



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

TAMARA SERAPHIM BUENO

**Efeito fotodinâmico da curcumina sobre a
proliferação celular em áreas com
periodontite induzida em ratos**

ARAÇATUBA-SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

TAMARA SERAPHIM BUENO

**Efeito fotodinâmico da curcumina sobre a
proliferação celular em áreas com
periodontite induzida em ratos**

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

Orientadora: Prof. Dra. Letícia
Helena Theodoro

ARAÇATUBA-SP

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos Eduardo e Silvia e avô João, que ao longo da minha vida se esforçaram e abdicaram de seus sonhos para que um dia eu pudesse realizar os meus. Através de vocês pude conhecer a Deus e através da fé que possuem, pude aprender a me tornar um ser humano melhor. A vocês dedico e agradeço por mais essa etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?

Salmos 116:12

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, sempre presente na minha vida, esperança e motivo a quem devo pela realização de todos os meus sonhos.

Ao meu amor Manoel Prior pelo carinho, zelo e paciência, tantas vezes meu conforto, meu sonhar e motivo do meu sorriso.

Aos meus irmãos, Tássio e Gabriela, por serem por serem meu apoio em todos os momentos da minha vida.

À Maryelisa Vicente Gonçalves, uma das melhores coisas adquiridas durante a faculdade, amiga e companheira de todos os momentos, e por contribuir diretamente neste trabalho através da tradução.

À Ana Paula Seraphim e Isadora Seraphim por nossa amizade, que é fortalecida por nossos laços de sangue.

Aos amigos, Paula, Maria Carolina, Ana Flavia, Adriano, Lenara, Wiry, pelas alegrias vividas durante a graduação, e aos amigos Glauber, Maísa, Rangel, Lidiane, Willian, Suelen, Miriane, Luan, presentes que Deus me concedeu.

À minha querida amiga Naida Assem, que muito contribuiu para minha formação acadêmica e também minha formação pessoal e humana.

À Profa. Letícia Theodoro, pelo carinho conquistado durante nossa convivência, pelos conhecimentos passados durante a graduação, pelo apoio, atenção e dedicação durante o período de desenvolvimento da iniciação científica e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Valdir Garcia, pelo apoio e ensinamentos passados, através de seu bom humor característicos e por sempre nos motivar nas atividades clínicas.

Ao Prof. Edilson Ervolino, que contribuiu grandemente na execução desse trabalho, sempre empenhado e se mostrando inteiramente à disposição para o esclarecimento de minhas dúvidas.

À minha querida e amada Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Agradeço à **Reitoria da UNESP e ao CNPq** pela concessão de bolsa de iniciação científica e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pelo auxílio para desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2012/19243-8).

Aquele que teme ao Senhor não tremerá de nada terá medo, pois o próprio Senhor é a sua esperança. Feliz a alma do que teme ao Senhor. Para quem olha ela, e quem é a sua força? Os olhos do Senhor estão voltados para aqueles que o temem; ele é um poderoso protetor, um sólido apoio, um abrigo contra o calor, uma tela contra o ardor do meio dia, um sustentáculo contra os choques, um amparo contra a queda. Ele eleva a alma, ilumina os olhos; Dá saúde vida e bênção.

Eclesiástico 34, 16-20.

Bueno TS. **Efeito fotodinâmico da curcumina sobre a proliferação celular em áreas com periodontite induzida em ratos**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica iniciada por uma resposta imune para os microrganismos do biofilme. O objetivo do presente estudo foi avaliar do ponto vista imunoistoquímico, pela imunomarcção de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), a influência da Curcumina como agente fotossensibilizador associada à irradiação com LED na aPDT (terapia fotodinâmica antimicrobiana), 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, que receberam os seguintes tratamentos: G1 (n=24) - representado por animais que não sofreram nenhum tratamento local; G2 (n=24) – irrigação com solução da Curcumina (40 μ M); G3 (n=24) – irradiação com LED (Light Emitting Diode); G4 (n=24) – irrigação com solução de Curcumina (40 μ M) seguido da irradiação com LED. Os tratamentos locais foram realizados 7 dias após a indução da periodontite. O LED, que foi utilizado no presente estudo para a realização da aPDT, é um emissor semiconductor de Nitrido de Índio e Gálio (InGá), com comprimento de onda de 465 a 485nm e irradiância de 600mW/cm². 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. Os animais, em número de 8 para cada grupo/tempo, foram eutanasiados nos intervalos de 7, 15 e 30 dias após os tratamentos. Após a eutanásia os espécimes foram submetidos à avaliação imunoistoquímica por meio de imunomarcção de PCNA. Os dados foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5%. Os animais do G1 apresentaram maior número de células PCNA positivas aos 15 dias, comparado com os animais do G3 (p=0.0097) e G4 (p=0.0155). Aos 30 dias os animais do G1 apresentaram maior número de células PCNA positivas comparado

com o G2. Diante dos resultados do presente estudo, e com os parâmetros utilizados, pode-se concluir que a aPDT utilizando o LED como fonte de luz e a Curcumina como fotossensibilizador demonstrou ter ação positiva na proliferação celular na região de furca de ratos com periodontite induzida.

Palavras-chaves: Periodontite. Fotoquimioterapia. Ratos. Curcumina.

Bueno TS. **Antimicrobial photodynamic therapy effect with curcumin of cell proliferation for the treatment of periodontitis experimentally induced in rats.** 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015. .

