 2012, PASCHOAL *et al.*, 2013).

Os efeitos antimicrobianos da aPDT têm sido estudados utilizando diferentes agentes fotossensibilizadores como o verde de malaquita, fitalocianina disulfonada, porfirinas, fenotiazinas (azul de metileno e azul de toluidina), cianinas, acridinas, corantes fitoterápicos e as clorinas em diferentes concentrações (RAMS e SLOTS, 1996; KOMERICK *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2013). Observa-se ainda que os estudos apresentam resultados promissores do uso da aPDT na redução da viabilidade microbiana (PE *et al.*, 1993; KOMERICK *et al.*, 2002) e principalmente na periodontite experimentalmente induzida onde pode ser observado a ação da aPDT na redução do processo inflamatório (SIGUSH *et al.*, 2005; QIN *et al.* 2008), na redução da perda óssea alveolar (KOMERICK *et al.*, 2003; de ALMEIDA *et al.*, 2007; de ALMEIDA *et al.*, 2008) e na redução de microrganismos periodontopatogênicos (KOMERICK *et al.* 2003; SIGUSHI *et al.* 2005).

Os resultados de vários estudos sugerem que fotossensibilizantes azuis ativados por luz podem ser usados para inativar bactérias como *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie dentária, ou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, um dos principais agentes etiológicos da periodontite agressiva (GIORGIO *et al.*, 2012). Uma pesquisa recente sugere que um fotossensibilizador à base de rutênio exposta à luz azul provoca um efeito de fototoxicidade em *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, ambos agentes etiológicos da periodontite (GIORGIO *et al.*, 2012).

Por outro lado, nos últimos cinco anos vários estudos clínicos em humanos tem avaliado o efeito da aPDT como uma terapia coadjuvante ao tratamento da periodontite crônica (ANDERSEN *et al.*, 2007; CHONDROS *et al.*, 2009; BRAUN *et al.*, 2008; CHRISTODOULIDES *et al.*, 2008; POLANSKY *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2010; GE *et al.*, 2011; THEODORO *et al.*, 2012). No entanto, alguns destes estudos não tem demonstrado vantagens clínicas com o uso da aPDT no tratamento da periodontite crônica (POLANSKY *et al.*, 2009; THEODORO *et al.*, 2012). Outros estudos mostraram que a aPDT foi capaz de reduzir apenas o sangramento a sondagem de sítios tratados (CHONDROS *et al.*, 2009; CHRISTODOULIDES *et al.*, 2008; GE *et al.*, 2011). Além disto, observa-se que os agentes fotossensibilizadores utilizados nestes estudos foram o azul de toluidina e o azul de metileno e a luz foi o de laser de baixa potência com comprimento de onda na faixa do visível (vermelho).

Por outro lado, a curcumina, que é o principal constituinte de açafrão em pó, extraída a partir de rizomas de *Curcuma Longa I*, uma planta utilizada na medicina tradicional indiana, apresenta um grande potencial para aplicação terapêutica, devido às suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica (MARTINS *et al.*, 2009; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014). Além dessas propriedades, a curcumina mostrou também ser anti-proliferativa e anti-cancerígena, em uma ampla variedade de linhas celulares e animais (EPSTEIN *et al.*, 2010; PASCHOAL *et al.*, 2013). Alguns estudos também propuseram que estes efeitos podem, eventualmente, ser reforçados pela aplicação de luz (BRUZELL *et al.*, 2005; DUJIC *et al.*, 2009, PASCHOAL *et al.*, 2013). A curcumina absorve a luz na gama de comprimento de onda azul (300-500 nm) do espectro visível. A luz azul tem uma profundidade menor de penetração no tecido, em comparação com a luz vermelha, devido ao espalhamento e absorção por biomoléculas; por conseguinte, o uso da curcumina na aPDT está restrito ao uso tópico de feridas superficiais (por exemplo, da pele e da boca).

A aplicabilidade da curcumina com foco na descontaminação microbiana é uma abordagem recente. Em um estudo foram demonstrados os efeitos fototóxicos contra *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, quando utilizaram a curcumina associada com metilado-ciclodextrina a 0,01%. Esta combinação resultou em uma alta fototoxicidade nas espécies estudadas quando irradiado com luz azul (PASCHOAL *et al.*, 2013). Além dos efeitos terapêuticos citados anteriormente, pode ser somado o fato de que este produto tem uma grande vantagem econômica, quando considerado o seu baixo custo, simples manipulação e grande eficácia (ARAÚJO *et al.*, 2012), fato este que atraiu pesquisadores

interessados em explorar a sua utilização em diversas áreas, incluindo a fotoquímica e a fotobiologia (DOVIGO *et al.*, 2011).

Recentemente, alguns estudos tem avaliado o efeito da aPDT utilizando a curcumina como fotossensibilizador na redução de microrganismos bucais. Em um estudo de Araújo *et al.*, 2012, a terapia fotodinâmica antimicrobiana foi eficaz na redução de microrganismos salivares, porém nenhuma redução significativa foi encontrada para o grupo em que foi usada apenas a curcumina, provando a ausência de toxicidade da droga sem a utilização de luz. Em outro estudo, o uso de curcumina em associação com a luz foi capaz de promover um efeito antifúngico significativo contra formas planctônicas de leveduras. Quando foram utilizados 40 mM de curcumina, a atividade metabólica de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* em biofilmes foi reduzida em 85%, 85%, e 73%, respectivamente, com densidade de irradiação com luz de LED de 18 J/cm², sendo também observada a diminuição da biomassa do biofilme de todas as espécies avaliadas. Os resultados demonstraram que baixas concentrações de curcumina podem ser altamente eficazes para a inativação de isolados de *Candida*, quando associado com uma fonte de luz. (DOVIGO *et al.*, 2011).

Outros estudos avaliaram o efeito da curcumina na periodontite. Em um estudo de Guimarães *et al.*, 2011, os animais tratados com curcumina apresentaram uma redução acentuada do infiltrado inflamatório e aumento do teor de colágeno e número de células fibroblásticas, porém a curcumina não preveniu a reabsorção de osso alveolar. Entretanto, o seu potente efeito anti-inflamatório sugere que este fotossensibilizador pode ter um potencial terapêutico no tratamento da periodontite.

. Além disto, estudo recente avaliou o efeito do LED no tratamento da periodontite experimental. Neste estudo foi observada uma redução da inflamação, acelerada deposição e realinhamento de colágeno após a irradiação com luz de LED com densidade de 10 e 15 J/cm², havendo também uma redução temporária de perda de osso periodontal, bem como a aposição de feixes de osso. O diodo emissor de luz (660 nm), com uma densidade de energia de 10 J/cm², mostrou ser adequado como uma modalidade terapêutica adjunta para o tratamento da periodontite, reduzindo temporariamente a inflamação, facilitando o realinhamento de colágeno e a deposição óssea. (CHANG *et al.* 2013).

Diante destes fatos e da escassez de estudos que avaliaram o efeito da curcumina como fotossensibilizador na aPDT, associada ao LED (Light- Emitting Diode) como fonte de luz para o tratamento periodontal, propomos avaliar o efeito da associação da curcumina com um LED (465 a 485nm) na redução de microrganismos periodontopatogênicos na periodontite experimental em ratos.

