

MÁRCIO LUIZ FERRO-ALVES

**Efeito fotodinâmico da curcumina no tratamento da periodontite
induzida em ratos: Estudo histométrico.**

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

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lucia Mazza Marçal Sundefeld

ARAÇATUBA – SP

2013

DEDICATÓRIA

A minha família, minha mãe, **SILVIA ROSA FERRO ALVES**, meu pai, **APARECIDO ALVES**, e meu irmão, **OTÁVIO LUIS FERRO ALVES**, pessoas sem as quais eu não teria obtido minha formação como profissional. Meus amáveis e eternos, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer à vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. **Leticia Helena Theodoro**, minha orientadora no sentido mais amplo da palavra, responsável no tempo de convivência pelo meu crescimento científico e intelectual, além da amizade e exemplo de caráter, demonstrados sempre em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a **Maria Lucia Mazza Marçal Sundfeld**, pela atenção e apoio durante o processo de definição e orientação, no meu amadurecimento pessoal, e no enriquecimento da convivência.

À Doutoranda **Mariéllen Longo**, pela orientação, pela amizade e pelo esforço mútuo para conclusão deste trabalho.

À banca examinadora, Prof^a Dr^a **Leticia Helena Theodoro**, Prof^o Dr. **Juliano Milanezi ALMEIDA** e a Doutoranda **Mariéllen Longo**, pela disponibilidade em avaliar este trabalho, colaborando nobremente para seu 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 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**).

Agradeço 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 **Aparecido e Silvia**, que primeiramente me tornaram possível estar aqui, que inseriram em mim o anseio pelo saber, que me conduziram sempre para o melhor, que forneceram os alicerces para uma vida sólida e repleta de realizações

À meu irmão **Otávio**, meu melhor amigo, que sempre me apoiou em todos os momentos difíceis, que sempre esteve ao meu lado sem falhar, que dividiu comigo uma história, e constrói a cada dia mais ao meu lado algo que não poderia ser descrito com palavras.

À minha companheira **Fernanda**, pessoa fundamental em minha vida, que compartilhou comigo os momentos decisivos desta trajetória, sempre me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis, que ajuda a me tornar cada dia uma pessoa melhor.

À meus sogros, **João e Rosângela**, que me acolheram como a um filho em Araçatuba, e me forneceram suporte de verdadeiros pais na distância dos meus.

Aos meus amigos **Ana Paula, Gestter, Guilherme, Luiz Henrique e Samuel**, além de companheiros de sala, companheiros para toda a vida, lhes trago amor de irmão, e deixo claro que contem comigo da mesma maneira que contei com vocês durante os maravilhosos seis anos que tivemos juntos.

À meus companheiros cotidianos, **Adriano, André, Alexandre, Bruno, Felipe, Gabriel, Jesse, João Rodolpho, Leonardo, Lucas, Luiz Henrique, Murilo, Paulo, Renato, Thiago e Willian**, que além de dividirem contas formaram minha família em Araçatuba em algum momento desses seis anos.

Ao Diretório Acadêmico Professor Carlos Aldrovandi – **DACA**, pelas amizades, e pelo aprendizado proporcionado ao longo dos últimos anos.

EPIGRAFE

“Veni, vidi, vici.”

Caio Julio Cesar, Líder militar e Cônsul romano.

FERRO-ALVES, ML. Efeito fotodinâmico da curcumina no tratamento da periodontite induzida em ratos: Estudo histométrico. 2013. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar do ponto vista histométrico a influência da Curcumina como agente fotossensibilizador associada a 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 (40µM); G3 (n=24) – irradiação com LED (Light emitting diode); 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, que foi utilizado no presente estudo para a realização da aPDT, é um emissor semiconductor de Nitridio de Índio e Gálio (InGaN), 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 ao processamento histológico e corados com a técnica da hematoxilina e eosina. Foi realizada a avaliação histométrica da PO na região de furca dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo. Os dados da perda óssea foram submetidos a análise estatística com nível de significância de 5% (Anova e Teste Tukey). Na análise observou-se que houve maior perda óssea alveolar na região da furca no G1 aos 15 (2,05 ±0,17) e aos 30 dias (1,81 ±0,64), quando comparados aos animais dos grupos G2 (0,55 ±0,21; 0,82 ±0,39), G3 (1,14 ±0,39; 0,67 ±0,52) e G4 (0,97 ±0,58; 0,66 ±0,29) respectivamente (p<0,01). Aos 7 dias houve menor perda óssea alveolar apenas nos animais do G4 (0,8 ±0,62) quando comparado aos do G1 (1,49 ±0,71) (p<0,01). 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 parece ser um tratamento promissor para o controle da PO alveolar na periodontite induzida experimentalmente em ratos.

FERRO - ALVES , ML . Curcumin photodynamic effect in the treatment of induced periodontitis in rats: a histometric study . In 2013 . 30 f . Completion of course work - Faculty of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013 .