ABSTRACT

Periodontal disease is a chronic inflammatory condition initiated by an immune response to biofilm microorganisms. The aim of this study was to evaluate by Immunohistochemistry through the nuclear antigen immunostaining of cell proliferation (PCNA), the influence of curcumin as a photosensitizing agent associated with LED irradiation in APDT (antimicrobial photodynamic therapy) for the treatment of periodontitis experimentally induced in rats. Ninety-six animals were subjected to the induction of periodontitis by the installation of a cotton thread around the first molars, which was maintained for 7 days. The animals were randomly divided into 4 groups containing 24 animals each, which were given the following treatments: G1 (n = 24) - represented by animals which suffered no local treatment; G2 (n = 24) - irrigation solution of curcumin (40 μ M); G3 (n = 24) - irradiation with LED (Light Emitting diode); G4 (n = 24) - Curcumin irrigation solution (40 μ M) followed by irradiation with LED. Local treatments were carried out 7 days after the induction of periodontitis. The LED light, which was used in this study for the achievement of aPDT is a semiconductor emitter of indium gallium Nitride (InGaN), with a wavelength of 465 to 485nm and irradiance of 600mW / cm². LED irradiation was performed for 60 seconds in the vestibular face of lower left first molars. Treatment in G4 with LED was performed after 60 seconds of the irrigation with curcumin photosensitizer. The animals, in number of 8 for each group / time were euthanized at intervals of 7, 15 and 30 days after treatment. After euthanasia, specimens underwent immunohistochemical evaluation by immunostaining of PCNA. Data were subjected to statistical analysis with 5% significance level. The animals of G1 presented higher number of positive PCNA cells at 15 days, compared to the animals of G3 (p = 0.0097) and G4 (p = 0.0155). At 30 days, the animals of G1 presented higher number of PCNA positive cells compared to the G2. Given the results of this study and with the parameters used, it can be concluded that APDT using LED as a light source and

curcumin as photosensitizer, demonstrated to have positive action on cell proliferation in the furcation region of rats with induced periodontitis.

KEYWORDS: *Periodontitis. Photochemotherapy. Rats. Curcumin.*

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS .

Figura 1- Realização dos tratamentos locais	21
Figura 2- Fotossensibilizador curcumina Sigma	22
Figura 3- LED	23
Figura 4- Fotomicrográfica representativa dos grupos aos 15 dias	28
Figura 5- Fotomicrografia representativa dos grupos aos 30 dias	29
Tabela 1- Média e desvio padrão do número de células PCNA positivas em cada grupo e período.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPDT= Terapia fotodinâmica antimicrobiana

CUR= Curcumina

DP= Doença periodontal

EDTA= Ácido etilenodiaminotetracético

LED = Light- emitting diode

LLLT= Low-level laser therapy

PCNA= Antígeno nuclear de proliferação celular

PI= Periodontite induzida

RAR= Raspagem e alisamento radicular

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Objetivo	19
3 Material e Método	20
4 Resultados	26
5 Discussão	30
6 Conclusão	35
Referências	36
Anexo	40

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de caráter infeccioso e inflamatório, multifatorial, que resulta na destruição e degradação dos tecidos periodontais decorrentes da resposta e susceptibilidade do hospedeiro ao biofilme microbiano contendo bactérias patogênicas específicas (SCHENKEIN, 2006; ZHOU et al., 2012).

Com o amadurecimento gradual do biofilme dental ocorrem sucessões bacterianas que alteram o biofilme relacionado à saúde periodontal, que primeiramente é constituído por bactérias gram-positivas aeróbias, e torna-se um biofilme mais complexo, composto de bactérias gram-negativas anaeróbias (LÖE et al., 1965; SOCKRANSKY et al., 1998). Em Periodontia, esse processo marca a ruptura da simbiose do biofilme dental com a saúde, com o estabelecimento de um biofilme periodontopatogênico, culminando com o desenvolvimento das doenças periodontais (MARSH, 1994). O controle microbiológico do biofilme é, portanto, o foco da terapia periodontal no qual a cura da doença está intimamente relacionada.

A Raspagem e alisamento radicular (RAR) com instrumentos manuais é a terapia, não cirúrgica, mais efetiva no tratamento da doença periodontal (DP), (AINAMO et al., 1992; CATON et al., 2001), porém, a remoção mecânica torna-se dificultada em áreas de difícil acesso, como raízes com bi ou trifurcações, depressões radiculares ou até mesmo devido à dimensão da ponta ativa dos instrumentos periodontais.

Para o tratamento convencional da doença periodontal, utiliza-se a RAR combinada com antibióticos de ação sistêmica. Uma alternativa ao uso dos antibióticos sistêmicos seria a administração de agentes antimicrobianos diretamente na bolsa periodontal. (LONGO M, 2015).

Estudos recentes têm apresentado resultados satisfatórios com a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na periodontite induzida (PI) em animais (KOMERICK, 2003; SIGUSH et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; FERNANDES et al. 2009; LUAN et al. 2009; GUALBERTO JUNIOR, 2010; GARCIA et al., 2011; GARCIA et al., 2013; GARCIA et al., 2014).

Esta terapia é definida como uma reação fotoquímica, dependente de oxigênio na qual a ativação de um corante (fotossensibilizador) por uma luz de comprimento de onda ressonante ao espectro do fotossensibilizador, leva a geração de espécies de oxigênio reativo, como o oxigênio singlete ou radicais livres, tóxicos aos microorganismos (OCHSNER, 1997; MAISCH, 2007). O fotossensibilizador penetra no tecido epitelial e conjuntivo, e pode atingir microorganismos infiltrados pela barreira epitelial, reduzindo a patogenicidade das bactérias (LONGO, 2015).