2 Objetivo

Avaliar do ponto vista microbiológico a influência da curcumina como agente fotossensibilizador na aPDT, associada ao LED como fonte de luz, no tratamento da periodontite induzida em ratos.

3 Material e Método

3.1 Animais

Foram utilizados 96 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) com idade entre 3 e 4 meses, pesando entre 180 a 250g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-SP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP). Os animais foram mantidos em laboratório com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura ambiente entre 22 e 24° C. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida adequada e água *ad libitum*. O protocolo experimental do presente projeto foi submetido à análise do Comitê de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia - Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba e aprovado dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (**Protocolo nº00725-2012**) (**Anexo A**).

3.2 Periodontite experimental induzida

A anestesia geral foi obtida pela associação de ketamina (0,4 ml/Kg) e xilazina (0,2 ml/Kg) por injeção via intramuscular. O primeiro molar inferior do lado esquerdo de cada animal recebeu a indução da periodontite experimental através da colocação de um fio de algodão (Corrente Algodão nº.24; Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) que foi mantido em posição sub-gengival (NOCITI *et al.*, 2000) (Figura 1).

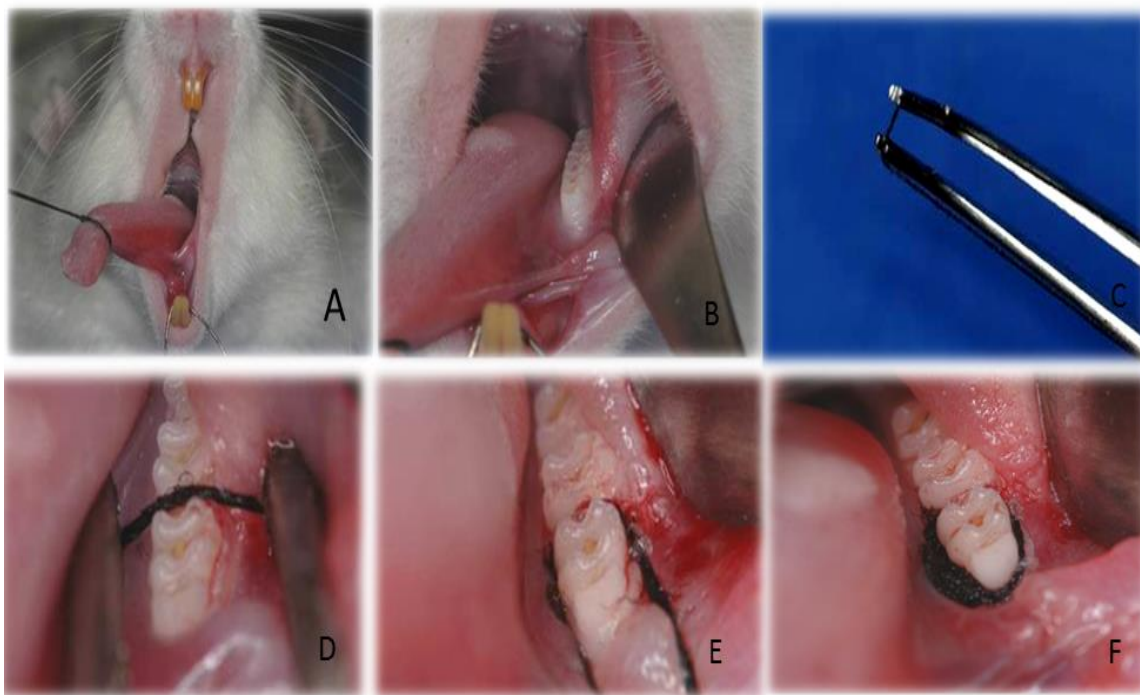


Figura 1. Técnica da indução da periodontite. (A) Posicionamento do animal na mesa cirúrgica; (B) Acesso ao primeiro molar inferior onde será induzida a periodontite; (C) Pinça modificada usada para adaptação do fio de algodão em torno do primeiro molar inferior esquerdo; (D) Adaptação do fio de algodão inicialmente pela distal do molar; (E) Adaptação do fio em torno do dente; (F) Fio de algodão adaptado. (Fonte: Laboratório de Cirurgia do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba).

3.3 *Grupos experimentais*

Após 7 dias de evolução da periodontite experimental induzida, a ligadura foi removida em todos os animais. A seguir os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos de 24 animais cada um, utilizando um sistema de tabela computacional, sendo que o primeiro animal foi do primeiro grupo, o segundo do segundo grupo e assim até completar todos os grupos, para melhor padronização (FERNANDES *et al.*, 2009). Os animais dos grupos receberam os seguintes tratamentos: **G1** – os animais não receberam nenhum tratamento local; **G2** – irrigação com solução de curcumina (40 μ M); **G3** – irradiação com LED; **G4** - irrigação com solução de curcumina (40 μ M) seguido da irradiação com LED. As soluções de curcumina foram depositadas no interior da bolsa periodontal utilizando uma seringa e agulha para injeção de insulina (Figura 2).

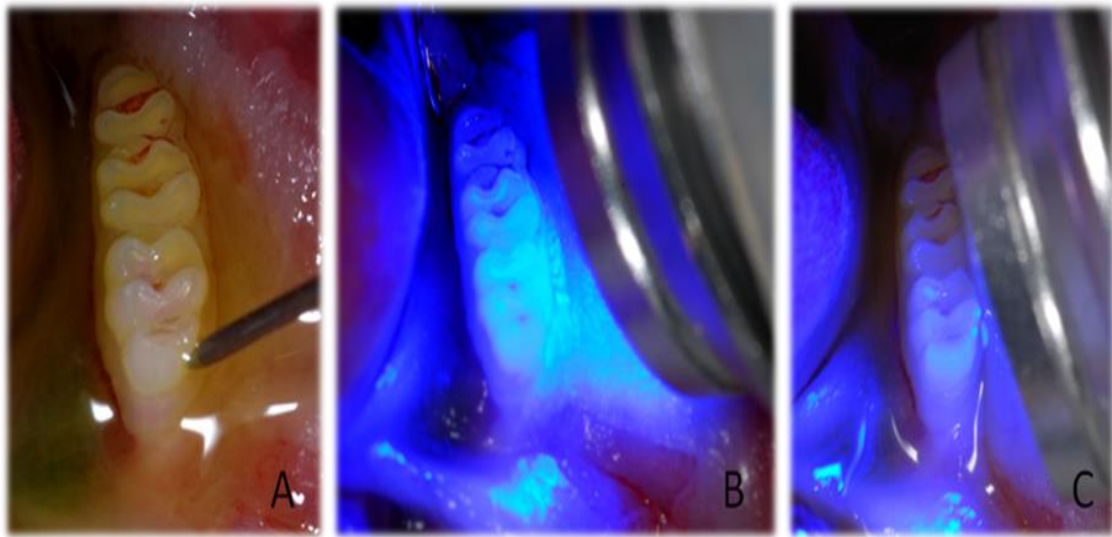


Figura 2. Realização dos tratamentos locais. (A) G2 - Irrigação com solução de curcumina ($40\mu\text{M}$). (B) G3 - Irradiação com LED. (C) G4 - Irrigação com solução de curcumina ($40\mu\text{M}$) seguido da irradiação com LED (Kon-lux; 465 a 485 nm). (Fonte: Laboratório de Cirurgia do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba).

