



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

**LUDIMILA CREPALDI LOURENÇO**

**Avaliação dos efeitos da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) como terapia coadjuvante a RAR no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico.**

Aracatuba-SP

2014



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

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

**LUDIMILA CREPALDI LOURENÇO**

**Avaliação dos efeitos da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) como terapia coadjuvante a RAR no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico.**

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<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Leticia Helena Theodoro

**Araçatuba-SP**

**2014**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais **ÂNGELO JOSÉ VIANA LOURENÇO** e **ELISABETE CREPALDI** por todo o apoio, carinho e dedicação dados durante toda a minha vida. Obrigado por serem meus maiores exemplos e de estarem presentes em todos os momentos da minha vida. O amor e gratidão que sinto por vocês dois é imensurável .

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a **DEUS**, pela dádiva da vida, possibilitando que eu trassa-se meus próprios caminhos, iluminando-os, destinados a conquistas e sucessos.

Em especial, agradeço aos meus **PAIS**, pela oportunidade de financiar meus estudos, por todo suporte emocional e pelo carinho prestado. Por acreditarem no meu potencial, me impulsionando a dar passos para frente, na conquista do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A minha orientadora P o<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **LETÍCIA HELENA THEODORO** por sua dedicação, atenção e paciência, primordiais para a conclusão do meu trabalho. Sua inspiração e exemplo me acompanharão por toda minha vida profissional.

o P o<sup>o</sup> **EDILSON ERVOLINO** pela disponibilidade e comprometimento na realização do trabalho. Sua experiência e ajuda foram de extrema importância para o desenvolvimento do projeto.

A Doutoranda **MARIELLEN** pelo apoio fornecido durante toda a pesquisa, acabou se tornando meu braço direito, terei-a sempre com muito carinho e respeito.

À **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO** pela estrutura oferecida, profissionais dedicados e por todo o suporte direto ou indireto dado durante os anos da graduação.

Ao **Programa PIBIC/CNPq**, da Reitoria da UNESP, pela Bolsa de Iniciação Científica concedida.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao **Diogo Luchiari Frutuoso** meu namorado e melhor amigo, obrigada por todo seu carinho, amor e paciência. Mostrou-me que eu era capaz quando eu já não acreditava mais em mim, seu sorriso e bom humor me motivam todos os dias. Quero ter seu amor e sua companhia para sempre.

Aos meus amigos **Bruna Mantovan, Ligia Bueno, Mauricio de Souza e Renata Pironato** por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos, pela paciência que tiveram em meus momentos difíceis. Construímos uma família em Araçatuba e tenho a certeza que levaremos essa amizade para sempre em nossas vidas.

## **EPÍGRAFE**

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

Steve Jobs.

**LOURENÇO, L.C.** Avaliação dos efeitos da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) como terapia coadjuvante a RAR no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

## **Resumo**

Os objetivos do presente estudo foram avaliar do ponto vista histomorfométricos a efetividade da terapia mecânica associada á irradiação da com laser em baixa intensidade, na periodontite experimentalmente induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica (5-fluorouracil). Setenta e dois animais foram submetidos à indução da periodontite via instalação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdo, o qual foi mantido durante 7 dias. A seguir os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos com 24 animais cada um, que receberam os seguintes tratamentos: Grupo I (n=24) – os animais foram tratados sistemicamente com 5-fluorouracil (5-FU), sem tratamento local; Grupo II (n=24) – os animais foram tratados sistemicamente com 5-FU e com raspagem e alisamento radicular (RAR); Grupo III (n=24) - animais foram tratados sistemicamente com 5-FU, com raspagem e alisamento radicular (RAR) seguido de irradiação com laser em baixa intensidade (LLLT; 660 nm; 35 mW; 120 s; 148,4 J/cm<sup>2</sup>). O quimioterápico 5-FU foi aplicado no momento da instalação da ligadura e 48 horas após nos animais de todos os grupos. Os tratamentos locais foram realizados 7 dias após a instalação da ligadura. Os animais, em número de 8 para cada grupo/tempo, foram eutanasiados nos intervalos de 7, 15 e 30 dias após tratamento local. As peças obtidas foram processadas para se efetuar as análises histológica e histométrica. Na análise histológica avaliou-se as características histológicas dos tecidos periodontais próxima a região de furca. A análise histométrica foi efetuada para se quantificar a perda óssea alveolar da área de furca dos primeiros molares submetidos à indução da periodontite e os dados foram submetidos a análise estatística com nível de significância de 5% (Kruskall-Wallis). Os resultados obtidos no presente estudo não mostraram diferenças na perda óssea alveolar entre os grupos ( $p>0.05$ ). No entanto, na análise histológica, apesar de aos 7 dias as características histológicas serem similares ao grupo tratado com RAR, o progresso do processo de reparo

teve um curso bem mais favorável nos espécimes tratados com LLLT, com redução da magnitude do processo inflamatório e início de reestruturação tecidual, com moderada quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. Assim pode-se concluir que o laser em baixa intensidade favoreceu o processo de reparo dos tecidos periodontais da área de furca, apesar de não ter sido eficiente para o controle da perda óssea alveolar nos períodos avaliados.

Palavras-chave: Periodontite, Laser, 5- Fluorouracil.



**LOURENÇO, L.C.** Evaluation of the effects of therapy with low-intensity laser as adjunctive therapy to SRP on treatment of experimental periodontitis in immunosuppressed rats with chemotherapy: histomorphometric study. completion of course – School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

## **Abstract**

The aim of the present study is to assess from the histomorphometric perspective the effectiveness of the mechanical therapy and the effects of low level laser, associated to the mechanical therapy, in the periodontitis experimentally induced in mice immunosuppressed with chemotherapy drug. Seventy-two animals were submitted to induced periodontitis via cotton wire installed around the left mandibular first molars, which was maintained for 7 days. Then the animals were randomly separated into 3 groups of 24 animals each, which received the following treatments: Group I (n=24) – the animals were treated systemically with 5-fluorouracil (5-FU), without local treatment; Group II (n=24) – the animals were treated systemically with 5-FU and with scaling and root planing (SRP); Group III (n=24) – the animals were treated systemically with 5-FU, with scaling and root planing (SRP) followed by low level laser therapy (LLLT; 660 nm; 35 mW; 120 s; 148,4 J/cm<sup>2</sup>). Chemotherapeutic 5-FU was applied at the moment of installation of the ligature and 48 hours after in the animals of all groups. Local treatments were performed 7 days after periodontitis induction. The animals, in an amount of 8 per each group/interval, were sacrificed in intervals of 7, 15 and 30 days after local treatment. The cuts obtained were processed for histological and histometric analysis. In the histological analysis were assessed the histological characteristics of the periodontal tissues of the bone tissue areas and of the periodontal ligament close to the furcation. The histometric analysis was performed in order to quantify the alveolar bone loss of the furcation area of the first molars submitted to the periodontitis induction and the data were submitted to statistical analysis with a 5% significance level (Kruskall-Wallis). The results obtained in the present study do not show differences in the alveolar bone loss among the groups (p>0.05). However, in the histological analysis, despite the histological characteristics being similar to the group treated with SRP after 7 days, the progress of the repair process had a more favorable course in specimens treated with LLLT, with reduced magnitude of the the inflammatory process and beginning of tissue restructuring, with moderate amount of collagen fibers and fibroblasts. It can therefore be concluded that