Diferentes agentes fotossensibilizadores têm sido estudados, como o azul de metileno, azul de toluidina o verde de malaquita, fitalocianina dissulfonada, porfirinas, fenotiazinas, cianinas, acridinas, corantes fitoterápicos e as clorinas em diferentes concentrações, a fim de se avaliar os efeitos antimicrobianos da aPDT (RAMS e SLOTS, 1996; KOMERICK, 2003). Observa-se que os estudos apresentam resultados promissores do uso da aPDT na redução da viabilidade microbiana (KOMERICK et al., 2002) e principalmente na PI onde pode ser observado a ação da aPDT na redução do processo inflamatório (SIGUSH et al., 2005; QIN et al., 2008) e na redução da perda óssea (KOMERICK et al., 2003; ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; GARCIA et al., 2011; GARCIA et al., 2014). No entanto, observa-se que os agentes fotossensibilizadores utilizados nestes estudos foram o azul de toluidina e o azul de metileno e a luz foi o laser em baixa intensidade (LLLT).

A curcumina (CUR), que é um composto isolado da *Cúrcuma Longa* L, popularmente conhecida como açafrão, tem sido utilizada há séculos como medicamento, pigmento na dieta e como especiarias e possui uma variedade de indicações, incluindo tratamento de ferimentos, doenças hepáticas e como antimicrobiano (AGGARWAL, et al., 2007). A CUR provou não ter efeito tóxico em estudo em culturas de células e em animais. Ela tem um amplo pico de absorção na gama de 300-500nm (máximo 430nm) e exerce um potente efeito fototóxico em quantidade micro molar (HAUKVIK et al., 2010).

Um elevado número de investigações têm sugerido que a CUR, exibe potencial para aplicação terapêutica, face suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica (MARTINS et al., 2009) e anticancerígena (EPSTEIN et al., 2010). Alguns estudos também propuseram que esses efeitos podem, eventualmente, ser reforçados pela combinação de luz (BRUZELL et al., 2005; DUJIC et al., 2009), além disso, este produto tem uma grande vantagem econômica, considerando o seu baixo custo, simples manipulação e grande eficácia (ARAÚJO et al., 2012), o que atrai pesquisadores interessados em explorar a sua utilização em diversas áreas, incluindo fotoquímica e fotobiológica (DOVIGO et al., 2011).

Alguns estudos tem avaliado o efeito da aPDT utilizando a CUR como fotossensibilizador na redução de microrganismos bucais (DOVIGO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012). Araújo et al. (2012), observaram que ambas as concentrações da CUR utilizadas no estudo (0,75 e 1,5 g / L), associadas ao LED (Light- Emitting Diode) foram eficazes na redução *S. mutans* e *L. acidophilus* em culturas planctônicas. Dovigo et al (2011) observaram que a terapia fotodinâmica (PDT) utilizando CUR com LED, reduziu significativamente diferentes espécies de *Cândida* em próteses totais, demonstrando sua capacidade microbiológica. No

entanto, ainda são limitados os estudos que avaliaram o efeito da CUR na DP (GUIMARÃES et al., 2011) ou que tem utilizado a CUR como fotossensibilizador e luz LED como fonte de luz, na aPDT como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal.

Previamente a este estudo, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito da associação da CUR com LED no controle da perda óssea alveolar (FERRO-ALVES, 2013) e na redução de microrganismos patogênicos em áreas de furca na periodontite experimental em ratos (FERREIRA, 2014). Confirmou-se nestes estudos que todos os tratamentos foram efetivos no controle da PO na área de furca nos períodos de 15 e 30 dias, o que demonstrou a eficácia tanto das terapias isoladas (CUR ou LED), quanto das mesmas associadas (CUR e LED) nos períodos tardios, quando comparado aos animais que não receberam tratamento (FERRO-ALVES, 2013). Com relação ao efeito antimicrobiano foi constatado que tanto a CUR isolada como a PDT (CUR e LED) foram efetivas na redução de *Porphyromonas gingivalis* em áreas com periodontite experimental (FERREIRA, 2014).

Os eventos biológicos bioquímicos e moleculares que precedem ou regulam a mitose, até recentemente, eram pouco conhecidos, de maneira que as taxas de proliferação celular eram realizadas pela contagem de figuras mitóticas. Porém, a contagem só era possível na fase do ciclo celular correspondente à mitose. Com o resultado da utilização de várias técnicas e de genética molecular, observou-se o controle da proliferação celular por meio de mecanismos moduladores, genes regulatórios que parecem controlar a divisão celular (IRAZUSTA et al., 1994).

Essas descobertas permitiram que as células proliferantes pudessem ser detectadas mesmo sem a identificação de figuras mitóticas, através de métodos imunohistoquímicos com anticorpos específicos. Essas técnicas possibilitam a

demonstração de antígenos relacionados ao ciclo celular possibilitando sua orientação topográfica e arquitetural (IRAZUSTA et al., 1994).

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é uma proteína de 36kDa, auxiliar da DNA polimerase delta e sua expressão está relacionada com o estado proliferativo das células (IRAZUSTA, 1994), e com o reparo do DNA (ARISAWA, 1999). É muito utilizado devido à facilidade da técnica e por ser passível de ser utilizado em cortes parafinados (GARCIA et al., 1989).

A descoberta de inúmeras proteínas que desempenham papel fundamental na fase replicativa do DNA permite, através de sua detecção e contagem, uma estimativa da taxa de crescimento do tecido ou do caso de neoplasia (ARISAWA et al., 1999).