3.4 *Preparação do composto fotossensível*

O fotossensibilizador CUR natural (Fluka Co.) foi obtido a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Uma solução stock de CUR ($600\ \mu\text{M}$) foi preparada em solução salina obtendo a concentração testada de $40\mu\text{M}$ (DOVIGO *et al.* 2011a) e mantida em frasco âmbar.

3.5 *aPDT (Terapia fotodinâmica antimicrobiana)*

A aPDT foi realizada baseada em trabalhos anteriores de pesquisadores do GEPLO e teve o seguinte protocolo: por intermédio de seringa de insulina as bolsas periodontais dos dentes, após a remoção da ligadura, foram irrigadas com 1 ml de solução de curcumina (Figura 3) na concentração de $40\mu\text{M}$ (DOVIGO *et al.*, 2011). Decorrido 1 minuto após permanência da droga no tecido foi realizada a irradiação com LED.



Figura 3. (A) Fotossensibilizador curcumina Sigma. (B) Pó da curcumina. (C) Preparo da solução da curcumina na concentração de $40\mu\text{M}$. (Fonte: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)).

3.6 LED (*Light- Emitting Diode*)

O LED (Figura 4) que foi utilizado no presente estudo para realização da aPDT é um emissor semiconductor de Nitridio de Índio e Gálio (InGaN) com comprimento de onda de 465 a 485nm (Kon-lux, Kondortech Equip. Odontológicos Ltda., São Carlos, SP, Brasil). O LED foi utilizado nos animais dos grupos 3 e 4 com o seguinte protocolo: irradiância de 600 mW/cm^2 , potência de 0,3 W com área de saída do feixe de $0,5\text{ cm}^2$.



Figura 4. LED (Kon-lux, 600 mW/cm^2 , Kondortech Equipamentos Odontológicos Ltda., São Carlos, SP, Brasil). (Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba).

A irradiação com LED foi realizada perpendicularmente na face vestibular dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo, durante 60 segundos com fluência de 18 J/cm^2 , após 60 segundos da aplicação da solução de curcumina.

3.7 Coleta do conteúdo do líquido crevicular

Foram coletadas amostras de biofilme subgengival na região vestibular do primeiro molar inferior esquerdo de cada animal de todos os grupos experimentais e nos sítios tratados pela irrigação com curcumina, LED e aPDT, no baseline (imediatamente a remoção da ligadura), aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento.

Para esta coleta foram utilizados cones de papel absorventes estéreis (número 15), que foram introduzidos no sulco gengival, em direção apical até que uma leve resistência fosse sentida, permanecendo no local por 30 segundos (LOPES *et al.*, 2010; THEODORO *et al.*, 2012). Após sua remoção, os cones de papel absorventes foram colocados em microtubos tipo eppendorf, com capacidade de 1,5ml, contendo 500µL de solução tampão (PBS, pH 7.0; solução salina, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e, em algumas formulações, cloreto de potássio e fosfato de potássio). As amostras foram conservadas em freezer a -80°C para posterior análise microbiológica (LOPES *et al.*, 2010) (Figura 5).

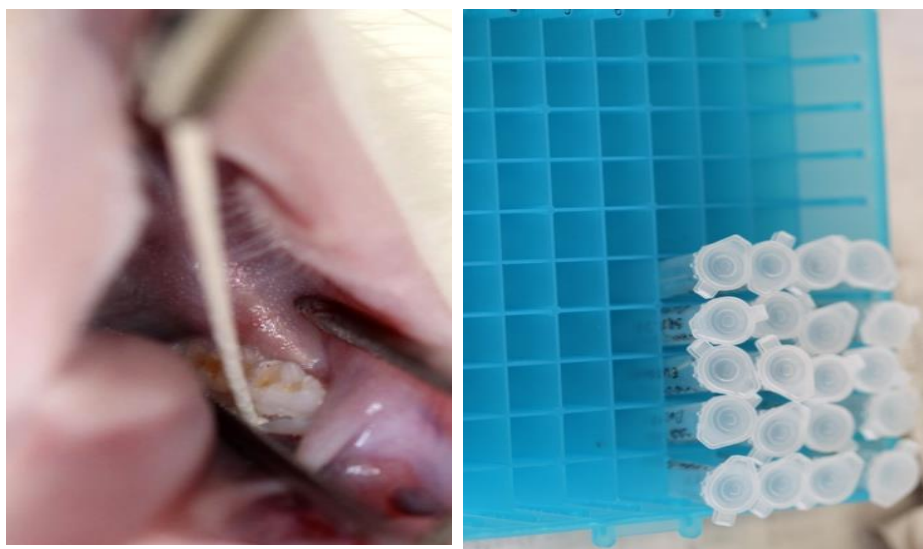


Figura 5. (A) Coleta de amostras de biofilme subgengival na região vestibular do primeiro molar inferior de cada animal de todos os grupos experimentais, no baseline, aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento. (B) Amostras coletadas e armazenadas em microtubos tipo eppendorfs contendo 500µL de solução salina tamponada (PBS, pH 7.0) e congelados a 80°C negativos. (Fonte: Laboratório de Cirurgia e de Microbiologia do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba).

3.8 *Processamento Microbiológico*

O processamento microbiológico foi realizado utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) descrita por SAIKI *et al.* (1985; 1988) pesquisando a presença de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*).

As amostras de biofilme do sulco gengival obtidas dos animais submetidos aos tratamentos propostos foram submetidas à extração do DNA bacteriano, utilizando um protocolo para extração do DNA adaptado de Doyle (1990), utilizando centrífuga refrigerada (MIKRO 200, Hettich Lab Technology, Germany) (Figura 6). As condições de ciclagem utilizando termociclador (Prime Thermal Cycler) para amplificação foram as seguintes para os primers específicos: *Aa* - Desnaturação Inicial de 95° C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos, 60° C por 1 minuto e 72° por 1 minuto; *Pg* – Desnaturação inicial de 95° C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos e 72° por 1 minuto.

Para confirmar a especificidade ou universalidade dos primers, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em uma cuba para corrida eletroforética horizontal (Major Science) conectada a uma fonte de eletroforese (Fonte Smart Rosa, Major Science, 50-60 Hz, 144 VA) a 96V por 40 minutos e submerso em solução tamponante TBE (Tris-ácido bórico e EDTA). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com SYBR® Safe (Invitrogen™ - corante não mutagênico sensível que fluoresce quando ligado ao DNA fita dupla e excitado por luz azul) durante 5 minutos e então as bandas no gel foram observadas imediatamente em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas a seguir utilizando um sistema de fotodocumentação digital (UVP, mod. GelDoc-It B 2310) (Figuras 7 e 8).

