UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo *in vivo* em ratos.

PAULA GABRIELA FACIOLA PESSÔA DE OLIVEIRA

PG.PERIO
FORP-USP

RIBEIRÃO PRETO

2014

PAULA GABRIELA FACIOLA PESSÔA DE OLIVEIRA

Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo *in vivo* em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Oliveira. Paula Gabriela Faciola Pessôa

Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo *in vivo* em ratos./ Paula Gabriela Faciola Pessôa de Oliveira; orientador Sérgio Luís Scombatti de Souza - Ribeirão Preto, 2014.

105 f. : il.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2014. Área de concentração: Periodontia.

1. Periodontite 2. Terapia fotodinâmica 3. Eritrosina.

OLIVEIRA, P. G. F. P. Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo in vivo em ratos: Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

D

EDICATÓRIA

Aos meus pais Paulo e Silvia,

exemplos de amor e dedicação, que são a minha base e me ensinaram todos os valores que eu tenho hoje.

Aos meus irmãos Adelina e Philippe,

meus melhores amigos, que sempre me incentivaram e acreditaram que esse é apenas o começo de onde eu posso chegar.

A minha família e amigos,

que mesmo distantes sempre me apoiaram e me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos.

A GRADECIMENTOS

A materialização desse sonho só foi possível porque Deus colocou no meu caminho pessoas incríveis, que me encheram de amor e sem as quais eu nada seria. A vocês o meu eterno agradecimento.

Agradeço a Deus por todas as oportunidades.

Aos meus pais Paulo e Sílvia, pelo sacrifício que jamais poderei retribuir. Mesmo ausentes fisicamente, estiveram do meu lado em cada momento dessa trajetória, acreditando em mim e me ajudando a alcançar todos os meus objetivos. Vocês são os grandes responsáveis por mais essa conquista.

Aos meus irmãos Adelina e Philippe, que mesmo inconscientemente sempre me incentivaram. Pelo amor, amizade, e apoio depositados. Sem vocês, o sonho não seria possível.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Luis Scombatti de Souza. Os elogios me faltam ao falar desse excelente profissional, exemplo de mestre. Muito obrigada pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pela confiança, pela paciência, pelo convívio e dedicação. O senhor foi o maior incentivador que tive durante o mestrado. Serei eternamente grata.

Aos professores do programa de pós graduação em Periodontia da FORP – USP: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior, pela oportunidade de participar do programa e pelos conhecimentos transmitidos; prof. Dr. Mário Taba Júnior pelo agradável convívio, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação e responsabilidade; Profª. Dra. Daniela Bazan Palioto, pela sua atenção, dedicação, orientação e incentivo; Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi pelos ensinamentos, por nos transmitir sua paixão pela odontologia e sempre nos estimular em busca do conhecimento. E em especial Ao prof. Dr. Michel Reis Messoria, que desde o início sempre esteve disposto a contribuir com o meu crescimento. Obrigada pelo incentivo, pela convivência, por tantos conhecimentos transmitidos e pela gentil colaboração na realização das análises estatísticas.

A tão querida Adriana Silveira e Souza pela paciência, ensinamentos e colaboração, indispensáveis para a materialização deste trabalho e por tantos gestos de carinho a mim dedicados.

A prof. Dra. Flávia Furlaneto que gentilmente contribuiu para a execução dessa pesquisa. Muito obrigada pela disponibilidade, atenção e conhecimentos transmitidos.

Ao prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira pelo material concedido e por todos os ensinamentos.

Aos amigos de turma: André Moreira, Cristine Borges, Mariana Sales, Felipe Santos, Tulio Pignaton, Kelly Roccio, Umberto Ramos, Gustavo Vieira, Carolina Delmondes, Carolina Mandeta, Patricia Garani, Danilo Reino e Luciana Maia por todo companheirismo, cumplicidade e carinho compartilhados durante toda essa jornada. Obrigada por serem tão especiais, por tornarem os meus dias mais felizes e por contribuírem de forma ímpar para o meu crescimento pessoal e profissional.

A Janine Montenegro pela paciência e atenção.

Ao amigo Gabriel Bastos, por ter me estendido a mão quando cheguei em Ribeirão Preto e pelas incansáveis horas no biotério.

Amanda Bertin, pela ajuda na concretização dessa pesquisa.

A Vani que através de sua sensibilidade me repassou ensinamentos que vão além da Odontologia.

A Fabiola, Milla e Roger, presenças fundamentais para a realização desse trabalho. Obrigada pela paciência, pelo excelente convívio e pelos diversos ensinamentos.

A Adriana Almeida, pela paciência, disponibilidade e eficiência com que sempre me auxiliou.

Aos funcionários do biotério: Aline, Massaro e Serginho, pessoas incríveis que tive o prazer de conviver.