2. OBJETIVO

Avaliar do ponto vista imunoistoquímico por meio de imunomarcagem de PCNA, a influência da Curcumina como agente fotossensibilizador associada à irradiação com LED na aPDT, para o tratamento da periodontite experimentalmente induzida em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODO

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 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 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 I**).

Periodontite experimental induzida

Todos os animais foram submetidos à anestesia geral pela associação de ketamina (0,4 ml/Kg; ketamina Vetaset – Fort) e xilazina (0,2 ml/Kg; Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil) por injeção via intramuscular. O primeiro molar inferior do lado esquerdo de cada animal recebeu a indução da periodontite experimental (PE) 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 por sete dias. (GARCIA et al., 2014).

Grupos experimentais

Após 7 dias de evolução da PI a ligadura foi removida em todos os animais. A seguir os animais foram divididos em 4 grupos de 24 animais cada um que receberam os seguintes tratamentos: **G1** – os animais não receberam nenhum tratamento local; **G2** – irrigação com solução de CUR (40 μ M); **G3** – irradiação com LED; **G4** - irrigação com solução de CUR (40 μ M)) seguido da irradiação com LED. As soluções de CUR foram depositadas no interior da bolsa periodontal utilizando uma seringa e agulha para injeção de insulina (Figura 1).

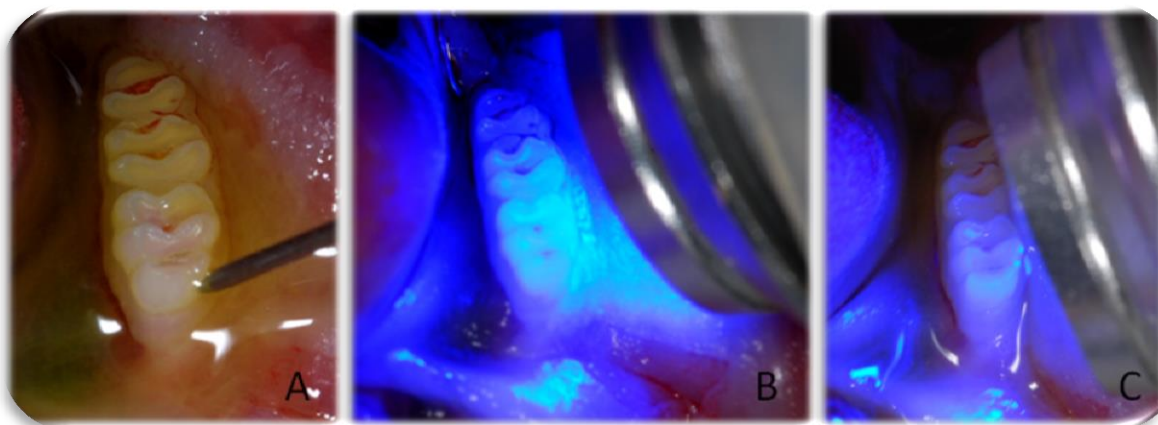


Figura 1. Realização dos tratamentos locais. (A) G2 - Irrigação com solução de Curcumina(40 μ M). (B) G3 - Irradiação com LED. (C) G4 - Irrigação com solução de Curcumina(40 μ M)) seguido da irradiação com LED (Kon-lux; 465 a 485 nm).

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 μ M) foi preparada em DMSO e em seguida diluída em solução salina obtendo a concentração testada (DOVIGO et al. 2011a; Figura 2). A solução de CUR foi depositada no interior da bolsa periodontal (ao redor do primeiro molar) utilizando uma seringa e agulha para injeção de insulina.



Figura 2. (A) Fotossensibilizador curcumina Sigma. (B) Pó da curcumina. (C) Preparo da solução da curcumina na concentração de 40 μ M.

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 a área sofreu irrigação com 1 ml de solução de CUR na concentração de 40 μ M (DOVIGO et al., 2011). Decorrido 60 segundos após permanência da droga no tecido foi realizada a irradiação com LED.

LED (Light- Emitting Diode)

O LED (Figura 3) que foi utilizado no presente estudo para realização da aPDT é um emissor semicondutor 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 G3 e G4 com o seguinte protocolo: irradiância de 600 mW/cm^2 , potência de 0,3 W com área de saída do feixe de $0,5 \text{ cm}^2$.

O LED foi aplicado 60 segundos após a aplicação da solução de CUR na face vestibular dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo, durante 60 segundos com densidade de energia de 18 J/cm^2 .



Figura 3. LED (Kon-lux, 600 mW/cm^2 , Kondortech Equipamentos Odontológicos Ltda., São Carlos, SP, Brasil).

Períodos experimentais

Oito animais de cada grupo experimental foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento da PI pela administração de dose letal de tiopental (150 mg/kg; Cristália, Produtos químicos farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil). As hemi-mandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formol tamponado a 4% por um período mínimo de 48 horas. As hemi-mandíbulas esquerdas foram dissecadas e fixadas em formaldeído 4% em solução tamponada de 0,1 M, durante 48 horas, para realização da análise imunoistoquímica.

Processamento Laboratorial

Os espécimes foram desmineralizados em ácido etilenoaminotetracético (EDTA) a 10% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) Cortes semi seriados (4 µm) foram obtidos no sentido mésio distal. Os cortes foram submetidos à técnica imunoistoquímica. Foi utilizada a técnica de imunoperoxidase indireta empregando-se o anticorpo primário anti- PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) (VP-P980, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). (LONGO, 2015). O protocolo utilizado seguiu o descrito por GARCIA et al. (2013).

Análise Imunoistoquímica

Um examinador treinado (TSB) selecionou uma secção histológica do biomarcador PCNA de cada espécime, e efetuou as análises imunoistoquímicas.