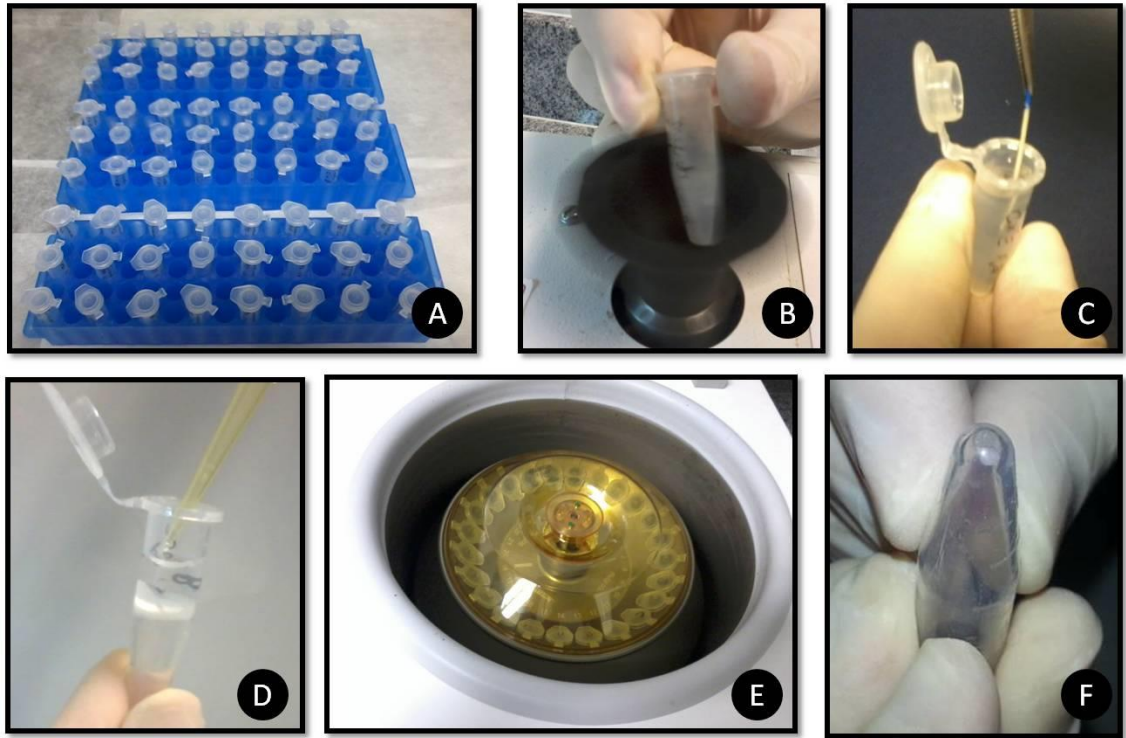


Figura 6. Protocolo de Extração de DNA. A) Amostras no microtubo tipo eppendorf; B) Agitação das amostras em Vortex; C) Remoção do cone de papel com auxílio de uma pinça clínica; D) Remoção do sobrenadante (fase aquosa) correspondente aos ácidos nucléicos para outro microtubo; E) Centrifugação das amostras; F) Presença do DNA precipitado. (Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba).

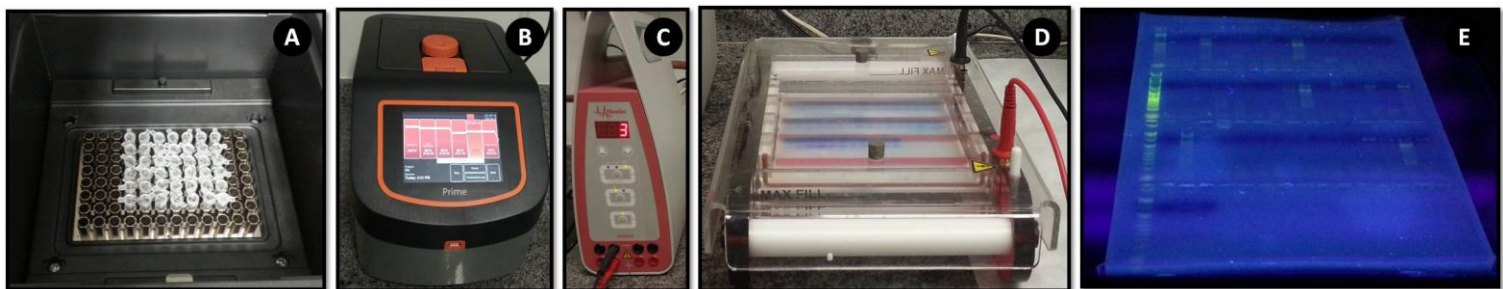


Figura 7. Reação de PCR. A) Amostras de DNA no aparelho termociclador; B) Programação da amplificação; C) Fonte de eletroforese; D) Cuba para corrida eletroforética horizontal; E) Bandas no gel observadas em um transiluminador de luz ultravioleta. (Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba).

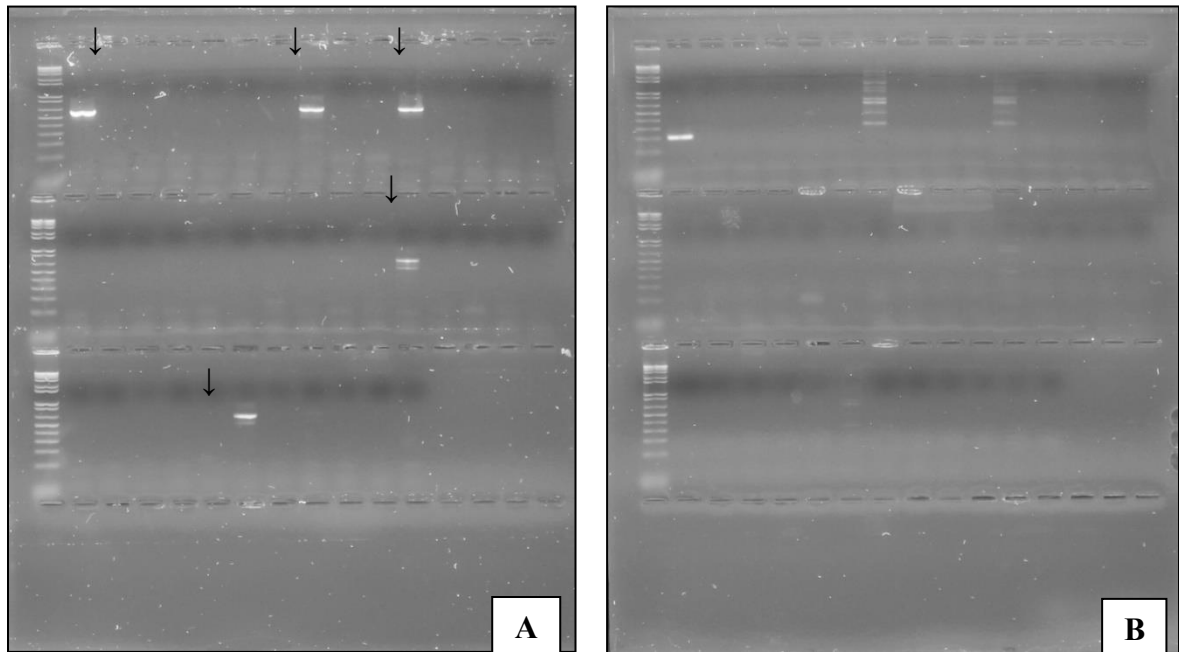


Figura 8. Marcações positivas para as bactérias *Aa* (A) e *Pg* (B) vistas através de transiluminador de luz ultravioleta. (Fonte: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba)

4 Resultados

Análise Microbiológica

Observando-se as distribuições dos dados obtidos para os sítios positivos para as bactérias *Aa* e *Pg*, não foi possível manter o planejamento estatístico inicial, uma vez que os dados não atentam para testes paramétricos ou não paramétricos. Sendo assim, foi adotada uma análise descritiva dos sítios positivos para as bactérias supracitadas em cada grupo e período, comparado ao baseline.