Ao Prof. Antônio Tedesco e Fernando Primo pela atenção dedicada e pelo fornecimento do material necessário à pesquisa.

A minha amada professora Ana Lúcia Almeida. Suas palavras de estímulo e sua mão amiga me ajudaram a superar os obstáculos e a nunca desistir dos meus sonhos. Jamais esquecerei tudo que você fez por mim.

Aos eternos mestres: Antônio Athayde, Adriano Corrêa, Sílvio Menezes, Ana Lúcia Almeida, Luis Esper, Sueli Devides, Flávio Amado e Caio Figueiredo.

Aos amigos de Bauru sempre presentes nessa trajetória: Gabriela Natalício, Mércia Cunha, Rander Macedo, Mariuza Marques.

A maravilhosa equipe ALFA: Profa. Ana Lúcia Almeida, Luis Esper, Michyele Sbrana e Mércia Cunha. Muito obrigada pelas oportunidades e ensinamentos no biotério de Bauru e por toda amizade durante essa trajetória.

Às amigas Adriana Braga, Aline Baía e Isabella Marques, minhas menininhas, grandes companheiras e incentivadoras em todos os momentos.

A Gizelle Vallinoto, minha parceira de vida, minha maior companheira, minha família em São Paulo. Obrigada pelos incontáveis momentos de alegrias, pela amizade sincera e verdadeira.

A Roberta Freitas, minha mãe de coração, meu agradecimento eterno por dividir comigo suas risadas, sua leveza, seu alto astral e principalmente o seu amor.

A Irema, que sempre se fez presente nos meus dias, trazendo mais alegria para a minha vida.

Ao Marcus Viana, o irmão que a vida me deu e que está comigo em absolutamente todos os momentos.

A eles que foram a família que eu pude escolher em Ribeirão Preto: Adriana, Alexandre e Dilaina Santos. Obrigada pelo amor sincero e verdadeiro, pelo carinho e pela amizade. E também a amiga Fany Bennet.

Aos meus avós, Léa e Herminio, Joana e Alberto, os melhores do mundo, fonte de muita inspiração.

Ao Tio Oscar, meu espelho, meu ponto de referência, além de exemplo de vida, profissionalismo e dedicação à Odontologia

À Tia Bela, minha madrinha-mãe, meu amor incondicional. Obrigada pelo simples fato de ser você e de me amar como uma filha.

À Tia Lora, minha guerreira, por me ensinar a sempre lutar. Amo muito você. Você é o grande orgulho da nossa família.

À Tia Liane pelas orações e pelas vibrações positivas.

Ianna e Renata, minhas primas amadas, porto seguro, pela torcida de sempre e amor incondicional.

Aos amados Fernanda e André por se fazerem sempre presentes, me apoiando e me enchendo de amor.

Aos amigos distantes e em especial ao meu pequeno príncipe Théo, por toda cumplicidade e amor que me concederam nessa trajetória, me fazendo uma pessoa mais feliz.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

A todos os funcionários da FORP, por todo carinho e boa vontade, especialmente Tatiana, Dulce, Daniela, Carla Daniela, Suely, Dona Laura, Isabel e Regiane.

Ao Centro Universitário do Pará, todos os queridos professores e funcionários, por me fornecer conhecimentos necessários para que eu pudesse me tornar Cirurgiã – Dentista.