Abstract

The objective of this study was to evaluate the viewpoint histometric the influence of curcumin as a photosensitizing agent associated with LED in irradiating APDT (antimicrobial photodynamic therapy) 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: G1 (n = 24) - represented by animals suffered no local treatment G2 (n = 24) - irrigation solution curcumin (40 μ M) , G3 (n = 24) - irradiation with LED (Light emitting diode) , G4 (n = 24) - irrigation with a solution of curcumin (40 μ M) followed by irradiation with LED. Local treatments were carried out 7 days after the induction of periodontitis. The LED, which was used in this study to achieve the APDT is a semiconductor emitter of indium gallium nitridium (InGaN) with a wavelength of 465 to 485nm and irradiance of 600mW/cm². The LED irradiation was performed for 60 seconds in the buccal surface of the first lower molar on the left. Treatment with the LED G4 was performed after 60 seconds of irrigation with the photosensitizer curcumin . The animals, eight in number for each group / time were sacrificed at intervals of 7, 15 and 30 days after treatment. After euthanasia, the specimens were histologically processed and stained with hematoxylin and eosin technique. We assessed the OPs Histometry in the furcation area of the first molar on the left side. The data of bone loss were analyzed statistically with a significance level of 5% (ANOVA and Tukey test). The comparative analysis of the measures between the treatments, it was observed that there was a greater alveolar bone loss in the furcation in G1 at 15 (2.05 \pm 0.17) and 30 days (1.81 \pm 0.64), when compared to groups G2 (0.55 \pm 0.21, 0.82 \pm 0.39) , G3 (1.14 \pm 0.39 , 0.67 \pm 0.52) and G4 (0.97 \pm 0,58, 0.66 \pm 0.29), respectively (p < 0.01). At 7 days was lower alveolar bone loss only in the G4 animals (0.8 \pm 0.62) when compared to G1 (1.49 \pm 0.71) (p < 0.01). From the results of this study and the parameters used, it can be concluded that the APDT using the LED as the light source and photosensitizer as curcumin seems to be a promising treatment for the control of alveolar PO experimentally induced periodontitis in rats.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Cirurgia da indução da periodontite. | 14 |
| Figura 2 | Realização dos procedimentos operatórios definitivos. | 15 |
| Figura 3 | Curcumina. | 16 |
| Figura 4 | LED. | 16 |
| Figura 5 | Obtenção de Imagem e Medição. | 18 |
| Figura 6 | Fotomicrografia representativa do Grupo G1. | 19 |
| Figura 7 | Fotomicrografia representativa do Grupo G2. | 20 |
| Figura 8 | Fotomicrografia representativa do Grupo G3 | 20 |
| Figura 9 | Fotomicrografia representativa do Grupo G4 | 21 |
| Figura 10 | Tabela de Médias e Desvios-padrão. | 21 |

SUMÁRIO

| | |
|----------------------|----|
| 1 Introdução | 10 |
| 2 Objetivos | 13 |
| 3 Material e Métodos | 14 |
| 4 Resultados | 19 |
| 5 Discussão | 22 |
| 6 Conclusão | 25 |
| Referências | 26 |
| Anexos | 30 |

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória que resulta na destruição e degradação dos tecidos periodontais. A inflamação e destruição dos tecidos periodontais são largamente considerados como resultado da resposta da susceptibilidade do hospedeiro ao biofilme microbiano contendo bactérias patogênicas (SCHENKEIN, 2006).

A disbiose do biofilme dental, ou seja, a alteração da ecologia microbiana relacionada à saúde pode levar a quadros clínicos de doenças periodontais (DARVEAU, 2009). 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). Em Periodontia, esse processo marca a ruptura da simbiose do biofilme dental com a saúde tecidual frente ao novo desafio marcado pelo 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.

Clinicamente há evidências de que a Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) com instrumentos manuais é a terapia mais efetiva no tratamento da doença periodontal (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.

Estudos recentes têm apresentado resultados satisfatórios com a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na periodontite experimental induzida em animais (KOMERIH, 2003; SIGUSH et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007; YAMADA 2007 ALMEIDA et al., 2008; FERNANDES et al. 2009; LUAN et al. 2009; GUALBERTO JUNIOR, 2010; GARCIA et al., 2011). Esta terapia é definida como uma reação fotoquímica, oxigênio-dependente 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, que são tóxicos aos microorganismos (OCHSNER 1997; OCHSNER et al., 1997; MAISCH, 2007).

Os efeitos antimicrobianos da aPDT têm sido estudados utilizando diferentes agentes fotossensibilizadores como o azul de metileno, azul de toluidina O, verde de malaquita, fitalocianina disulfonada, porfirinas, fenotiazinas, cianinas, acridinas, corantes fitoterápicos e as clorinas em diferentes concentrações (RAMS e SLOTS, 1996; KOMERICK, 2003).

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 doença periodontal experimentalmente induzida 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). 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 de laser de baixa potência.