As imunomarcações foram visualizadas em microscópio óptico (modelo AxioStar plus-marca CARL ZEISS) com sistema de captura e de análise de imagem Axiovision (Auxílio Fapesp –Processo 2008/06218-0). A imunomarcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citosólico das células positivas. A imunomarcação para PCNA foi realizada pela contagem de células PCNA positivas localizadas no centro do septo interradicular do primeiro molar inferior esquerdo de uma área de 1000 μ m x 1000 μ m, com um aumento de 200x. As médias obtidas foram submetidas à análise estatística para comparação intra e intergrupo com nível de significância de 5%.

Análise Estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados do PCNA foram analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise dos dados do PCNA foi realizada pelo método não paramétrico de Kruskal Wallis, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0 (Bioestat, Sonopress Indústria Brasileira, Manaus, AM, Brasil). Para todos os testes, o nível de 5% de significância foi adotado.

4. RESULTADOS

Análise imunoistoquímica

A imunomarcção para PCNA foi predominantemente expressa em fibroblastos, e em células mesenquimais indiferenciadas precursoras de osteoblastos em atividades proliferativas no tecido conjuntivo e na região mais coronária do septo alveolar na região de furca. As células imunorreativas apresentaram coloração acastanhada confinada no compartimento citossólico.

Os dados estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais de todos os grupos no período de 7 dias ($p > 0,05$;). Os animais do G1 apresentaram maior número de células PCNA positivas aos 15 dias, comparado com os animais do G3 ($p = 0,0097$) e G4 ($p = 0,0155$; Figura 4). Aos 30 dias os animais do G1 apresentaram maior número de células PCNA positivas comparados com os animais do G2 ($p = 0,0017$; Figura 5).

Tabela 1. Média e desvio padrão ($M \pm DP$) do número de células PCNA positivas em cada grupo e período.

Períodos Grupos	7 dias	15 dias	30 dias
G1	225,5 $\pm$ 11,15	345 $\pm$ 83,21	305,66 $\pm$ 47,64
G2	330,4 $\pm$ 126,87	237,6 $\pm$ 125,09	73,4 $\pm$ 18,55*
G3	291 $\pm$ 88,52	119,8 $\pm$ 70,81*	121,4 $\pm$ 57,05
G4	348,2 $\pm$ 84,83	128,5 $\pm$ 64,27*	109,25 $\pm$ 16,74

*Diferença estatisticamente significativa com o G1 no mesmo período (Kruskal Wallis, teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$)