Os dados de porcentagem dos sítios positivos para ambas as bactérias no baseline e em cada período e grupos estão apresentados nos Gráficos 1 e 2. Quando foram avaliadas no baseline, o qual foi o período em que as coletas foram realizadas imediatamente após a remoção da ligadura, foram detectados 40% das amostras para *Pg*, enquanto que não houve detecção para *Aa*.

No grupo controle (G1), aos 7 dias após a remoção da ligadura, a qual foi a responsável por induzir a periodontite nos grupos, *Aa* e *Pg* não foram detectados. Aos 15 dias, 20% das amostras foram positivas para *Aa* e *Pg*, enquanto que no mesmo grupo aos 30 dias observou-se aumento na detecção de *Aa*, onde 60% das amostras foram marcadas, enquanto que para *Pg* foi mantido os mesmos 20% de detecção.

O G2 foi o único grupo que não apresentou resultado positivo para *Aa* e *Pg* em nenhum dos períodos (7, 15, 30 dias).

No G3 observou-se que aos 7 dias após o tratamento não houve detecção para nenhuma das bactérias, já no período de 15 dias 20% das amostras foram positivas para *Aa* e para *Pg*. No período de 30 dias *Aa* e *Pg* não foram detectadas.

No G4 foi possível observar ausência das duas bactérias supracitadas no período de 7 e 15 dias após o tratamento, enquanto que no período de 30 dias houve 20% de presença de *Aa* e *Pg* nas amostras.

É possível também observar que tanto para o G1 quanto para o G3, no período de 15 dias, a porcentagem de bactérias se manteve a mesma, embora o G3 tenha sido submetido ao tratamento com LED. Importante também destacar que a detecção de 20% tanto para *Aa* quanto para *Pg* anteriormente obtida e citada, também foi encontrada no G4 no período de 30 dias, o qual foi submetido ao tratamento com irrigação com curcumina seguido por irradiação com LED.

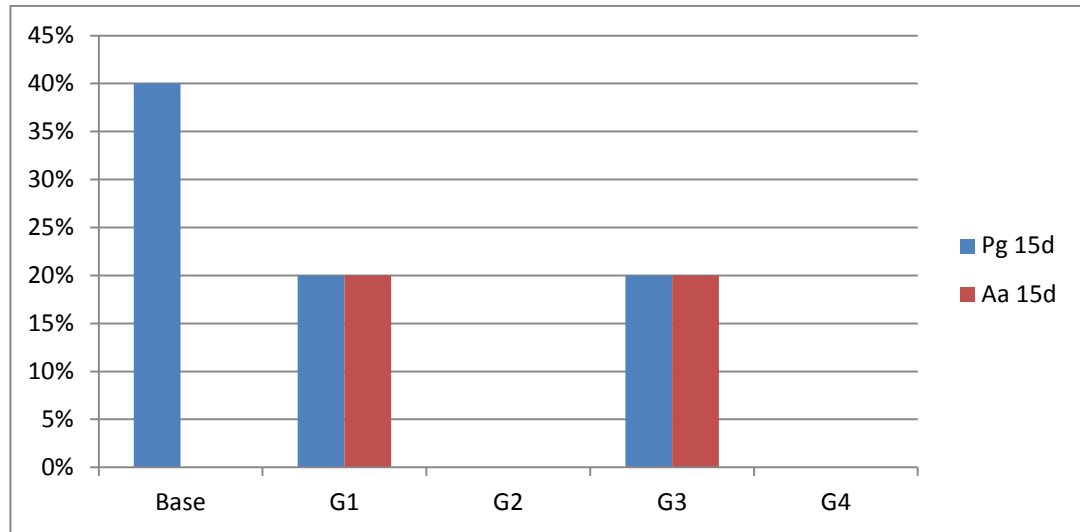


Gráfico 1. Porcentagem de sítios positivos encontrados para as bactérias *Aa* e *Pg* no baseline, e em cada grupo experimental no período de 15 dias.

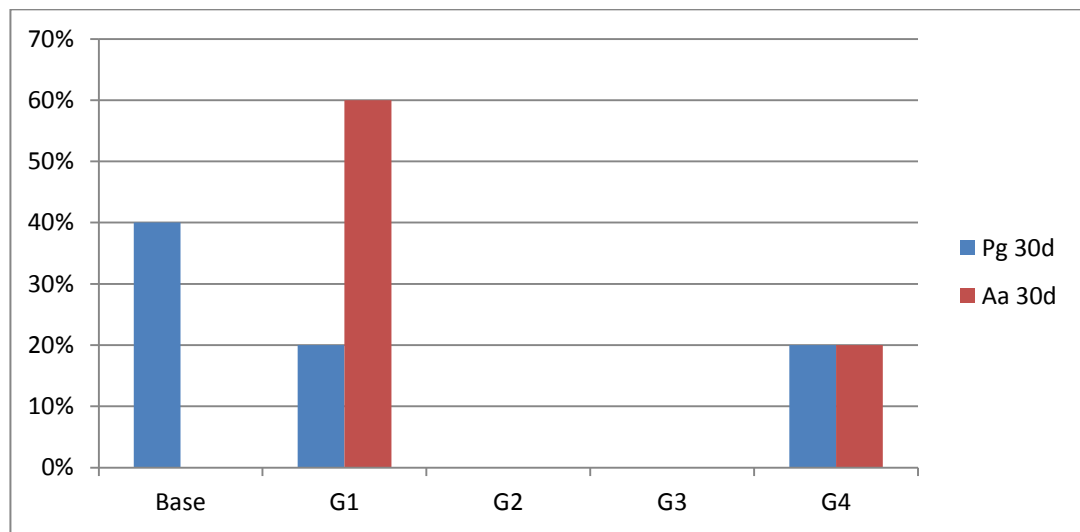


Gráfico 2. Porcentagem de sítios positivos no baseline, e em cada grupo experimental no período de 30 dias para as bactérias *Aa* e *Pg*.