A curcumina, que é um composto isolado da *Curcuma Longa L.*, tem sido utilizado à 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 curcumina provou não ter efeito tóxico em estudo em culturas de células e em animais tem um amplo pico de absorção na gama de 300-500nm (máximo 430nm) e exerce um potente efeito fototóxico em quantidade micromolar (HAUKVIK et al., 2010). Um elevado número de investigações têm sugerido que a curcumina 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 fotobiologia (DOVIGO et al., 2011).

Existem alguns estudos que vem avaliando os efeitos da aPDT (Terapia fotodinâmica) utilizando a curcumina como composto fotossensível para a redução de microrganismos bucais (DOVIGO et al., 2011; ARAÚJO et al. 2012) . No entanto, ainda são limitados os estudos que avaliaram o efeito da curcumina na doença periodontal (GUIMARÃES et al., 2011) ou que tem utilizado a curcumina como fotossensibilizador e luz LED (Light- Emitting

Diode) como fonte de luz, na aPDT (Terapia fotodinamica) como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal.

2 OBJETIVO

Avaliar do ponto vista histométrico a influência da curcumina como agente fotossensibilizador na aPDT, utilizada para o tratamento da periodontite induzida em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

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).

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).

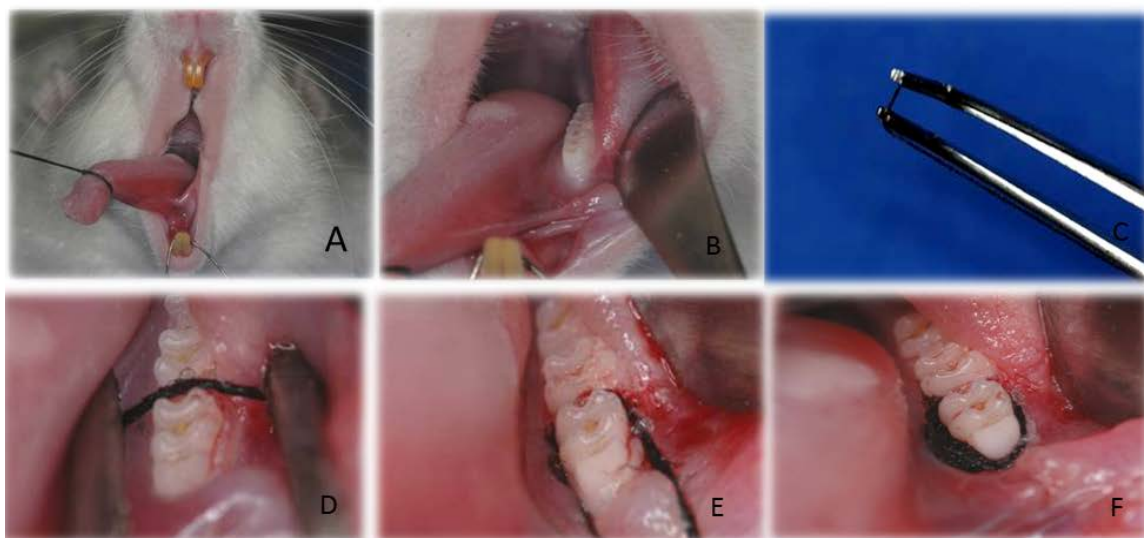


Figura 1. Técnica da indução da periodontite. (A) Posicionamento do animal na mesa cirúrgica; (B) Acesso ao primeiro molar inferior onde será induzida a doença periodontal; (C) Pinça modificada usada para adaptação do fio de algodão em torno do primeiro molar inferior esquerdo; (D) Adaptação do fio de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

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 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 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).

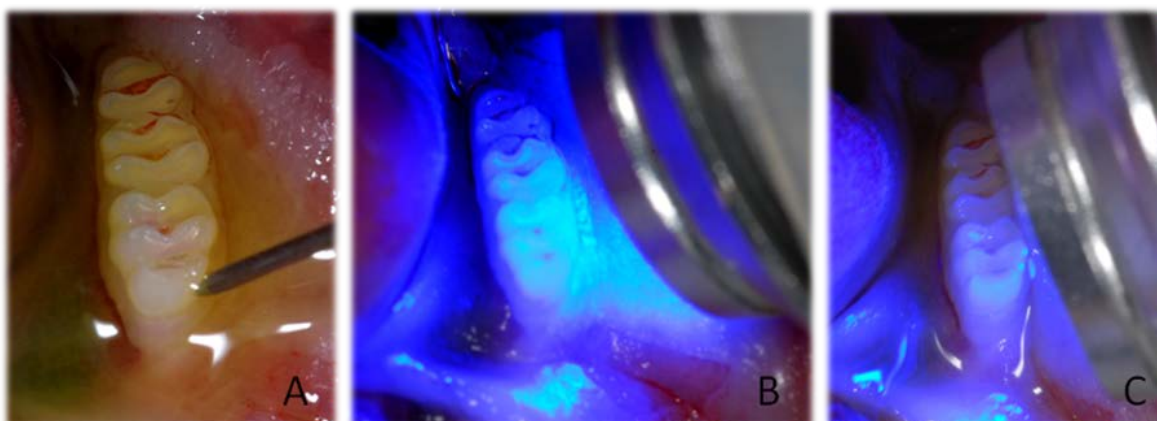


Figura 2. Realização dos tratamentos locais. (A) G2 - Irrigação com solução de Curcumina(40 μ M). (B) G3 - Irradiação com LED. (C) G4 - Irrigação com solução de Curcumina(40 μ M) seguido da irradiação com LED (Kon-lux; 465 a 485 nm).