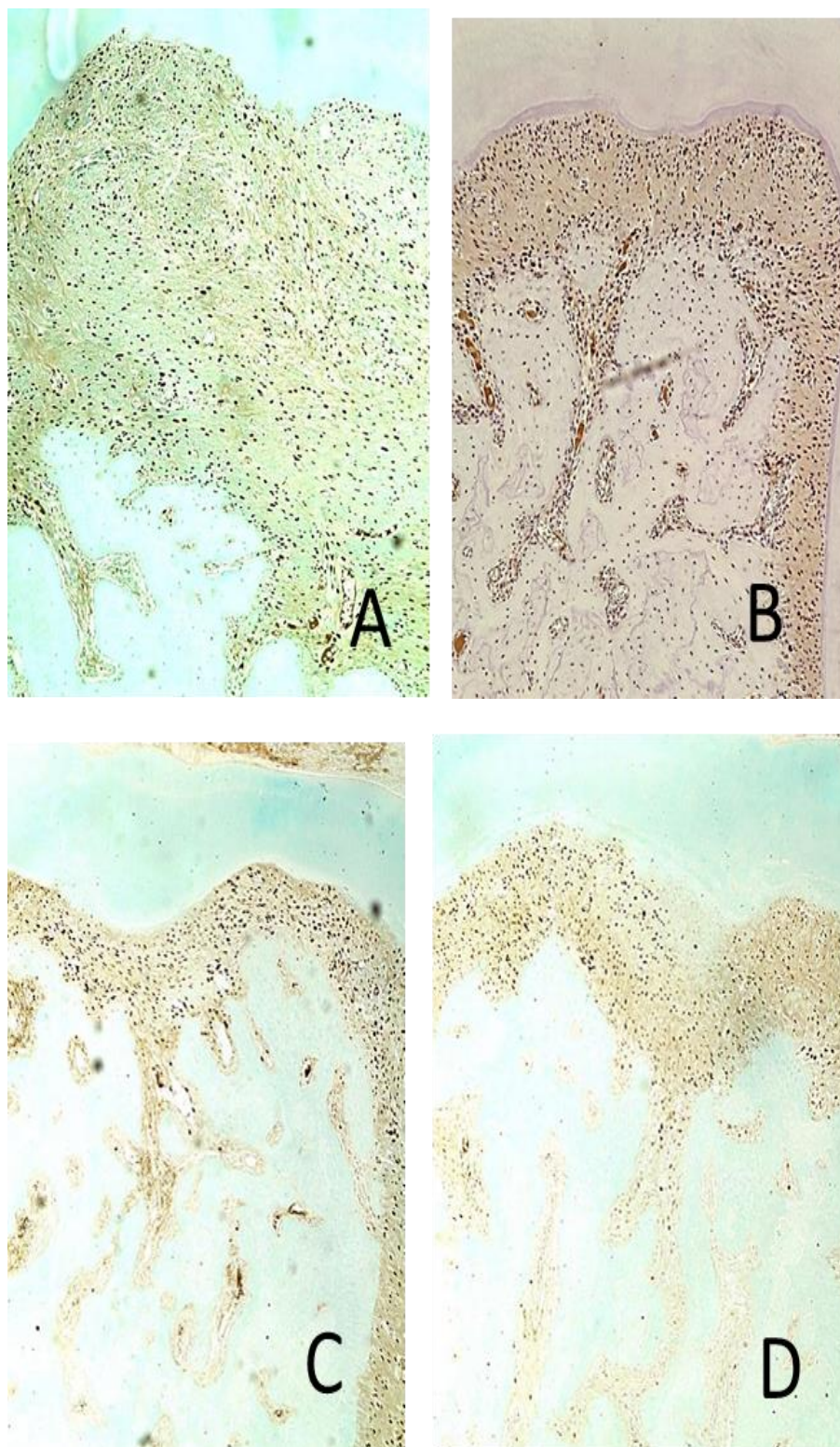


Figura 4. Fotomicrografia representativa dos grupos aos 15 dias. (A) G1; (B) G2; (C) G3, (D) G4. Coloração *fast green*. Aumento original de 100X.

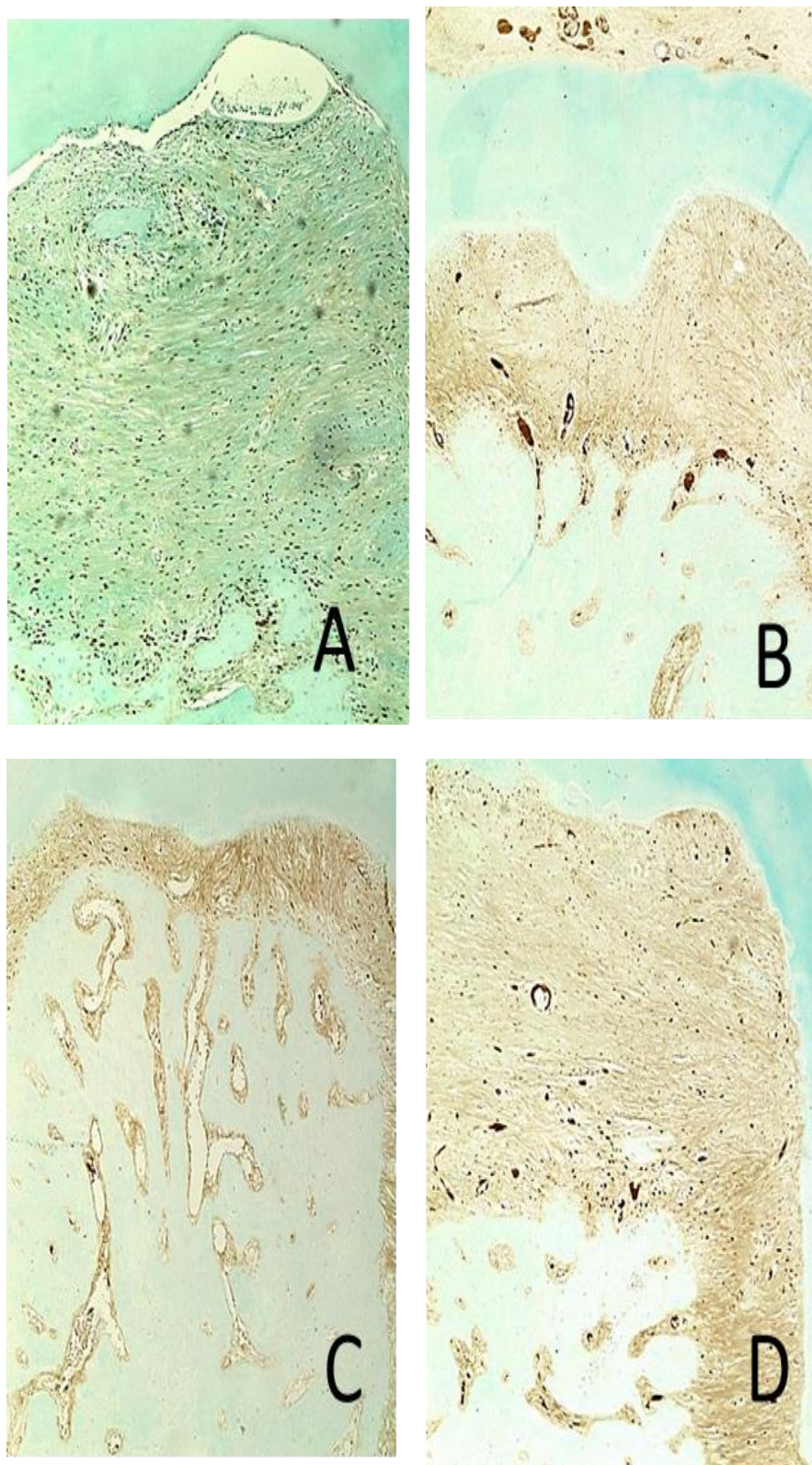


Figura 5. Fotomicrografia representativa dos grupos aos 30 dias. (A) G1; (B) G2; (C) G3, (D) G4. Coloração *fast green*. Aumento original de 100X.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, optou-se em avaliar a efetividade da associação de CUR enquanto substância fotossensibilizadora, na aPDT, 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), por meio da contagem de células PCNA positivas.