5 Discussão

No presente estudo realizou-se a comparação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana como monoterapia no tratamento da periodontite induzida por ligadura em ratos, utilizando a curcumina como fotossensibilizador e o LED (468-485nm), como fonte de luz sobre a redução das bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A opção em analisar a curcumina como fotossensibilizador é justificada pelo seu efeito anti-inflamatório nos tecidos periodontais (GUIMARÃES *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2013), devido a sua capacidade de ser fotoativada na presença de comprimentos de ondas baixos (ARAÚJO *et al.*, 2005) e ter ação antimicrobiana uma vez fotoativada (MARTINS *et al.*, 2009; DOVIGO *et al.*, 2011). No entanto não há estudos suficientes na literatura que associaram a curcumina com o LED na aPDT, para o tratamento da periodontite induzida. Além destes fatos, os dados sobre os potenciais efeitos dessa nova abordagem em várias espécies microbianas associadas com periodontite e peri-implantite são escassos (EICK *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo demonstraram que no baseline não foi detectada a presença de *Aa*, o que pode indicar que na microbiota bucal dos ratos no momento da coleta, ou seja, 7 dias após a indução da periodontite, não havia a presença de *Aa*, tendo o mesmo aparecido somente após certo período de tempo. Com relação à presença de bactérias periodontopatogênicas em ratos, um estudo que procurou evidenciar o perfil microbiano da periodontite induzida por ligadura em ratos, observou-se que 25 espécies de bactérias foram detectadas após 42 dias de instalação da ligadura sendo que espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces* foram encontradas em altas contagens, seguidas por *Fusobacterium*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (DUARTE *et al.*, 2010). Em outro estudo em ratos foi demonstrado a presença de *Aa* e *Pg* na ligadura coletada 7 dias após a instalação, no entanto houve uma redução significativa apenas de *Aa* após tratamento com aPDT, mediada por fenotiazínicos e laser na faixa do visível-vermelho, tanto em alvéolos contaminados e não contaminados por periodontite (THEODORO *et al.*, 2013).

No período de 15 dias, tanto para o G1 quanto para o G3 foi detectado *Aa* e *Pg* nas mesmas proporções (20% para cada uma delas), o que pode indicar que houve uma possível perda da efetividade do tratamento realizado no G3 ao longo das semanas, o qual foi feito apenas com a irradiação por LED. Em outro estudo, foi verificado que a luz azul atuando isoladamente não alterou a viabilidade de *Enterococcus faecalis*, uma das bactérias

responsável pelo insucesso do tratamento endodôntico. Para culturas planctônicas, a luz azul ativando eosina Y, rosa bengala ou curcumina de forma significativa ($p < 0,05$) reduziu a viabilidade de *Enterococcus faecalis* em comparação com a exposição aos fotossensibilizantes não irradiados (PILEGGI *et al.*, 2012).

O grupo G2, o qual o tratamento consistiu em irrigação com curcumina somente, foi o único que não foi observado presença de *Aa* e *Pg* em nenhum dos períodos. Em 2011, Guimarães *et al.* obtiveram resultados nos quais observaram o potencial anti-inflamatório da curcumina em ratos, sugerindo o potencial terapêutico da mesma no tratamento da periodontite.

Em contrapartida, no G4, o qual foi submetido ao tratamento com irrigação de curcumina seguido por irradiação com LED, no mesmo período (15 dias) não foi verificada a presença de *Aa* e *Pg*. Neste mesmo grupo, no período de 30 dias, ambas as bactérias foram detectadas, demonstrando uma recolonização. Em outro estudo (ARAÚJO *et al.*, 2011) a redução estatisticamente significativa na população bacteriana foi observada apenas quando a curcumina foi utilizada em combinação com a luz azul. Os autores observaram que em culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* a associação da curcumina seguida de iluminação com luz azul reduzia o número de bactérias do que os de qualquer outro grupo. As reduções de 54% e 91% foram obtidas para 0,75 e 1,5 g / L de curcumina, respectivamente. Além disso, o efeito fotodinâmico foi dependente da dose de concentração da curcumina e nos ensaios de toxicidade escuras os autores demonstraram que, para as concentrações testadas, a curcumina não apresenta toxicidade para todas as culturas planctônicas. Observou-se também que sem a curcumina, a irradiação de luz isolada não afeta a viabilidade dos microrganismos. Tal fato também foi demonstrado no presente estudo em que a irradiação com o LED não proporcionou redução das bactérias testadas aos 15 dias.

Embora a desinfecção fotoativada baseada em luz vermelha tenha sido mais investigada, a luz azul combinada com fotossensibilizantes apropriados também foi mostrada para inativar *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis*. Isolada, a luz azul não teve efeito significativo ($P > 0,05$) em ambas as bactérias ou células H1 (células tronco indiferenciadas). Além disso, a curcumina e a eosina tiveram pouco ou nenhum efeito sobre a viabilidade das células H1 e bactérias, na ausência de ativação de luz (BULIT *et al.*, 2014). Por outro lado, a curcumina na concentração de 0,5-10 $\mu\text{mol/L}$ não teve nenhum efeito sem ser ativada pela luz, mas a viabilidade bacteriana suprimiu significativamente quando ativada pela luz (BULIT *et al.*, 2014; EICK *et al.*, 2013).

Os resultados de vários estudos sugerem que fotossensibilizantes ativados por luz azul podem ser usados para inativar bactérias como *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie dentária, ou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, um dos principais agentes etiológicos da periodontite agressiva. Um relato recente sugere que um fotossensibilizador à base de rutênio exposta à luz azul provoca um efeito de fototoxicidade em *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, ambos agentes etiológicos da periodontite (PILEGGI *et al.*, 2012).

Diferentemente de antibióticos que agem em células-alvo microbianas específicas, o mecanismo multifuncional da ação antimicrobiana da aPDT ocorre a partir da síntese de tipos hiper-reativos de oxigênio, permitindo que sua ação possa causar danos a várias estruturas celulares e reduzindo, assim, a chance de desenvolvimento de resistência bacteriana. Uma vantagem significativa de quimioterapia antibacteriana fotodinâmica sobre terapias antimicrobianas convencionais é que as bactérias não são susceptíveis de desenvolver resistência a espécies reativas de oxigênio (PILEGGI *et al.*, 2012).

Em um estudo de Paschoal *et al.* 2013, sobre o potencial fotodinâmico da curcumina e do LED azul, foi demonstrado que a curcumina em concentração de 8000 μM conseguiu uma redução bacteriana em um log (%) de 5,80 no grupo C + L- (curcumina a 3 concentrações diferentes: 2000; 4000 e 8000 μM e três condições experimentais). Pode-se supor que quanto mais concentrado o fotossensibilizante estiver, mais ele se difunde através da membrana, fazendo com que haja um maior grau de redução bacteriana, quando comparados com as demais concentrações de curcumina neste estudo citado.

A curcumina apresenta propriedades antimicrobianas significativas *in vitro* contra um número de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Do ponto de vista de bactérias e sua interação com fotossensibilizante, a eficácia do aPDT está principalmente relacionada a três aspectos principais: a capacidade do fotossensibilizante de interagir com a membrana bacteriana; sua capacidade de penetração e ação dentro da célula e a formação de espécies reativas de oxigênio em torno da célula bacteriana por iluminação do fotossensibilizante. Os resultados de estudos recentes têm indicado que a curcumina liga-se preferencialmente a membrana lipídica de algumas proteínas de células. Por outro lado, pode-se supor que o caminho provável de ação curcumina está além da intercalação no DNA bacteriano mais a atuação da membrana; interrupção da síntese de cadeia de ácido nucléico do organismo, com mutação genética resultante. As razões possíveis são que este fotossensibilizante seja relativamente insolúvel em água e apresente um peso molecular elevado (368,38 g mol⁻¹), não permitindo que se difunda mais facilmente também (PASCHOAL *et al.* 2013).