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). A solução de curcumina foi depositada no interior da bolsa periodontal (ao redor do primeiro molar) utilizando uma seringa e agulha para injeção de insulina. Os animais foram separados

aleatoriamente em grupos (para os tratamentos locais) 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).

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 curcumina (Figura 3) na concentração de 40 μ 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 μ M.

LED (Light- Emitting Diode)

O LED (Figura 4) que foi utilizado no presente estudo para realização da aPDT é um emissor semiconductor de Nítrido 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/cm², potência de 0,3 W com área de saída do feixe de 0,5 cm².



Figura 4. LED (Kon-lux, 600 mW/cm², Kondortech Equip. Odontológicos Ltda., São Carlos, SP, Brasil)

O LED foi aplicado 60 segundos após a aplicação da solução de Curcumina na face vestibular dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo, durante 60 segundos com fluência de 18 J/cm².

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 formol tamponado a 4% por um período mínimo de 48 horas.

Processamento Laboratorial

Os espécimes foram desmineralizados em uma solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18% por 6 a 8 semanas. Após inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados de 4 µm foram obtidos no sentido mesio-distal e corados com hematoxilina e eosina (HE).

Análise Histométrica

A análise histométrica do presente estudo foi realizada utilizando um microscópio óptico modelo **Axiostar Plus** (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha) acoplado a uma câmera **AxioVision** (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha). Após exclusão da primeira e da última seção na qual a região de furca esteve evidente, cinco seções equidistantes de cada dente foram selecionadas para análise histométrica. A seleção das seções histológicas e histométricas foram realizadas por um examinador treinado e cego ao experimento (ML). A área (mm²) da perda óssea na região da furca foi histometricamente determinada pela área compreendida entre a crista óssea e a superfície do cimento (NOCITI et al., 2000). A área foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha; Figura 5). Um examinador cego ao experimento e calibrado realizou a análise

histométrica. Os dados da PO de cada espécime foram medidos três vezes pelo mesmo examinador (MLFA), em dias diferentes (ALMEIDA et al., 2007) e os valores médios para cada espécime foram obtidos e comparados estatisticamente.

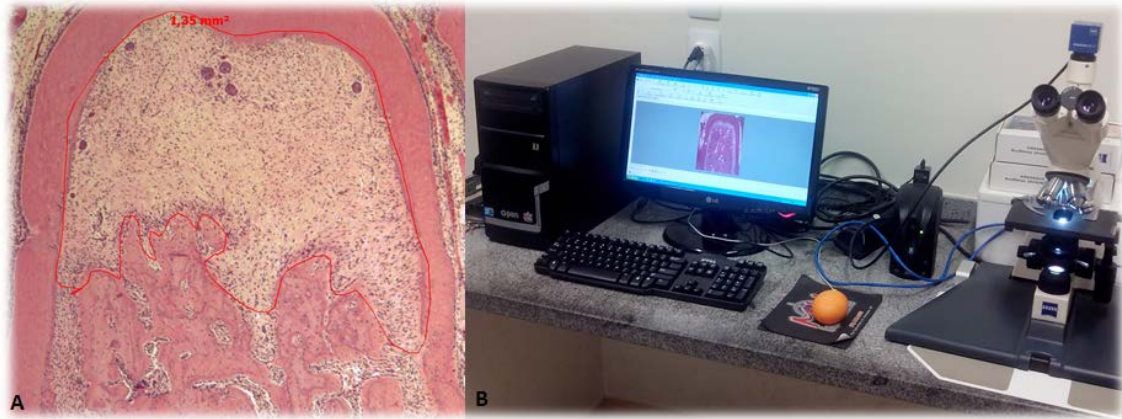


Figura 5. (A) Lamina histologica com medida de area de PO em mm². (B) Equipamento sendo utilizado para obtenção de imagem e posterior medida.

Análise Estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk e os mesmos submetidos a Análise de Variância (ANOVA), tendo sua significância verificada posteriormente pelo teste de Tukey, utilizando um software (Bioestat 5.0, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, AM, Brasil). Para todos os testes, o nível de 5% de significância foi adotado.