low level laser minimized the effects of the chemotherapeutic in the evolution of periodontal tissues repair of the furcation area, despite not having been effective for control of the alveolar bone loss in the evaluated intervals.

Keywords: Periodontitis, Laser, 5-Fluorouracil

## **Lista de Abreviaturas**

RAR: Raspagem e alisamento radicular

aPDT: Terapia fotodinâmica antimicrobiana

LLLT: Terapia com laser em baixa intensidade

5-FU: 5-fluorouracil

HE: Hematoxilina e eosina

PO: Perda óssea

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>12</b>
<b>2. Objetivo</b>	<b>14</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Animais</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Indução da Periodontite</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Tratamento com a Droga Quimioterápica</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Grupos experimentais</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Laser em baixa intensidade (LLLT)</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Períodos experimentais</b>	<b>17</b>
<b>3.6 Processamento laboratorial</b>	<b>17</b>
<b>3.7 Análise Histológica e Histométrica</b>	<b>17</b>
<b>3.8 Análise Estatística</b>	<b>18</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Análise histológica</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Análise histométrica</b>	<b>24</b>
<b>5. Discussão</b>	<b>25</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>28</b>
<b>Referências</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO</b>	<b>35</b>

## 1. Introdução

Periodontite crônica é uma doença infecciosa causada por patógenos periodontais resultando em inflamação, perda de inserção e reabsorção óssea, sendo caracterizado por formação de bolsa e/ou recessão gengival (ARMITAGE, 1999; FLEMMIG, 1999), é influenciada por fatores locais e sistêmicos que podem alterar a resposta do indivíduo frente à agressão microbiana (ANDERSEN et al., 2007).

Frente às toxinas bacterianas, processos imuno-inflamatórios são desencadeados nos tecidos periodontais como forma de impedir que estes se disseminem ou invadam os tecidos (SCHENKEIN, 2006). Estes mecanismos constituem a defesa do hospedeiro que, em alguns casos, podem ser prejudiciais, pois são capazes de danificar ou destruir células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo, além do osso alveolar.

O objetivo da terapia periodontal é eliminar os depósitos supra e subgengival da superfície radicular a fim de impedir o início e a progressão da doença (COBB, 1966). O tratamento tradicional não cirúrgico mecânico, é representado principalmente por raspagem e alisamento radicular (RAR), que inclui controle de placa e debridamento mecânico. Embora efetivo, esta abordagem de tratamento apresenta varias limitações, tais como dificuldade de acesso nas áreas de furca, concavidades, sulcos e áreas distal de molares (ADRIAENS et al., 1988; ELTAS & ORBAK, 2012). A fim de superar essas limitações, várias estratégias de tratamento coadjuvante, tais como o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido propostas (SGOLASTRA et al., 2012). O efeito da irradiação dos tecidos periodontais com lasers em baixa intensidade (LLLT), como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal tem sido avaliado em alguns estudos em animais (ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008a; ALMEIDA et al., 2008b; GARCIA et al., 2010; GARCIA et al., 2011; GARCIA et al., 2013) e em estudos clínicos em humanos (QADRI et al., 2005; AYKOL et al., 2011; CALDERÍN et al., 2013). No entanto, a variedade de efeitos biológicos desta radiação nos tecidos periodontais ainda não está totalmente esclarecida (CALDERÍN et al., 2013) e ainda existem resultados conflitantes de sua efetividade na literatura.

Também está definido na literatura que algumas condições sistêmicas podem interferir na resposta do hospedeiro frente aos fatores locais, como o tabagismo e o diabetes, que são consideradas condições de risco para a periodontite (ALMEIDA et al., 2008b; GARCIA et al., 2011). Além disto, pacientes que estão em tratamento antineoplásico como a quimioterapia, merecem também atenção especial, principalmente porque as drogas utilizadas nesta terapia

não apresentam seletividade entre a célula cancerosa e as células normais e, por esta razão, são lesivas a ambas (McGUIRE, 2002).

Por outro lado, poucos são o estudos que avaliaram os efeitos de drogas quimioterápicas sobre os tecidos periodontais (JENSEN et al., 2008; MAZZEO et al., 2009; HONG et al., 2010) e raros são os que avaliaram os efeitos do tratamento periodontal em indivíduos sob tratamento com quimioterápicos.

## **2. Objetivo**

Avaliar do ponto vista histomorfométrico a efetividade da terapia mecânica associada à irradiação com laser em baixa intensidade na periodontite experimentalmente induzida, em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica 5-fluorouracil.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 72 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 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba (processo 00800-2012). Anexo A.

#### 3.2 Indução da Periodontite

A anestesia geral foi obtida pela associação de 70 mg/kg de peso corporal de cloridrato de ketamina (Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA) associado à 6 mg/kg de peso corporal de cloridrato de xilazina (Coopazine, Coopers, São Paulo, SP, Brasil) através de injeção 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 número 24 (Corrente Algodão nº 24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) que foi mantido em posição sub-gengival (JOHNSON et al., 1975; NOCITI et al., 2000; ALMEIDA et al., 2008b).

#### 3.3 Tratamento com a Droga Quimioterápica

Todos os animais receberam o quimioterápico **5-fluorouracil** (Fluorouracil, 50 mg/ml, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) administrado por injeção intraperitoneal realizada em dois momentos: no dia da instalação da ligadura e 48 horas após a instalação da ligadura. Foi utilizado a dose de 60 e 40 mg/Kg de peso corporal do animal, respectivamente, de acordo com Medeiros et al. (2010).