Outro ponto que deve ser enfatizado é a correlação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua interação com bactérias e, conseqüentemente, a eficácia do regime de tratamento. No estudo de Paschoal *et al.* 2013, a curcumina manifestou toxicidade para a bactéria, mesmo sem radiação. No entanto, a irradiação aumentou a atividade antimicrobiana da curcumina, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio formadas após irradiação são responsáveis por este aumento. Assim, um efeito antimicrobiano pode ser alcançado por outros fatores relacionados com a farmacodinâmica do fotossensibilizante, tal como a penetração celular, localização de influxo e de efluxo de parâmetros; a estabilidade intracelular e da atividade do fotossensibilizante e suficiente alvo do mesmo em direção ao patógeno.

Com relação à concentração da curcumina, um estudo demonstrou o efetivo controle de espécies de *Candida in vitro*, através da aPDT utilizando a mesma concentração de curcumina como fotossensibilizador do presente estudo, ativado por LED emitindo na faixa de 440-460nm (DOVIGO *et al.*, 2011). Com relação à fluência os autores demonstraram que 5 J/cm² e 18 J/cm² foram efetivas no controle de espécies de *Candida*. No presente estudo, o tempo de contato da solução de curcumina com o biofilme foi de um minuto prévio à irradiação, estando em concordância com o tempo padrão utilizado em outros protocolos de aPDT (ALMEIDA *et al.*, 2008b; FERNANDES *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2013). Porém, esse tempo de pré-irradiação de um minuto pode ser insuficiente para que a mesma penetre mais profundamente no biofilme e exerça ação em microrganismos mais complexos, podendo assim alterar o desenvolvimento da periodontite. Sendo assim são necessários estudos que avaliem o tempo de pré-irradiação necessário para que se obtenha ação inibitória mínima da curcumina no biofilme e que o protocolo seja viável para aplicação no tratamento da periodontite.

Em um estudo avaliando a eficácia antibacteriana, antifúngica e antiviral da curcumina, a nanocurcumina demonstrou atividade mais notável contra bactérias gram-positivas ao invés de bactérias gram-negativas, sendo as bactérias gram-positivas mais suscetíveis à ação da curcumina (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014). Ambas as bactérias analisadas neste estudo são bactérias gram-negativas, as quais são menos susceptíveis à ação antimicrobiana com a terapia aPDT (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014).

Diante do exposto neste estudo e das limitações da análise microbiológica efetuada, sugerimos que outros estudos *in vivo* devam ser realizados para avaliar a eficiência da aPDT, mediada por curcumina e LED no tratamento da periodontite, variando protocolos de irradiação e métodos de análises.

6 Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo pode-se concluir:

- A irrigação com curcumina utilizada isoladamente ou em associação com o LED como monoterapia é eficiente na redução de *Porphyromonas gingivalis* em áreas com periodontite experimentalmente induzida por ligadura em ratos.
- Além disto, a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* não foi verificada nos sítios com periodontite em ratos, imediatamente à remoção da ligadura.

Referências

- ADRIAENS PA; EDWARDS CA; DE BOEVER JA; LOESCHE WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol*, v. 59, p. 493-503, 1988.
- AINAMO J; LIE T; ELLINGSEN BH; HANSEN BF; JOHANSSON LA, KARRING T; KISCH J; PAUNIO K; STOLTZE K. Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.*, v. 19, n. 2, p. 723-729; 1992.
- ALMEIDA JM; THEODORO LH; BOSCO AF; NAGATA MJH; OSHIWA M; GARCIA VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*, v. 78, n. 3, p. 566-575, 2007a.
- ALMEIDA JM; THEODORO LH; BOSCO AF; NAGATA MJH; OSHIWA M; GARCIA VG. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *J Periodontol*, v. 79, p. 1081-1088, 2008a.
- ALMEIDA JM; THEODORO LH; BOSCO AF; NAGATA MJH; BONFANTE S; GARCIA VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*, v. 79, p. 2156-2165, 2008b.
- ANDERSEN R; LOEBEL N; HAMMOND D; WILSON M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent*, v. 18, p. 34-38, 2007.
- ARAÚJO NC; FONTANA CR; BAGNATO VS; GERBI MEM. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* v. 29, n. 2; p. 629-635, 2014.
- ARAÚJO NC; FONTANA CR; GERBI ME; BAGNATO VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg.*, v. 30, n. 2, p. 96-101, 2012.
- ARAÚJO NC; FONTANA CR; BAGNATO VS; GERBI MEM. Photodynamic Effects of Curcumin Against Cariogenic Pathogens. *Photomedicine and Laser Surgery Journal*, v. 30, n. 7, p. 393-399, 2011.
- ASHIMOTO A; CHEN C; BAKKER I; SLOTS J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.*, v. 11, n. 4, p. 266-273, 1996.
- 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*, v. 35, p. 877-884, 2008.

BRUZELL EM; MORISBAK E; TØNNESEN HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem. Photobiol Sci*, v. 4, p. 523–530, 2005.

BULIT F; GRAD I; MANOIL D; SIMON S; WATAHA JC; FILIERI A; FEKI A; SCHRENZEL J; LANGE N; BOUILAGUET S. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of 3 Photosensitizers Activated with Blue Light. *JOE*, v. 40, n. 3, p. 427-431, 2014.

CATON JG; CIANCIO SG; BLIEDEN TM. Subantimicrobial dose doxycycline as na adjunct to scaling and root planning: post-treatment effects. *J. Clin Periodontol.*, v. 28, n. 8, p. 782-789, 2001.

CHANG PC; CHIEN L; YE Y; KAO MJ. Irradiation by light-emitting diode light as an adjunct to facilitate healing of experimental periodontitis in vivo. *J Periodont Res.*, v. 48, n. 2, p. 135-143 2013.

CHONDROS P; NIKOLIDAKIS D; CHRISTODOULIDES N; ROSSLER R; GUTKNECHT N; SCULEAN A. Photodynamyc teraphy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*, v.24, p. 681-688, 2009.

CHRISTODOULIDES N; NIKOLIDAKIS D; CHONDROS P; BECKER J; SCHWARZ F; RÖSSLER R; SCULEAN A. Photodynamic therapy as an adjunct to nonsurgical periodontal treatment: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*, v. 79, p. 1638-1644, 2008.

DOVIGO LN; PAVARINA AC; CARMELLO JC, MACHADO AL; BRUNETTI IL; BAGNATO VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.*, v. 43, n. 9, p. 927-934, 2011.

DOYLE JJT; DOYLE JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: p. 13-18, 1990.

DUARTE PM; TEZOLIN KR; FIGUEIREDO LC; FERES M; BASTOS MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Archives of oral biology*, v. 55, n. 2, p 142–147, 2010.

DUJIC J; KIPPENBERGER S; RAMIREZ-BOSCA A; DIAZ-ALPERI J; BEREITER-HAHN J; KAUFMANN R; BERND A; HOFMANN M. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int. J. Cancer*, v. 124, n. 6, p. 1422– 1428, 2009.

EICK S; MARKAUSKAITE G; NIETZSCHE S; LAUGISH O; PROFESSOR GES; PROFESSOR AS. Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on

bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 10, n. 2, p. 156—167, 2013.

EPSTEIN J; DOCENA G; MACDONALD TT; SANDERSON IR. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. *Br J Nutr*, v. 103, n.6, p. 824-832, 2010.