4 RESULTADOS

Análise histométrica

Aos 7 dias após o tratamento houve menor PO apenas nos animais do G4 ($0,8 \pm 0,62$) quando comparados aos do G1 ($1,49 \pm 0,71$) ($p < 0,01$; Figura 6), enquanto que não houve diferença significativa quando comparou-se a PO do G2 e G3 com o G1. Na análise comparativa das medidas de PO entre os tratamentos, observou-se que houve maior PO nos animais do G1 aos 15 ($2,05 \pm 0,17$) e aos 30 dias ($1,81 \pm 0,64$), quando comparados aos animais dos grupos G2 ($0,55 \pm 0,21$; $0,82 \pm 0,39$; Figura 7), G3 ($1,14 \pm 0,39$; $0,67 \pm 0,52$; Figura 8) e G4 ($0,97 \pm 0,58$; $0,66 \pm 0,29$; Figura 9) respectivamente, nos mesmos períodos de avaliação ($p < 0,01$). Os resultados da avaliação intragrupo deste estudo não demonstraram diferença entre os diferentes períodos para os mesmos tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 10).

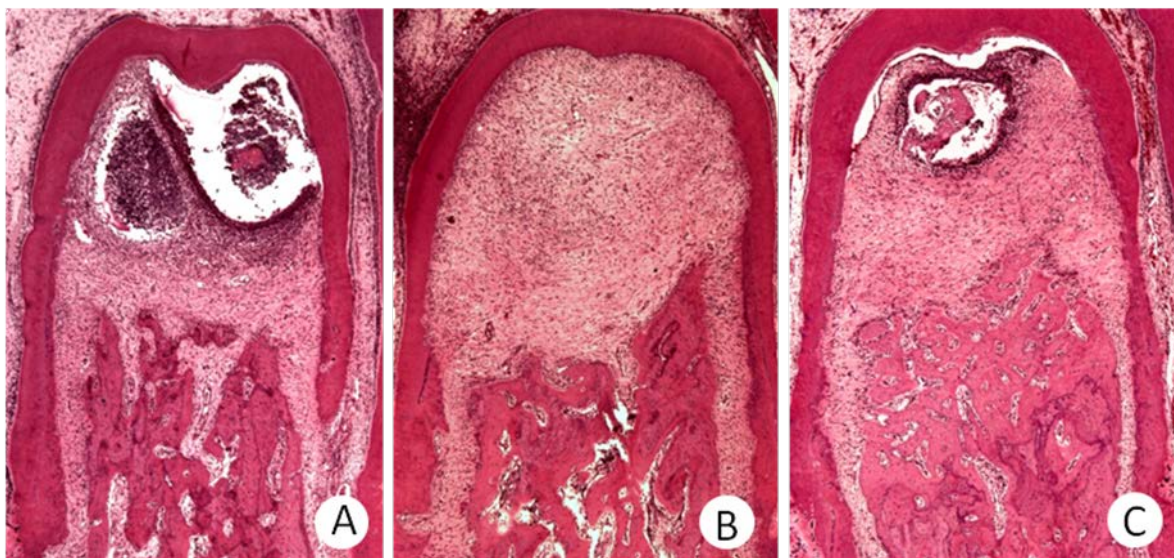


Figura 6: Fotomicrografia representativa do Grupo G1, Representados por animais que não sofreram nenhum tratamento local, aos 7, 15 e 30 dias respectivamente. Coloração H&E. Aumento Original de 5X.

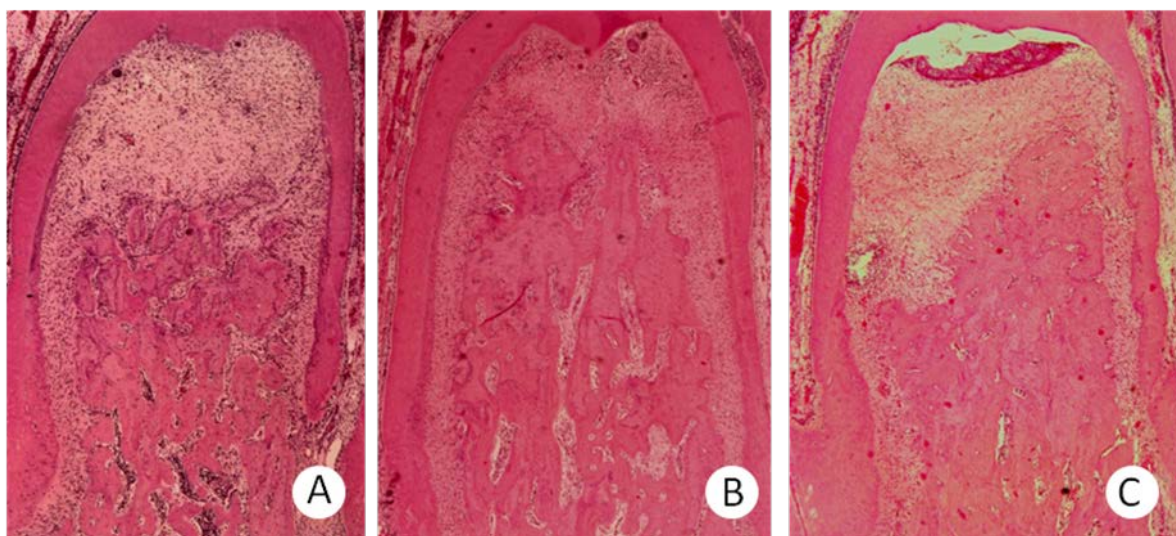


Figura 7: Fotomicrografia representativa do Grupo G2, irrigação com solução da curcumina (40 μ M), aos 7, 15 e 30 dias respectivamente. Coloração H&E. Aumento Original de 5X.