### 3.3 *Grupos experimentais*

Após 7 dias de evolução da periodontite experimental induzida, a ligadura foi removida em todos os animais. Em seguida os animais foram divididos em 3 grupos de 24 animais utilizando um sistema de tabela computacional, cada um que receberam os seguintes tratamentos: **GI** (n=24) – os animais foram tratados sistemicamente com 5-fluorouracil (5-FU), sem tratamento local; **GII** (n=24) – os animais foram tratados sistemicamente com 5-FU e com raspagem e alisamento radicular (RAR); **GIII** (n=24) - animais foram tratados sistemicamente com 5-FU, com raspagem e alisamento radicular (RAR) seguido de tratamento com Laser em baixa intensidade (LLLT). A RAR foi realizada por um examinador experiente, feita com auxílio de curetas manuais #1-2 micro mini-five (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA) por meio de 10 movimentos de tração disto-mesial na face vestibular e lingual dos molares. A região da furca e áreas interproximais foram raspadas com as mesmas curetas, por meio de movimentos de tração cérvico-oclusais (FERNANDES et al., 2009).

### 3.4 *Laser em baixa intensidade (LLLT)*

O laser em baixa intensidade que foi utilizado no presente estudo é o **THERA LASE®** (THERA LASE®, D.M.C. Equipamentos Ltda<sup>®</sup>, São Carlos, São Paulo, Brasil) que possui as seguintes características: Emissores InGaAlP (660 nm, laser visível) e GaAsAl (808 nm, laser infravermelho), emissão contínua e pulsada, sistema de entrega com fibra ótica, diâmetro do spot 0,0283 cm<sup>2</sup>.

O laser foi utilizado nos animais do GIII com o seguinte protocolo: emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm (laser visível - vermelho); potência: 35 mW (0,035W); modo de operação: laser contínuo; diâmetro do Spot: 0,0283 cm<sup>2</sup>; modo de aplicação: laser contato, pontual; energia: 2,1 J/Ponto; tempo de exposição por ponto: 60 s; quantidade de pontos de aplicação: 2 (vestibular e lingual); tempo de exposição total: 120 s; densidade energética / ponto: 74,2 J/ cm<sup>2</sup>.

A irradiação laser foi realizada durante 60 segundos na face vestibular e 60 segundo na face lingual da área da furca do dente relacionado, tomando-se o cuidado de direcionar a ponteira laser de forma perpendicular ao longo eixo do dente e em contato com a área tratada,

de acordo com trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA et al., 2008a; ALMEIDA et al., 2008b; FERNANDES et al., 2009; GARCIA et al., 2011).

### ***3.5 Períodos experimentais***

Oito animais de cada grupo experimental foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento da periodontite experimental induzida pela administração de dose letal de thiopental (150 mg/kg, Cristália, Produtos químicos farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil). As mandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído tamponado a 4% por um período mínimo de 48 horas.

### ***3.6 Processamento laboratorial***

Os espécimes foram desmineralizados em uma solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% por 6 a 8 semanas. Após inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados de 4  $\mu\text{m}$  foram obtidos no sentido mesio-distal e corados com hematoxilina e eosina (HE).

### ***3.7 Análise Histológica e Histométrica***

Os cortes corados pela técnica de HE foram analisados por microscopia de luz com a descrição das características do tecido ósseo e do ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com periodontite experimental induzida, por um histologista certificado.

A área ( $\text{mm}^2$ ) da perda óssea (PO) na região da furca foi histometricamente determinada utilizando um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha). Após exclusão da primeira e da última secção na qual a região de furca esteve evidente, cinco secções equidistantes de cada dente foram selecionadas para análise histométrica. A área compreendida entre a crista óssea e a superfície do cimento (PO) foi mensurada (NOCITI et al., 2000). A seleção das secções histológicas foram realizadas por um examinador treinado e cego ao experimento. Outro examinador cego ao experimento e calibrado realizou a análise histométrica. Os dados da PO de cada espécime

foram medidos três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes e os valores médios para cada espécime foram obtidos e comparados estatisticamente.

### ***3.8 Análise Estatística***

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Lilliefors e obteve-se  $p > 0,05$ . Sendo assim a análise estatística foi realizada para dados não normais através do teste de variância de Kruskal-Wallis. Para todos os testes, o nível de 5% de significância foi adotado. A análise estatística dos dados histométricos obtidos foram realizadas pelo software BioEstat 5.3 (BioEstat, Windows 1995, Mamimaruá, Manaus, AM, Brasil).

## **4. Resultados**

### ***4.1 Análise histológica***

No grupo GI aos 7, 15 e 30 dias prevaleceu a destruição e desestruturação de todos os tecidos periodontais. O tecido conjuntivo da área de furca apresentava-se totalmente desestruturado e com intenso infiltrado inflamatório que atingia a margem do tecido ósseo alveolar do septo interradicular. Em todos os espécimes grandes espículas de osso necrosado, envoltas por grande quantidade de células inflamatórias, estavam presentes. Em alguns espécimes, especialmente aos 30 dias, o nível de reabsorção óssea foi tão acentuado que eliminou por completo o septo interradicular e atingiu o osso basal da mandíbula, denotando um aumento da severidade da doença periodontal ao longo do tempo. O tecido ósseo do septo interradicular se mostrou composto por trabéculas ósseas muito irregulares, extremamente delgadas, com amplos espaços medulares, alguns dos quais com presença de moderada quantidade de células inflamatórias. O contorno externo do septo interradicular se apresentou muito irregular, repleto de lacunas de reabsorção e muitos osteoclastos ativos (Fig. 1A, 1B, 2A, 2B, 3A e 3B).

No grupo GII aos 7 dias havia severa desestruturação tecidual e intenso infiltrado inflamatório que ocupava o tecido conjuntivo da área de furca e margeava o tecido ósseo do septo interradicular. Espículas de osso necrosado estavam presentes em alguns espécimes. O contorno do septo interradicular se mostrou bastante irregular, repleto de osteoclastos ativos e com as trabéculas ósseas muito delgadas (Fig. 1C e 1D). Aos 15 e 30 dias o volume ocupado pelo infiltrado inflamatório sofreu uma progressiva redução. O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou um discreto sinal de reparação, especialmente aos 30 dias, no entanto, a desestruturação tecidual ainda prevalecia. Havia neste tecido uma pequena quantidade de fibras colágenas, muitos fibroblastos, grande número de vasos sanguíneos e uma moderada quantidade de células inflamatórias. As trabéculas ósseas se mostraram com uma espessura moderada, com grande irregularidade na superfície e com osteoclastos em franca atividade (Fig. 2C, 2D, 3C e 3D).