FERNANDES LA; ALMEIDA JM; THEODORO LH; BOSCO AF; NAGATA MJH; MARTINS TM; OKAMOTO T; GARCIA VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*, v. 36, n. 3, p. 219-228, 2009.

GARCIA VG; LONGO M; GUALBERTO-JÚNIOR EC; BOSCO AF; NAGATA MJH; ERVOLINO E; THEODORO LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, v. 49, n. 5, p. 584-94, 2014.

GARCIA VG; GUALBERTO-JÚNIOR EC; FERNANDES LA; BOSCO AF; NAGATA MJH; CASATTI CA; ERVOLINO E; THEODORO LH. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*, v. 84, n. 4, p. 556-565, 2013.

GARCIA VG; GUALBERTO JÚNIOR EC; FERNANDES LA; BOSCO AF; NAGATA MHJ; CASATTI CA; ERVOLINO E; THEODORO LH. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol.*, v. 84, n. 4, p. 556-565, 2013.

GARCIA VG; LONGO M; FERNANDES LA; GUALBERTO JUNIOR EC; SANTINONI CS; BOSCO AF; NAGATA MJH; THEODORO LH. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.*, v. 28, n. 1, p. 143-150, 2013.

GARCIA VG; FERNANDES LA; MACARINI VC; ALMEIDA JM; MARTINS TM; BOSCO AF; NAGATA MJH; CIRELLI JA; THEODORO LH. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol*. Dec; v. 38 n. 12 p. 1106-14, 2011.

GE L; SHU R; LI Y; LI C; LUO L; SONG Z; XIE Y; LIU D. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg*, v. 29, n.1, p. 33-37, 2011.

- GUIMARÃES MR; LEITE FR; SPOLIDORIO LC; KIRKWOOD KL; ROSSA C Jr. Curcumin abrogates LPS-induced pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK. *Arch Oral Biol.*, v. 58, n. 10, p. 1309-1317, 2013.
- GUIMARÃES MR; COIMBRA LS; DE AQUINO SG; SPOLIDORIO LC; KIRKWOOD KL; ROSSA C. Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodont Res*, v. 46, n. 2, p. 269–279, 2011.
- KÖMERIK N; NAKANISHI H; MACROBERT AJ; HENDERSON B; SPEIGHT P; WILSON M. In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n.3, p. 932-940, 2003.
- KOMERIK N; CURNOW A; MACROBERT AJ; HOPPER C; SPEIGHT PM; WILSON M. Fluorescence biodistribution and photosensitizing activity of toluidina blue O on rat buccal mucosa. *Laser Med Sci.*, v. 17, n. 2, p. 86-92, 2002.
- LÖE H; THEILADE E; JENSEN SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. May-Jun; v. 36, p. 177-187, 1965.
- LOPES BM; THEODORO LH; MELO RF; THOMPSON GM; MARCANTONIO RA. Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planing. *J Periodontol*; v. 81, n.5, p. 682-691, 2010.
- LUAN XL; QIN YL; BI LJ; HU CY; ZHANG ZG; LIN J; ZHOU CN. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci.*, v. 24, n. 2, p. 162-166, 2009.
- MAISCH T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.
- MARTINS CV; DA SILVA DL; NERES AT; MAGALHÃES TF; WATANABE G A; MODOLO LV; SABINO AA; DE FÁTIMA A; DE RESENDE MA. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother*, v. 63, n. 2, p. 337–339, 2009.
- MATIA JI; BISSADA NF; MAYBURY JE; RICCHETTI P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v. 6, n. 6, p. 24-35, 1986.

- MOGHADAMTOUSI SZ; KADIR HA; HASSANDARVISH P; TAJIK H; ABUBAKAR S; ZANDI K. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International*, v. 2014, Article ID 186864, 12 pages, 29, 2014.
- NOCITI FH JR; NOGUEIRA-FILHO GR; PRIMO MT; MACHADO MA; TRAMONTINA VA; BARROS SP; SALLUM EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol*. 2000 Sep; v. 71, n. 9, p. 1460-1464, 2000.
- OCHSNER MJ. *Photochem. Photobiol.*, B39, 1. 1997.
- PASCHOAL MA; TONON CC; SPOLIDORIO DMP; BAGNATO VS; GIUST JSM; SANTOS-PINTO L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Journal*, v. 10, n. 3, p. 313—319, 2013.
- PE MB; SANO K; INOKUCHI T. Effects of photodynamic therapy in the normal mouse tongue. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 51, n. 10, p. 1129-1134, 1993.
- PILEGGI G; WATAHAB JC; GIRARDC M; GRADA I; SCHRENZELC J; LANGED N; BOULLAGUET S. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 10, n. 2, p. 134—140, 2013.
- PINHEIRO SL; DONEGÁ JM; SEABRA LM; ADABO MD; LOPES T; DO CARMO TH; RIBEIRO MC; BERTOLINI PF. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci*, v. 25, n. 1, p. 87-91, 2010.
- POLANSKY R; HAAS M; HESCHL A; WIMMER G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 36, n.7, p. 575-580, 2009.
- QIN YL; LUAN XL; BI LJ; SHENG YQ; ZHOU CN; ZHANG ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J. Periodont Res.*, v. 43, n. 2, p. 162–167, 2008.
- RAMS TE; SLOTS J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000*, v. 10, p. 139-159, 1996.
- REBELO MA; TOSTES V; ARAÚJO NC; MARTINI SV; BOTELHO BF; GUGGINO WB; MORALES MM. Screening for CLCN5 mutation in renal calcium stone formers patients. *An Acad Bras Cienc.*, v. 77, n. 1, p. 95-101, 2005.
- SAIKI RK; GELFAND DH; STOFFELSW et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* v. 239, p. 487-491, 1988.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S; FALOONA F. et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle and anemia. *Biotechnology* v. 24, p. 476-480, 1985.

SCHENKEIN HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol* 2000, v. 40, p. 77-93, 2006.

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.*, v. 76, n. 7, p. 1100-1105, 2005.

SOCRANSKY SS; HAFFAJEE AD; CUGINI MA; SMITH C; KENT RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, v. 25, n. 2, p. 134-44, 1998.

THEODORO LH; PIRES JR; FERNANDES LA; GUALBERTO-JÚNIOR EC; LONGO M; DE ALMEIDA JM; GARCIA VG. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci*, 2013.

THEODORO LH; SILVA SP; PIRES JR; SOARES GH; PONTES AE; ZUZA EP. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci*. Jul; v. 27, n. 4, p. 687-93, 2012.

ANEXO A - CERTIFICADO DA APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquã

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeito fotodinâmico do curcumim no tratamento da periodontite induzida em ratos: Estudo histomorfométrico" sob responsabilidade da Pesquisadora LETÍCIA HELENA THEODORO e colaboração de Valdir Gouveia Garcia, Márcio Luiz Ferro e Mariellen Longo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00725-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Curcumim photodynamic effect in the treatment of induced periodontitis in rats: a histomorphometric study", process number 00725-2012, under responsibility of LETÍCIA HELENA THEODORO and with collaboration of Valdir Gouveia Garcia, Márcio Luiz Ferro and Mariellen Longo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Edison Ervolino
CEUA Vice-Coordenador