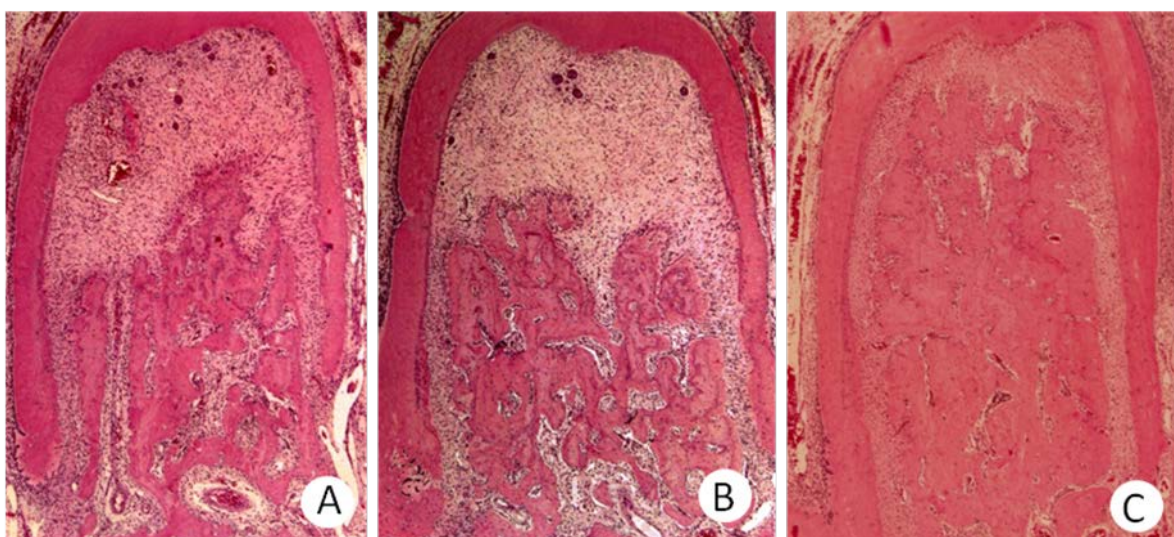


Figura 8: Fotomicrografia representativa do Grupo G3, irradiação com LED, aos 7, 15 e 30 dias respectivamente. Coloração H&E. Aumento Original de 5X.

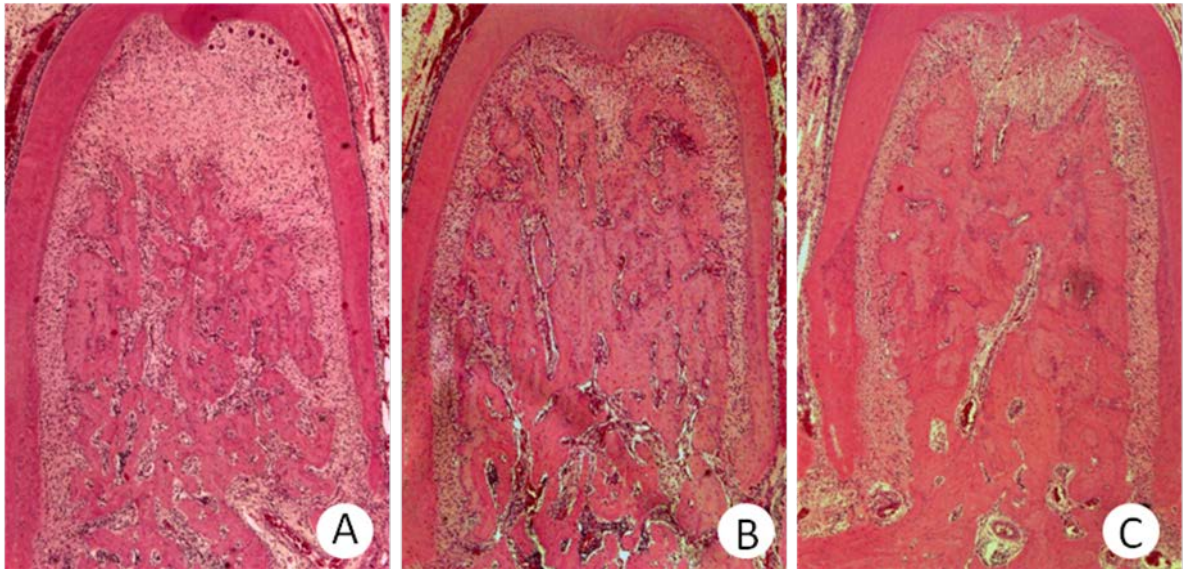


Figura 9: Fotomicrografia representativa do Grupo G4, irrigação com solução da curcumina (40 μ M) seguida da irradiação com LED aos 7, 15 e 30 dias respectivamente. Coloração H&E. Aumento Original de 5X.