Aos 7 dias as características histológicas apresentadas pelo grupo GIII eram similares ao grupo GII. Ambos os grupos exibiram grande desestruturação tecidual, supostamente

reflexo do trauma ocasionado pela RAR, todavia o progresso do processo de reparo teve um curso bem mais favorável em GIII (Fig. 3E e 3F). Aos 15 dias, observou-se no tecido conjuntivo da área de furca um moderado infiltrado inflamatório e um início de reestruturação tecidual, com moderada quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. Nesta área, aos 30 dias tecido conjuntivo apresentou um infiltrado inflamatório discreto e grande quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. Em ambos os períodos o osso do septo interradicular exibiu trabéculas ósseas de contorno superficial externo mais regular e com menos áreas de reabsorção óssea ativa e poucos osteoclastos (Fig. 2E, 2F, 3E e 3F).

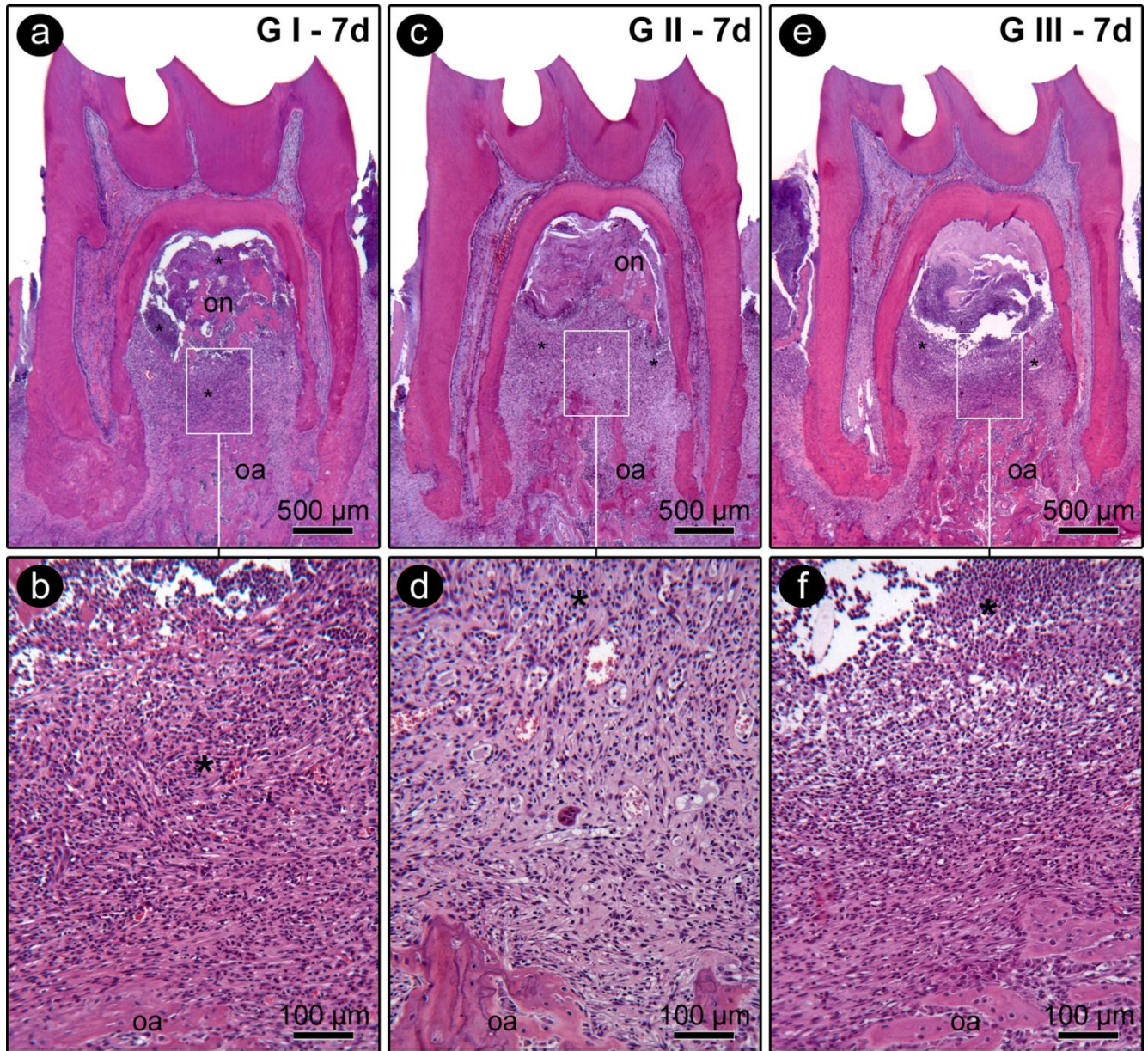


Figura 1: Fotomicrografias da área de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando o aspecto histológico dos tecidos periodontais aos 7 dias nos grupos G I (a, b), G II (c, d) e G III (e, f). Notar a intensa destruição e desestruturação tecidual nos três grupos experimentais. Abreviações e símbolos: oa (osso alveolar); on (osso necrótico), asteriscos, área de grande concentração de células inflamatórias. Coloração de H&E. Aumento original: a, c, e e: 50x; b, d e f: 250x. Barras de escala: a, c, e e: 500 μm; b, d e f: 100 μm.