Com relação ao número de células PCNA positivas, o presente estudo demonstrou que no período inicial de 7 dias, não houve diferenças na quantidade de células PCNA positivas. Tais resultados são justificados pela atividade proliferativa celular estar ocorrendo em todos os grupos de forma similar neste período. Por outro lado, aos 15 dias houve menor número de células PCNA positiva nos animais dos grupos G3 e G4, quando comparados aos animais do G1. Este resultado pode ser justificado pelo fato dos espécimes dos animais do G3 e G4 estarem na fase de diferenciação celular, enquanto que os espécimes dos animais do G1, sem tratamento, apresentarem-se na fase de proliferação celular, demonstrando assim que o LED e a aPDT foram capazes de acelerar a fase de diferenciação celular.

A imunomarcagem para PCNA foi realizada para esclarecer os efeitos da terapia em fibroblastos e osteoblastos. O PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), é um marcador biológico capaz de fornecer informações sobre diferenciação, proliferação celular e também como um meio auxiliar de diagnóstico no caso de células tumorais. Trata-se de uma proteína nuclear ácida que varia durante o ciclo celular, e aumenta da fase G1 para a S do ciclo celular (Poosari *et al.*, 2015). Esta técnica é capaz de avaliar o número de células presentes no ciclo celular, mas dá informações quanto ao tempo em que cada célula completa o seu

ciclo celular. Sendo assim, não é possível determinar se o elevado número de células PCNA positivas é devido ao alto “*turnover*” ou se indica uma grande proporção de células dividindo-se em prolongado ciclo celular (ARISAWA et al., 1999).

ARISAWA et al. (1999) também descreveram que, segundo Mighell, 1995, o PCNA não é considerado um bom marcador de proliferação celular, para diagnóstico patológico, devido à influência de fatores que podem alterar o número de células PCNA positivas, como o tipo de fixador, o tempo de fixação, estado do espécime, devido ao fato da meia vida do PCNA ser longa, o núcleo de uma célula pode permanecer PCNA positivo, mesmo depois de cessado o estímulo de proliferação celular.

Com relação ao presente estudo todas as amostras foram processadas ao mesmo tempo, fixadas pelo mesmo tempo utilizando-se bons fixadores (formol tamponado a 4%), a fim de controlar e eliminar fatores que poderiam interferir negativamente na imunomarcagem do PCNA.

Em um estudo feito com ratas ovariectomizadas com PI realizado por GARCIA et al., em 2013, foram demonstradas taxas significativamente maiores de células PCNA positivas no ligamento periodontal em ratas tratadas com LLLT ou Terapia fotodinâmica (aPDT) em comparação com ratas tratadas apenas com RAR no período de 7 dias após o pós-tratamento. GARCIA et al., (2013) também relatam que esses resultados se devem a irradiação com laser que estimula a proliferação celular e a irradiação do laser pode estimular a diferenciação celular.

Longo (2015) observou que nos animais submetidos a quimioterapia o tratamento da PI com associação de RAR e LLLT promoveu aumento do número de células PCNA positivas aos 7 e 15 dias, demonstrando uma maior proliferação

celular, justificando o melhor reparo observado nos animais tratados com laser neste estudo.

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. Porém, não existe atualmente em Periodontia um consenso que mostre o benefício da aplicação de um protocolo de aPDT em detrimento do outro ou seu benefício real enquanto monoterapia ou terapia adjunta à RAR.

Estudos em animais observaram menor perda óssea em um grupo tratado com o protocolo de aplicação de aPDT utilizando laser (630-680 nm) e Azul de metileno ou Azul de toluidina aos 15 e 30 dias, tanto como terapia exclusiva (ALMEIDA et al., 2008a), quanto como terapia coadjuvante (ALMEIDA et al., 2008b).

Em 2011 GUIMARÃES et al. apresentaram resultados nos quais observaram o potencial anti-inflamatório da CUR administrada por gavagem em ratos, sugerindo o potencial terapêutico da mesma no tratamento da DP corroborando os resultados do presente estudo, quando se utilizou apenas a CUR nos períodos de 15 e 30 dias, os quais demonstraram significativa diminuição da PO, que pode estar correlacionada com a redução do processo inflamatório (GUIMARÃES et al., 2011).

Com relação à irradiação dos tecidos periodontais com LED um estudo demonstrou, na PI induzida experimentalmente em ratos, a eficácia do LED, emitindo na faixa do 600-700 nm, na redução da inflamação, proliferação fibroblástica e neoformação óssea (CHANG et al., 2012). Outro estudo com animais anêmicos demonstrou o potencial do LED (λ 700 $\pm$ 20 nm) emitindo com 10 J/cm²

como monoterapia no reparo, concluindo que esta irradiação ocasiona uma biomodulação positiva na proliferação de fibroblastos (OLIVEIRA-SAMPAIO et al., 2012). Estes resultados de estudos prévios podem justificar os resultados do presente estudo com relação à efetividade do tratamento apenas nos períodos mais tardios utilizando 18 J/cm², pois o LED pode ter promovido a redução do processo inflamatório e a biomodulação da reparação óssea, após o período agudo de infecção, apesar do comprimento de onda utilizado no presente estudo ter sido na faixa dos 465-485nm.

Os resultados de estudos prévios demonstraram ainda, que quando se utilizou o LED ou a CUR isoladamente, como monoterapia na PI no período de 7 dias, não houve benefícios no controle da PO. Por outro lado, no período de 7 dias houve menor PO nos animais tratados com aPDT, quando comparado aos animais que não receberam tratamento, demonstrando que a associação de CUR com irradiação com LED é efetiva no controle da DP (FERRO-ALVES, 2013). Esse resultado pode ser explicado pela ação antimicrobiana da aPDT que gera um efeito citotóxico sobre as bactérias, ocasionado pelo processo de fotoativação da CUR, que pode induzir a formação de radicais livres e oxigênio singlete, os quais são altamente citotóxicos para as bactérias (SOUKOS et al., 2011).