RESUMO

Resumo

OLIVEIRA, P. G. F. P. **Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo in vivo em ratos.** 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A periodontite é uma doença multifatorial iniciada pela presença de biofilme bacteriano que interage com os mecanismos de defesa do hospedeiro e ocasiona intensa resposta inflamatória e destruição tecidual. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) proporciona uma ação antibacteriana de maneira localizada, utilizando uma fonte de luz e um fármaco fotossensível. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da TFDa, utilizando o fotopolimerizador LED como fonte de luz e a eritrosina como fotossensibilizador, no tratamento de periodontite induzida por ligadura, em ratos, por meio das análises histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática. Em 60 ratos, a doença periodontal foi induzida pela colocação de ligaduras nos primeiros molares inferiores e segundos molares superiores, durante 14 dias. Os animais foram então divididos em seis grupos experimentais: G1 (n=9) - Sem tratamento; G2 (n=9) – Raspagem e alisamento radicular (RAR); G3 (n=9) - Light Emitting Diode (LED), com um comprimento de onda de 450nm e intensidade de luz de 67mW/cm², 10 segundos/sítio (totalizando 1 minuto/dente); G4 (n=9) - RAR + TFDa (Eritrosina 1,0mg/mL + LED); G5 (n=9) – TFDa. G6 (n=9) – Eritrosina. O estudo também teve 2 controles internos: sem doença (SDP) (n=3) e máxima doença (DP+) (n=3). Os animais foram eutanasiados nos períodos de 3, 7 e 15 dias após a remoção das ligaduras (18 animais para cada tempo, 3 de cada um dos grupos experimentais), havendo preparo de material para avaliações histomorfométrica, imunohistoquímica (molares inferiores), e imunoenzimática (molares superiores). Na análise histomorfométrica da perda óssea linear, o G4 apresentou diferença significativa no tempo de 3 e 15 dias em relação a todos os grupos experimentais e aos 7 dias em relação ao G1, G2, G3. Na análise imunohistoquímica, os menores níveis absolutos de osteopontina estão relacionados ao G4. A marcação das células TRAP positivas demonstrou diferenças significantes no tempo de 3 dias entre o G4(34) quando comparado com o G2(57) e DP+(67). Na avaliação imunoenzimática dos níveis de RANKL, o G4 (3.69 pg/ml) apresentou diferenças significantes em relação ao G1 (6.44 pg/ml), G2 (5.84 pg/ml), G3 (6.19 pg/ml), G5 (5.94 pg/ml) e DP+ (6.87 pg/ml). A quantificação de OPG mostrou diferenças significantes nos períodos de 3 e 7 dias entre o G4 e todos os grupos. Aos 15 dias, essas diferenças foram: G4 *versus* G3, G5, G6 e DP+. A relação RANKL/OPG apresentou, aos 3 dias, diferenças significantes entre o grupo G4 e todos os grupos experimentais (para todas as análises, $p < 0,05$). Concluiu-se que o uso coadjuvante da TFDa, utilizando eritrosina e fonte de luz LED, em associação à raspagem e alisamento radicular apresentou os melhores resultados terapêuticos no tratamento da doença periodontal induzida por ligaduras em ratos.

Palavras Chave: Periodontite, terapia fotodinâmica, eritrosina.

ABSTRACT

Abstract

OLIVEIRA, P. G. F. P. **Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. animal study with histomorphometrical, immunohistochemical and immunoenzymatic evaluation.** 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Periodontal disease (PD) is an inflammatory destructive disease that targets tooth-supporting structures through complex and multifactorial processes. Scaling and root planing (SRP) may not be always affective in preventing disease progression. Therefore, adjunctive methods have been proposed to improve clinical outcomes after periodontal therapy, such as the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). aPDT for human infections is based on the concept that an agent (a photosensitizer), which absorbs light, can be preferentially taken up by bacteria and subsequently activated by light of the appropriate wavelength in the presence of oxygen to generate singlet oxygen and free radicals that are cytotoxic to microorganisms. The aim of this study was to evaluate the adjunctive effect of aPDT to SRP on induced PD in rats, analysing histomorphometrical, immunohistochemical and immunoenzymatic parameters. Ligatures were placed around the mandibular first molars and maxillary second molars of 60 rats to induce PD. After 14 days of PD induction, the ligatures were removed and the animals were divided in six groups, which received the following treatments: G1(n=09): no treatment was done; G2(n=09): SRP; G3(n=09): Light Emitting Diode (LED), with a wavelength of 450nm and a maximum power of 67 mW/cm², 10 seconds/site (totaling 1 minute/tooth); G4(n=09): SRP + aPDT (Erythrosine dye 1,0 mg/mL + LED as described for G3); G5(n=9): aPDT; G6(n=9): Erythrosine. The animals were euthanized 3, 7 and 15 days after treatment (18 animals for each time, 3 of each experimental group). In addition to the six experimental groups, there were two internal control groups: Group without PD (WPD) induction (n=3); and Group with maximum bone loss (MBL), euthanized immediately after ligature removal (n=3). In the histomorphometrical analysis of linear bone loss, G4 showed statistically significant differences to other experimental groups after 3 and 15 days, and to G1, G2 and G3 after 7 days. Immunohistochemically, counting of TRAP positive cells was significantly lower in G4 (34) when compared to G2 (57) and MBL (67) groups after 3 days. The immunoenzymatic assay (Luminex xMAP) showed significantly lower levels of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) for G4 (3.69 pg/ml) when compared to G1 (6.44 pg/ml), G2 (5.84 pg/ml), G3 (6.19 pg/ml), G5 (5.94 pg/ml) and MBL (6.87 pg/ml) after 3 days. Osteoprotegerin (OPG) quantification showed statistically significant differences between G4 and all other experimental groups after 3 and 7 days. The RANKL/OPG ratio, after 3 days, showed statistically significant differences between G4 and all other experimental groups (for all analysis, ANOVA one way + Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$). It was concluded that the adjunctive use of aPDT (Erythrosine dye + LED) in combination with scaling and root planing showed the best therapeutic results in the treatment of ligature-induced periodontal disease in rats.