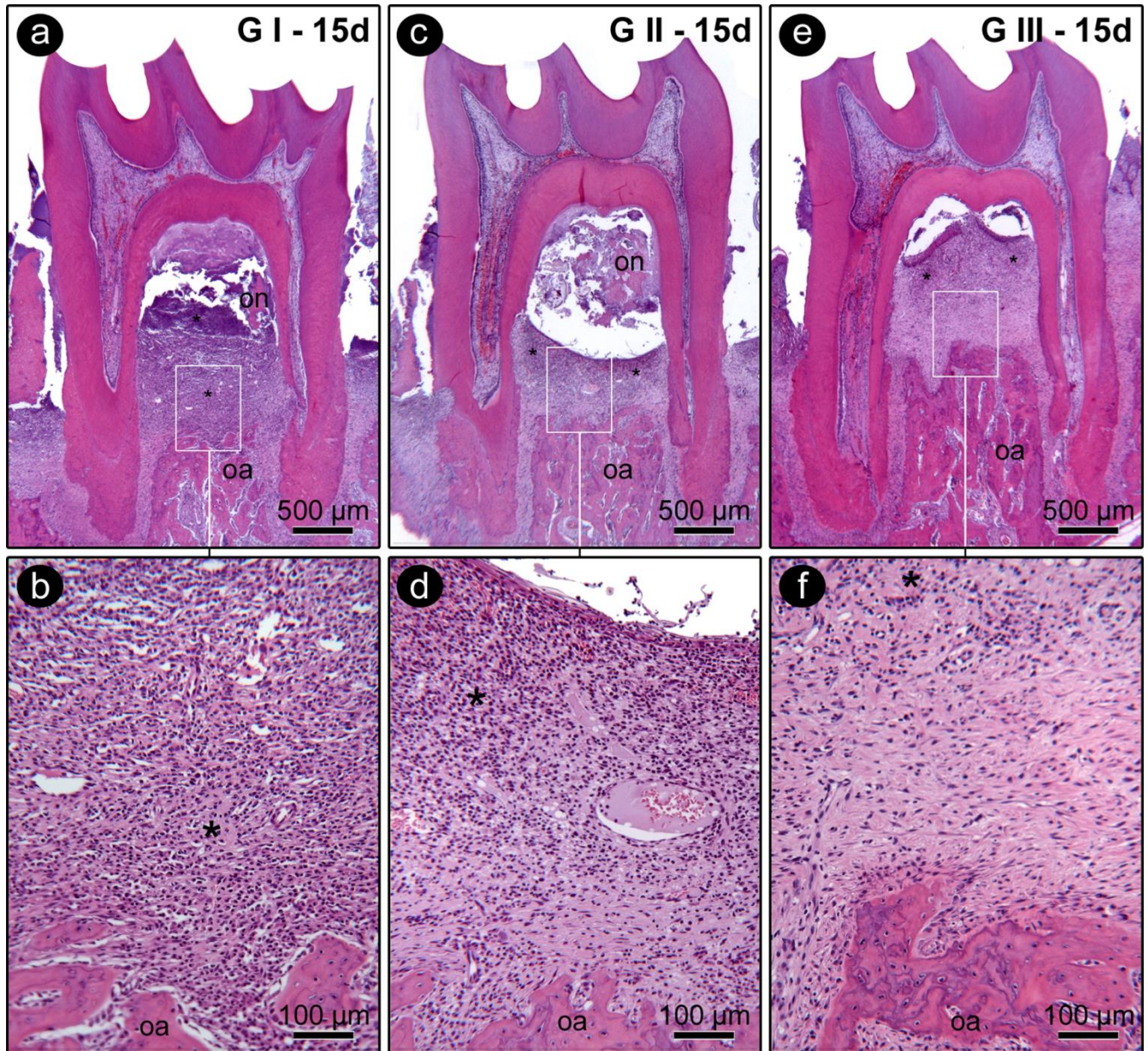


Figura 2: Fotomicrografias da área de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando o aspecto histológico dos tecidos periodontais aos 15 dias nos grupos G I (a, b), G II (c, d) e G III (e, f). Notar a grande destruição e desestruturação tecidual em G I e os sinais de reestruturação tecidual em G II e especialmente em G III. Abreviações e símbolos: oa (osso alveolar); on (osso necrótico), asteriscos, área de grande concentração de células inflamatórias. Coloração de H&E. Aumento original: a, c, e e: 50x; b, d e f: 250x. Barras de escala: a, c, e e: 500  $\mu$ m; b, d e f: 100  $\mu$ m.



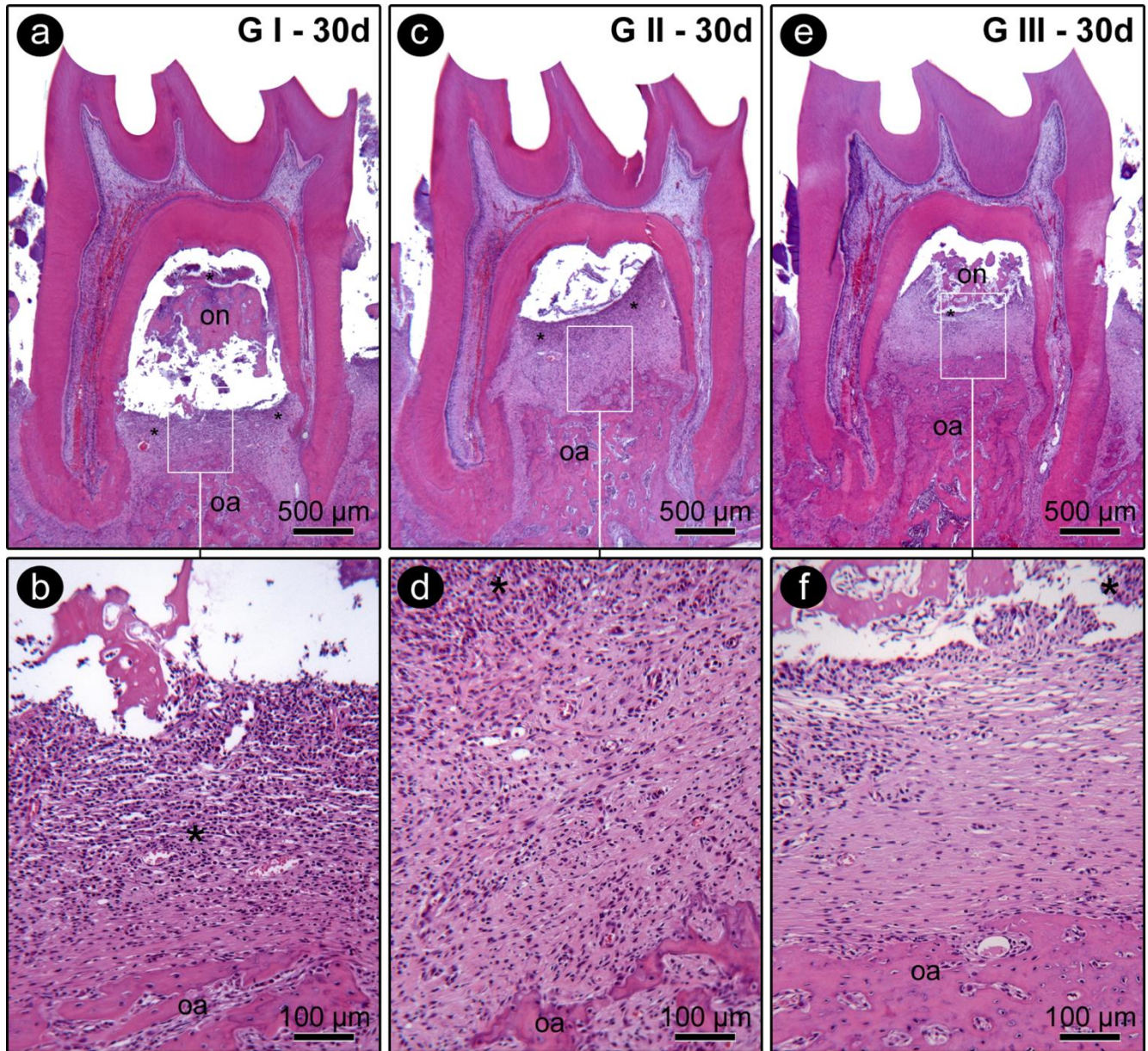
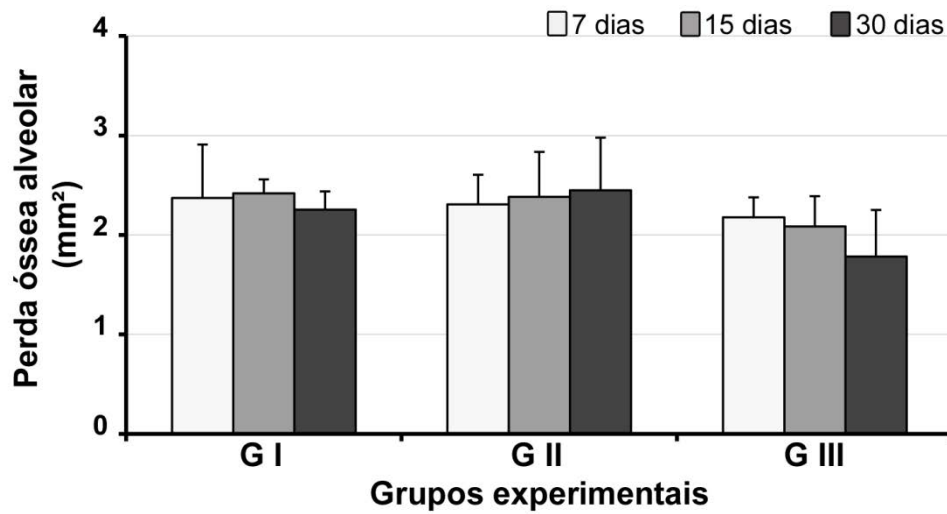