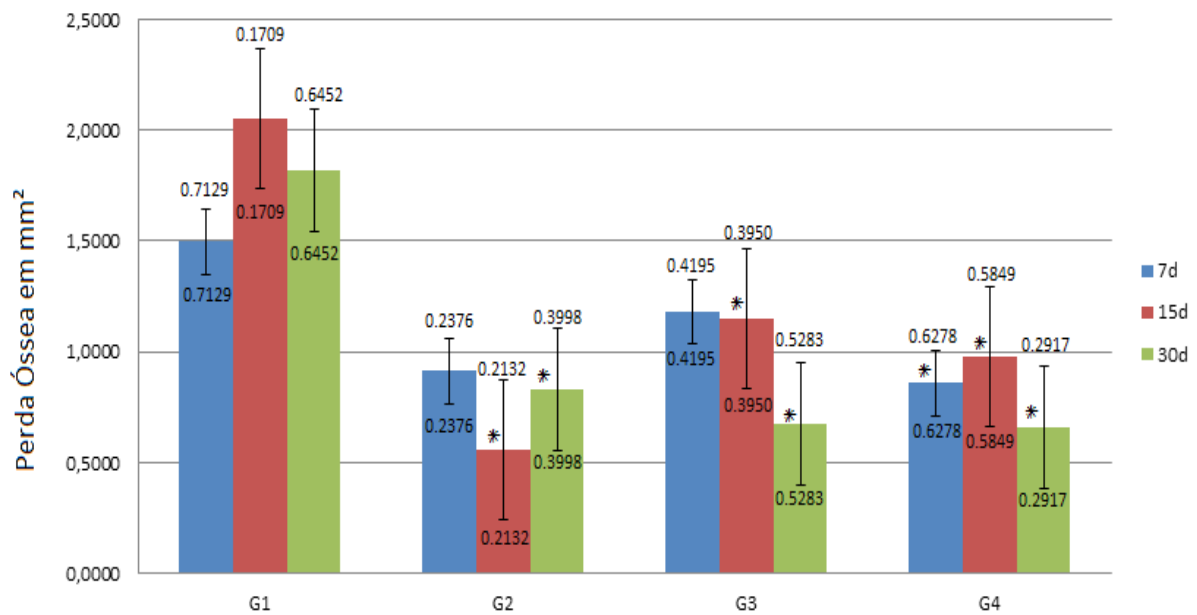


Figura 10. Médias e Desvios Padrão de PO em mm² após 7, 15 e 30 dias em animais com periodontite induzida experimentalmente. *Diferença estatisticamente significativa comparado ao G1 no mesmo período (p<0,05).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, optou-se em avaliar a efetividade da associação de Curcumina 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).

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. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de um novo protocolo de aPDT, usando-se a Curcumina como fotossensibilizador e LED como fonte de luz, e suas implicações no controle da periodontite experimental em ratos.

Confirmou-se neste estudo 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 (Curcumina ou LED), quanto das mesmas associadas (Curcumina e LED) nos períodos tardios, quando comparado aos animais que não receberam tratamento.

Outros estudos em animais observaram também 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 Curcumina administrada por gavagem em ratos, sugerindo o potencial terapêutico da mesma no tratamento da doença periodontal, corroborando os resultados do presente estudo, quando utilizou-se apenas a Curcumina nos períodos de 15 e 30 dias, os quais demonstraram significativa diminuição da PO, que pode estar correlacionada com a redução do processo inflamatório.

Com relação à irradiação dos tecidos periodontais com LED um estudo demonstrou, na doença periodontal 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 do presente estudo demonstraram ainda, que quando utilizou-se o LED ou a Curcumina isoladamente, como monoterapias na doença periodontal experimental no período de 7 dias, não houve benefícios no controle da PO. Estes resultados sugerem que nos períodos iniciais a PO pode estar relacionada mais com o controle do biofilme bacteriano, o que provavelmente não deve ter ocorrido nestas modalidades de tratamento. 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 Curcumina com irradiação com LED é efetiva no controle da doença periodontal. Esse resultado pode ser explicado pela ação antimicrobiana da aPDT que gera um efeito citotóxico sobre as bactérias, ocasionado pelo processo de fotoativação da Curcumina, que pode induzir a formação de radicais livres e oxigênio singlete, os quais são altamente citotóxicos para as bactérias (SOUKOS et al., 2009).