O tempo de contato da solução de CUR 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 *in vivo* e

clínicos em humanos que avaliem o tempo de pré-irradiação necessário para que se obtenha ação inibitória mínima da CUR no biofilme e que o protocolo seja viável para aplicação no tratamento da DP.

Diante destes fatos observa-se que é necessária a realização de outros estudos que avaliem o efeito da aPDT, utilizando a CUR como agente fotossensibilizador e LED como fonte de luz ativadora, coadjuvante à terapia mecânica de RAR.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados do presente estudo, e com os parâmetros utilizados, pode-se concluir que a aPDT utilizando o LED como fonte de luz e a CUR como fotossensibilizador demonstrou ter ação positiva na proliferação celular na região de furca de ratos com periodontite induzida.

REFERÊNCIAS

1. AGGARWAL BB; SUNDARAM C; MALANI N; ICHIKAWA H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*, v. 595, p. 1-75, 2007.
2. 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. 9, p. 723-729, 1992.
3. 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, p. 566-575, 2007.
4. 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.
5. ALMEIDA JM; THEODORO LH; BOSCO AF; NAGATA MJ; BONFANTE S; GARCIA VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*, v. 79, p. 2156-2165, 2008b.
6. ARAÚJO NC; FONTANA C; GERBI ME; BAGNATO VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg.*, v. 30, n. 2, p. 96-101, 2012.
7. ARISAWA EAL; MORAES E; ROCHA RF; ALMEIDA JD. PCNA and Ki-67 cell-cycle makers: A brief review. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos*, v.2, n.1, p. 54-60, jan./jun., 1999.
8. 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.
9. DARVEAU RP. The ora/l microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol.* Aug; v. 28 n. 8 p. 389-95, 2009.

- 10.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. 927-34, 2011.
- 15.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. *J. Cancer*: v.124, p.1422–1428 , 2009.
- 16.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, p. 824-32, 2010.
- 17.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, p. 219-228, 2009.
- 18.FERREIRA RP. Efeito de curcumina no tratamento da periodontite induzida em ratos: Análise microbiológica. 39f. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.
- 19.FERRO-ALVES M. Efeito fotodinâmico da curcumina no tratamento da periodontite induzida em ratos: Estudo histométrico. 2013. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.
- 20.GARCIA RL; COLTRERA MD; GOWL AM. Analysis of proliferative grade using PCNA / cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues- comparison with flow- cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, v. 134, p. 733-9, 1989
- 21.GARCIA VG; GUALBERTO JÚNIOR EC; FERNANDES LA; BOSCO AF; HITOMI NAGATA MJ; CASATTI CA; ERVOLINO E; THEODORO LH. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*. 2013 Apr; v. 84 n. 4 p. 556-65, 2013.

22. GARCIA VG; FERNANDES LA; MACARINI VC; ALMEIDAJM; MARTINS TM; BOSCO AF; NAGATA MJ; 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.
23. 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, Issue 5, p 584–594, 2014.
24. GUIMARÃES MR; COIMBRA LS; DE AQUINO S; SPOLIDORIO LC; KIRKWOOD KL; ROSSA CJR. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodont Res*, v. 46, p. 269–279, 2011.
25. HAUKVIK T; BRUZELL E; KRISTENSEN S; TØNNESEN HH. Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids, XLI. Pharmazie*, v. 65, p. 600-6, 2010.
26. IRAZUSTA SP. Estudo da proliferação celular pelo anticorpo anti-PCNA e técnica AgNOR em biopsias ensoscópicas da mucosa gástrica. Faculdade de Ciências Médicas – FCM. UNICAMP: Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, Tese (doutorado), 1994.
27. 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, p. 86-92, 2002.
28. KÖMERIK N; NAKANISH JH; MACROBERT AJ; HENDERSON B; SPEIGHT P; WILSON M. In Vivo Killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue-Mediated Photosensitization in an Animal Model. v. 47, p. 932-940, 2003.
29. LÖE H; THEILADE E; JENSEN SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. v. 36, p. 177-87, 1965.
30. LONGO, M. 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, imunológico e microbiológico. 2015.

- 178 f. Tese (Doutorado em Periodontia), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.
31. LUAN XL; QIN YL; BI LJ; HU C; ZHANG ZG; LIN J; ZHOU CN. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers in Medical Science* v. 24, ed. 2, p. 162-166, 2009.
 32. MAISCH T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*, v. 22, p. 83-91, 2007.
 33. MARSH PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. v. 8, p.263–271, 1994.
 34. OCHSNER MJ. *Photochem. Photobiol.*, B39, 1. PCNA1997.
 35. POOSARLA C; MAYA R; RAMESH K.; SWETHA G; SEKAR B; MURALI S. Proliferating Cell Nuclear Antigen in Premalignancy and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. V.9 p. 39-41, 2015.
 36. RAMS TE; SLOTS J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol* 2000, v. 10, p. 139-159, 1996.
 37. SCHENKEIN HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 40, p. 77-93, 2006.
 38. 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.
 39. SOUKOS NS; GOODSON JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* . V.55, p.143-66, 2011.
 40. ZHOU TE; DONG C; QING LI; XIAOJU S; YALING S; CHANGNING W. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontologica Scandinavica*. V. 71, ed. 2, p. 349-356, 2013.

ANEXO I - 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 "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. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Rua Cônis Petroni, 793 CEP 16090-680 Aracatuba - SP
Tel (18) 3626-1440 Fax (18) 3635-1403 E-mail: tubiano.erdelli@unesp.br