Figura 3: Fotomicrografias da área de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando o aspecto histológico dos tecidos periodontais aos 30 dias nos grupos G I (a, b), G II (c, d) e G III (e, f). Notar a permanência de severa desestruturação tecidual em G I e os evidentes sinais de reestruturação tecidual em G II e especialmente em G III. Abreviações e símbolos: ao (osso alveolar); on (osso necrótico), asteriscos, área de grande concentração de células inflamatórias. Coloração de H&E. Aumento original: a, c, e e: 50x; b, d e f: 250x. Barras de escala: a, c, e e: 500  $\mu\text{m}$ ; b, d e f: 100  $\mu\text{m}$



## 4.2 Análise histométrica

Os dados histométricos estão apresentados na figura 4. Os resultados não demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação à perda óssea, na comparação intragrupos entre os períodos ((GI)p=0.3687; (GII)p=0.9482; (GIII)p=0.1698), nem na comparação intergrupos em cada período ((7d)p=0.4413; (15d)p=0.1751; (30d)p=0.0933).



**Figura 4.** Gráfico representando as médias e desvio padrão dos dados da perda óssea alveolar ( $\text{mm}^2$ ) dos grupos em cada período.

## 5. Discussão

O objetivo do presente estudo foi avaliar do ponto vista histomorfométrico a efetividade da terapia mecânica associada á irradiação com laser em baixa intensidade na periodontite experimentalmente induzida, em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica (5-FU).

A periodontite é uma doença crônica inflamatória das estruturas de apoio dos dentes, causada por periodontopatógenos, e o resultado clínico é muito influenciado pela resposta imune do hospedeiro local (KINANE & LAPPIN, 2001). A extensão e a gravidade apresentam razões multifatoriais, podendo estar associadas a condições de risco, como alterações sistêmicas e aspectos comportamentais (VIEIRA et al., 2010).

Qualquer procedimento odontológico está sujeito à disseminação de micro-organismos pela corrente sanguínea, chamada bacteremia transitória, com diferentes estágios de gravidade. A incidência e a magnitude da bacteremia dependem de fatores de ordem geral e localizada, portanto pacientes em condições saudáveis e sob controle bucal apresentam menos riscos após os procedimentos orais (FORNER et al., 2006).

Pacientes sob o tratamento com quimioterápicos contra o câncer, por exemplo, podem manifestar efeitos colaterais. Dentre os quimioterápicos, o 5-Fluorouracil (5-FU), um antimetabólito do tipo análogo da pirimidina, tem amplo espectro de ação contra tumores sólidos do trato gastrointestinal, ovário, fígado, cérebro e mama (ARIAS, 2008). A ação do 5-FU sobre o DNA e o RNA promove a toxicidade e morte celular (NOORDHUIS et al., 2004; ARIAS, 2008; WISNIEWSKA-JAROSINSKA et al., 2011). Drogas que afetam a síntese de DNA, como o 5-FU, exibem efeitos adversos na cavidade oral mais pronunciados, em razão da rápida renovação do epitélio oral (NAIDU et al., 2004). No periodonto o epitélio juncional é responsável pela adesão dentogengival e tem um papel fundamental na defesa do tecido periodontal (TSUKAMOTO et al., 2012). No presente estudo foi constatado que houve uma destruição severa do tecido ósseo da região da furca em todos os animais que foram tratados com 5-FU, com áreas extensas de necrose óssea atingindo quase o limite do ápice radicular. Estes resultados também foram demonstrados em outro estudo que avaliou o efeito do 5-FU na perda óssea alveolar e demonstrou que houve aumento da perda óssea alveolar quando comparado aos animais não tratados com 5-FU (NOVAES, 2013).

A remoção da placa e redução do número de células infecciosas são métodos de profilaxia e terapia periodontal. No entanto, estes métodos são difíceis tarefas que não podem ser realizado adequadamente, por um único meio mecânico, tal como raspagem e alisamento

radicular (SLOTS & KAMMA, 2001). Com relação aos tratamentos locais os resultados de nosso estudo estão de acordo com o estudo de Novaes (2013) que demonstraram que a RAR não foi efetiva na redução da perda óssea alveolar nos animais tratados com 5-FU.

Por outro lado vários estudos in vivo tem avaliado o efeito da LLLT como técnica coadjuvante ou monoterapia para o tratamento periodontal de animais normais (ALMEIDA et al., 2007, ALMEIDA et al., 2008) ou modificados sistemicamente (ALMEIDA et al., 2008; GARCIA et al., 2010; GARCIA et al., 2011; GARCIA et al., 2013).