Corroborando os achados do presente estudo CARVALHO et al. (2011), utilizando a associação de Eosina com LED (440-480 nm), com densidade de potência de 0,69 W/cm² durante 60 segundos, demonstraram redução da PO alveolar e imunomodulação da resposta inflamatória, constatada pelos autores na redução do número de neutrófilos. Por outro lado, como no presente estudo o LED utilizado isoladamente não foi capaz de reduzir significativamente a PO alveolar, quando utilizado como tratamento coadjuvante.

Com relação à concentração da Curcumina, estudo recente demonstrou o efetivo controle de espécies de *Candida* in vitro, através da aPDT utilizando a mesma concentração de Curcumina como fotosensibilizador do presente estudo, ativado por LED emitindo na faixa de 440-460 nm(DOVIGO et al., 2011). Com relação a 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 in vivo e clínicos 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 doença periodontal.

Os resultados da avaliação intragrupo deste estudo sugeriram que não há diferença entre os diferentes períodos para os mesmos tratamentos, indicando a presença de doença em todos os períodos. Já nos grupos de tratamento a ausência de diferença estatística significativa, entre os tratamentos pode estar relacionada a uma menor efetividade destes tratamentos como monoterapia, uma vez que os animais não receberam o tratamento de remoção mecânica do biofilme dentário previamente aos tratamentos propostos.

Diante destes fatos observa-se que é necessário a realização de outros estudos que avaliem o efeito da aPDT, utilizando a Curcumina como agente fotossensibilizador e LED como fonte de luz ativadora, adjuvante à terapia mecânica de raspagem e alisamento radicular.

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 Curcumina como fotossensibilizador, parece ser um tratamento promissor para o controle da PO alveolar na periodontite induzida experimentalmente em ratos.

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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, p. 1422-1428, 2009.
9. BUDUNELI E, VARDAR-SENGÜL S, BUDUNELI N, ATILLA G, WAHLGREN J, SORSA, T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol*, v. 78, p. 127-134, 2007.
10. CARVALHO AS, NAPIMOGA MH, COELHO-CAMPOS J, SILVA-FILHO VJ, THEDEI G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg. Nov*; v. 29, n. 11, p. 735-40, 2011.

11. CATON JG, CIANCIO SG, BLIEDEN TM. Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planning: post-treatment effects. *J Clin Periodontol.*, v. 28, n. 8, p. 782- 789, 2001.
12. DARVEAU RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol.* Aug; v. 28 n. 8 p. 389-95, 2009.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. GARCIA VG, FERNANDES LA, MACARINI VC, ALMEIDA JM, 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.
18. GUALBERTO-JÚNIOR E.C. Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal de ratas ovariectomizadas, com ou sem reposição hormonal: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Araçatuba, , 161f, 2010.
19. GUIMARÃES MR, COIMBRA LS, DE AQUINO SG, 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.
20. GUIMARÃES MR, DE AQUINO SG, COIMBRA LS, SPOLIDORIO LC, KIRKWOOD KL, ROSSA CJr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun.*, v. 18, n. 1, p. 155-63, 2012.

21. 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.
22. 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.
23. 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, p. 932-940, 2003.
24. LÖE H, THEILADE E, JENSEN SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* May-Jun;36:177-87, 1965 .
25. LUAN XL. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. 2009
26. MAISCH T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*, v. 22, p. 83-91, 2007.
27. MARSH PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8:263–271; Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000.* Feb; v. 55 n. 1 p. 36-47, 2011.
28. MARTINS CV, DA SILVA DL, NERES AT, MAGALHÃES TF, WATANABE GA, MODOLO LV, SABINO AA, DE FÁTIMA A, DE RESENDE MA. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother*, v. 63, p. 337–339, 2009.
29. 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. 1460-4, 2000.
30. OCHSNER MJ. *Photochem. Photobiol.*, B39, 1. 1997.
31. PE MB, SANO K, INOKUCHI T. Effects of photodynamic therapy in the normal mouse tongue. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 51, p. 1129-1134, 1993.
32. RAMS TE, SLOTS J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000*, v. 10, p. 139-159, 1996.
33. SCHENKEIN HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 40, p. 77-93, 2006.

34. 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.
35. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* Feb; v. 25 n. 2 p. 134-44, 1998.
36. THEODORO LH, SILVA SP, PIRES JR, SOARES GH, PONTES AE, ZUZA EP et al. 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.
37. THEODORO LH, PIRES JR, FERNANDES LA, GUALBERTO JÚNIOR EC, LONGO M, ALMEIDAJM, GARCIA VG. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci.* Aug 3, 2013.
38. YAMADA Jr AM. Effects of photodynamic therapy in periodontitis induced in rats (in Portuguese).[Thesis]. São Paulo,SP: Institute of Energetic and Nuclear Research;. 87p. 2007. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*; v. 55 p. 143-166, 2011.

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 "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 Mariéllen 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 Mariéllen 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 Clóvis Pestana, 703 CEP 16050-680, Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabiano.candelli@unesp.br

/