No presente estudo não houve redução significativa da perda óssea alveolar nos animais tratados com LLLT, quando comparado aos animais não tratados e ou tratados com RAR. No entanto, na análise histológica, apesar de aos 7 dias as características histológicas serem similares ao grupo tratado com RAR, o progresso do processo de reparo teve um curso bem mais favorável nos espécimes tratados com LLLT, com redução da magnitude do processo inflamatório e início de reestruturação tecidual, com moderada quantidade de fibras colágenas e fibroblastos.

Almeida et al. (2008) ao analisar o efeito da utilização de LLLT no tratamento da PO em animais, foi demonstrado na análise histométrica que houve menor PO após 7 dias de tratamento, porém não houve diferença estatisticamente significativa em todos os períodos. Alguns estudos na literatura demonstram que o LLLT é eficaz para acelerar a reparação tecidual em áreas normais ou infectadas (LUCAS et al., 2002; WOODRUFF et al., 2004). Em outro estudo, Almeida et al. 2008 avaliaram os efeitos de diversas terapiaias para combater a periodontite induzida em animais com diabetes e constaram nos resultados histológicos, que as áreas de furca tratadas com LLLT apresentaram tecido ósseo e conjutivo organizado, com número moderado de fibroblastos na região de ligamento periodontal, cemento com características normais e apresentaram redução significativa na PO aos 30 dias.

Em um estudo com ratos tratados com dexametasona de Garcia et al. (2010) ficou evidente que o tratamento de RAR associado com LLLT promoveu menor PO em relação aos animais que foram tratados apenas com solução salina e RAR. Aos 7, 15 e 30 dias nas áreas tratadas com LLLT a área do ligamento periodontal foi considerada intacta e organizada, com fibras de colágeno paralelas e ausência de infiltrado inflamatório, o tecido ósseo apresentou-se organizado, com trabeculado ósseo e superfície do cemento sem sinais de reabsorção.

Garcia et al. (2011), demonstraram em animais modificados sistemicamente com nicotina, que áreas tratadas com LLLT associada a raspagem apresentaram menor PO em área de furca e menor número de células TRAP positivas, comparado as áreas tratadas apenas com raspagem. Outro estudo de Garcia et al. (2013), em ratas ovariectomizadas, demonstrou em

animais tratados localmente com LLLT, reduzida perda óssea em comparação com animais tratados somente com raspagem e alisamento radicular. A PO foi mais proeminente aos sete dias, com valores progressivamente reduzidos aos 15 e 30 dias. LLLT leva a uma cascata de acontecimentos que pode ter efeitos biológicos vantajosos sobre a cura devido ao aumento do metabolismo celular e a síntese de colágeno que têm sido demonstrados em fibroblastos, assim como o aumento da atividade dos leucócitos e liberação dos fatores de crescimento (QADRI et al., 2005).

O laser em baixa intensidade inibe a produção de mediadores inflamatórios nas células do ligamento periodontal, favorece a quimiotaxia celular, promove a vasodilatação local e angiogênese (SHIMIZU et al., 2005; HOURELD & ABRAHAMSE, 2007). Durante o tratamento com LLLT deve haver um aumento da capacidade de difusão de oxigênio através dos tecidos, favorecendo o processo de reparação, porque a secreção de colágeno pelos fibroblastos no espaço extracelular ocorre apenas na presença de elevadas taxas de pressão de oxigênio (REENSTRA et al., 2001).

Durante a reabsorção óssea, citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1- $\alpha$  e 1 $\beta$  e factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), recrutam precursores de osteoclastos em áreas de osso peri-alveolares (WANG et al., 1997). Todo este sistema é influenciado por múltiplos fatores e segundo alguns autores a LLLT poderia afetar os osteoblastos, acelerando sua formação e estimulando a sua atividade (FREITAS et al., 2000), enquanto inibe a produção de mediadores inflamatórios nas células do ligamento periodontal (SAITO et al., 1991).

Deve mencionar-se que os efeitos biológicos da LLLT podem ser influenciados por algumas variáveis, tais como, densidade de energia, comprimento de onda, intensidade de potência, o tempo de exposição, e do tipo de aplicação (BATTHI et al., 1998). Além disso, a intensidade da luz laser deve ser suficiente para permitir uma penetração significativa na interface dente-gengiva (BATTHI et al., 1998). A irradiação com laser é capaz de modificar o comportamento das células, influenciada pelo comprimento de onda e pelo complexo de luz apresentar dispersão dos componentes do tecido (PINHEIRO, 2006)

## **6. Conclusão**

Dentro dos limites do estudo pode-se concluir que o Laser em Baixa intensidade, nos parâmetros utilizados, favoreceu o processo de reparo dos tecidos periodontais da área de furca, apesar de não ter sido eficiente para o controle da perda óssea alveolar nos períodos avaliados.

## 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, n. 8, p. 493-503, 1988.

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, n.11, p. 2156-65, 2008b.

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, n. 6, p. 1081-8, 2008a.

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.

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, n.2, p. 34-38, 2007.

ARIAS JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. *Molecules*, v.13, n.10, p.2340-69, 2008.

ARMITAGE GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, v. 4, n.1, p.1-6, 1999.

AYKOL G; BASER U; MADEN I; KAZAK Z; ONAN U; TANRIKULU KUKU S; ADEMOGLU E; ISSEVER H; YAUSSIN F. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol*, v.82, n.3, p.481- 8, 2011.

BHATTI M; MACROBERT A; MEGHJI S; HENDERSON B; WILSON M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol*, v.65, n.6, p.1026-31, 1997.

CALDERÍN S; GARCÍA-NÚÑEZ JA; GÓMEZ C. Short-term clinical and osteoimmunological effects of scaling and root planing complemented by simple or repeated laser phototherapy in chronic periodontitis. *Lasers Med Sci*, v. 28, n. 1, p. 157-66, 2013.

COBB CM; DRISKO CL; KILLOY WJ; MICHALOWICZ BS; PIHLSTROM BL; LOWENGUTH RA; CATON JG; ENCARNACION M; KNOWLES M; GOODSON JM. Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers: clinical response. *J Periodontol*, v.66, n.8, p.692-9, 1995.

ELTAS A; ORBAK R. Clinical Effects of Laser Applications During Nonsurgical Periodontal Treatment in Smoking and Nonsmoking Patients with Chronic Periodontitis. *Photomed Laser Surg*, v.30, n.7, p. 360-6, 2012.

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.

FLEMMIG TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*, v. 4, n.1, p. 32-8, 1999.

FORNER L; LARSEN T; KILIAN M; HOLMSTRUP P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*, v. 33, n.6, p. 401-7, 2006.

FREITAS IGF; BARANAUSKAS V; CRUZ MA. Laser effects on osteogenesis. *Applied Surface Science*, v.154–158, p.548–554, 2000.

GARCIA VG; FERNANDES LA; BOSCO AF; ALMEIDA JM; NAGATA MJH; MARTINS TM; OKAMOTO T; THEODORO LH. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. *Lasers Med Sci*, v. 25, n.2 p. 197–206, 2010.

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*, v. 38 n. 12 p. 1106-14, 2011.

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.

HONG SB; VALERA VA; STULL J; NGO DT; BABA M; MERINO MJ; LINEHAN WM; SCHMIDT LS. Tumor suppressor FLCN inhibits tumorigenesis of a FLCN-null renal cancer cell line and regulates expression of key molecules in TGF-beta signaling. *Mol Cancer*, v.23, n.9, p.160, 2010.

HOURELD N; ABRAHAMSE H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm<sup>2</sup>. *Photomed Laser Surg*, v.25, n.2, p.78-84, 2007.

JENSEN SB; MOURIDSEN HT; BERGMANN OJ; REIBEL J; BRÜNNERN; NAUNTOFTE B. Oral mucosal lesions, microbial changes, and taste disturbances induced by adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 106, n.2, p. 217-226, 2008.

JOHNSON IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontol*, v.10, n.6, p. 332-345, 1975.

KINANE DF; LAPPIN DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*, v.59, n.3, p.154-60, 2001.

LUCAS C; CRIENS-POUBLON JL; COCKRELL CT; HAAN RJ. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy; were clinical studies justified A systematic review. *Lasers Med Sci*, v.17, n.2, p.110-134, 2002.

MAZZEO MA; LINARES JA; CAMPOS ML; BUSAMIA BE; DUBERSARSKY C; LAVARDA M; JARCHUM G; FINKELBERG AB. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluororacil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v.14, n.3, p.108-13, 2009.



MCGUIRE DB. Mucosal tissue injury in cancer therapy: more than mucositis and mouthwashes. *Cancer Pract*, v. 10, p. 179-191, 2002.

MEDEIROS, C.A.C.X.; LEITÃO, R.F.C.; MACEDO, R.N.; BARBOSA, D.R.M.M.; GOMES, A.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.C. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v. 67, p. 1085- 1100, 2010.

NAIDU R; RAMANA GV; RANI PU; MOHAN IK; SUMAN A; ROY P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of câncer. *Neoplasia*, v.6, n.5, p. 423-31, 2004.

NOCITI JR FH; NOGUEIRA-FILHO GR; PRIMO MT; MACHADO MA; TRAMONTINA VA; BARROS SP; SALLUM SA . The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis – a histometric study in rats. *J Periodontol*, v. 71, n. 9, p. 1460-4, 2000.

NOORDHUIS P; HOLWERDA U; VAN DER WILT CL; VAN GROENINGEN CJ; SMID K; MEIJER S; PINEDO HM & PETERS GJ. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol*, v.15, n.7, p.1025-32, 2004.

NOVAES VCN. Influência do 5-Fluorouracil nos tecidos periodontais normais, sobre a evolução e tratamento da doença periodontal experimental induzida. 2013. 114 F. Tese (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

PINHEIRO AL; GERBI ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*, v.24, n.2, p.169–178, 2006.

QADRI T; MIRANDA L; TANE R J; GUSTAFSSON A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*, v.32, n.7, p.714-9, 2005.

REENSTRA WR; VEVES A; ORLOW D. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetics versus non diabetic sibling controls. *Acad Emerg Med*, v.8, p.519, 2001.

SAITO S; NGAN P; ROSOL T; SAITO M; SHIMIZU H; SHINJO N; SHANFELD J.& DAVIDOVITCH Z. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermitente pressure and interleukin-1beta on bone resorption. *J Dent Res.* , v.70, n.1, p.27–33, 1991.

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

SGOLASTRA F; RENZI T; DRAGHETTI S; MEDRZYCKI P; LODESANI M; MAINI S; PORRINI C. Effects of neonicotinoid dust from maize seed-dressing on honey bees. *Bulletin of Insectology*, v.65, n.2, p.273-280, 2012.

SHIMIZU N; YAMAGUCHI M; GOSEKI T; SHIBATA Y; TAKIGUCHI H; IWASAWA T; ABIKO Y. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res.*, v.74, n.7, p.1382-8, 1995.

SLOTS J; KAMMA JJ. General health risk of periodontal disease. *Int Dent J.*, v.51, n.6, p.417-27, 2001.

TSUKAMOTO Y; USUI M; YAMAMOTO G; TAKAGI Y; TACHIKAWA T; YAMAMOTO M & NAKAMURA M. Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *J Periodontal Res.*, v.47, n.6, p.750-7, 2012.

VIEIRA TR; PÉRET AC; FILHO LAP. Periodontal problems associated with systemic diseases in children and adolescents. *Rev Paul Pediatr*, v. 28, n. 2, p. 237-3, 2010.

WANG CY; TANI-ISHII N; STASHENKO P. Bone-resorptive cytokine gene expression. in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol*, v.12, n.2, p.65–71, 1997.

WISNIEWSKA-JAROSINSKA M; SLIWINSKI T; KASZNICKI J; KACZMARCZYK D; KRUPA R; BLOCH K; DRZEWOSKI J; CHOJNACKI J; BLASIAK J & MORAWIEC-SZTANDERA A. Cytotoxicity and genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells. *Mol Biol Rep.*, v.38, n.6, p. 3679-3688, 2011.

WOODRUFF LD; BOUNKEO JM; BRANNON WM; DAWES KS; BARHAM CD; WADDELL DL; ENWEMEKA CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: A meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*, v.22, n.3, p.241-7, 2004.

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

---



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

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e imunológico" sob responsabilidade da Pesquisadora LETÍCIA HELENA THEODORO e colaboração de Valdir Gouveia Garcia and Mariéllen Longo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00800-2012.

### CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of different protocols of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of the induced periodontitis in rats treated with chemotherapy: a histomorphometric, immunohistochemical and immunologic study", process number 00800-2012, under responsibility of LETÍCIA HELENA THEODORO and with collaboration of Valdir Gouveia Garcia and Mariéllen Longo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

  
Prof. Dr. Edilson Ervolino  
CEUA Vice-Coordenador