Key words: Periodontitis; Photodynamic Therapy, Erythrosine.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Posicionamento dos animais na mesa cirúrgica para a colocação das ligaduras	44
Figura 2 - Colocação da ligadura na região subgengival de um segundo molar superior.	45
Figura 3 - Colocação da ligadura na região subgengival de um segundo molar inferior	45
Figura 4 - Remoção das ligaduras após 14 dias de indução de DP	46
Figura 5 - Realização dos procedimentos terapêuticos após a indução da DP	48
Figura 6 - Medidas de perda óssea linear	51
Figura 7 - Esquema para mensuração da área de tecido mole e tecido ósseo na região de bifurcação	51
Figura 8 - Esquema para mensuração da área de secreção de osteopontina.....	54
Figura 9 - Quantificação das células TRAP positivas na região de bifurcação.....	54
Figura 10 - Média $\pm$ desvio-padrão da perda óssea linear dos primeiros molares inferiores ...	58
Figura 11 - Porcentagem de tecido mole na bifurcação dos primeiros molares inferiores	59
Figura 12 - Porcentagem de tecido ósseo na bifurcação dos primeiros molares inferiores.....	60
Figura 13 - Valores médios da porcentagem de osteopontina secretada.....	61
Figura 14 - Número de células TRAP positivas	62
Figura 15 - Quantificação tecidual de RANKL.....	63
Figura 16 - Quantificação tecidual de OPG.....	64
Figura 17 - Relação entre as concentrações de RANKL/OPG x 100.....	65

LISTA DE ABBREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3d	Três dias
7d	Sete dias
15d	Quinze dias
<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
BSA	Bovine Albumin Serum
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
DAB	Diaminobenzidine
DP	Doença Periodontal
DP+	Doença periodontal máxima
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E + L	Tratamento com Eritrosina e LED
<i>F.n</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FORP-USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Grama
G1	Grupo 1 sem tratamento
G2	Grupo 2 Raspagem e alisamento radicular
G3	Grupo 3 Luz LED
G4	Grupo 4 Raspagem + Terapia fotodinâmica antimicrobiana
G5	Grupo 5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana
G6	Grupo 6 Eritrosina
GaAlAs	Laser de baixa potência de Gallium-Aluminum-Arsenide
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
JCE	Junção-cimento-esmalte
Kg	Kilograma

LED	Light Emitting Diode
M	Mol
mA	Miliampere
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MMPs	Metaloproteases de matriz
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
nm	Nanômetro
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Phosphate Buffered Saline
<i>P.g</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pg/mL	Picograma/mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
Photofrin	Porfímero de sódio
<i>P.i</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
RANK	Receptor de ativação do fator nuclear Kappa-beta
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-beta
RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
Rpm	Rotação por minuto
SDP	Sem doença periodontal
<i>S mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TA	Temperatura ambiente
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteases

TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
USP	Universidade de São Paulo
W	Watts
Mg	Micrograma
µg/mL	Micrograma/mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromêtro

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
>	Maior
<	Menor
nº	Número
%	Por cento
n	Tamanho da amostra

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais.....	83
Anexo B - Artigo científico submetido para publicação no Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	84

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 JUSTIFICATIVA	27
2 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	33
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Amostra	43
4.2 Indução da doença periodontal	43
4.3 Tratamentos realizados nos grupos experimentais	47
4.4 Processamento histológico	48
4.5 Análise histomorfométrica	49
4.6 Imunohistoquímica para identificação da atividade de osteoblastos	52
4.7 Análise imunohistoquímica para identificação de TRAP	53
4.8 Identificação da Atividade de Osteoblastos e Osteoclastos	53
4.9 Dosagem imunoenzimática de moléculas relacionadas ao metabolismo ósseo	55
4.10 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	57
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	83

JUSTIFICATIVA

Justificativa

A terapia fotodinâmica (TFD) foi reconhecida como uma alternativa terapêutica no começo do século passado, na Alemanha (Ackroyd et al., 2001). A TFD consiste na utilização de uma fonte de luz - geralmente o laser - num comprimento de onda específico, associada a um agente fotossensibilizante – o corante, que funciona como um marcador para células alvo. Durante a fotoativação, oxigênio reativo é liberado, causando toxicidade para as células-alvo, levando-as à morte celular (Metcalf et al. 2006, de Oliveira et al. 2009). É uma opção terapêutica bastante utilizada para o tratamento de tumores localizados porque permite a eliminação das células tumorais (Weidner et al., 1991). Os resultados promissores despertaram o interesse de outras áreas, dentre elas a Odontologia. Mais especificamente na Periodontia, a terapia começou a ser empregada para a eliminação de bactérias, sendo nesta forma mais recentemente denominada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana – TFDa.

Um dos grandes benefícios da TFDa é aumentar a ação antibacteriana de maneira localizada, sem os indesejáveis efeitos colaterais sistêmicos e sem uma possível resistência bacteriana que uma eventual antibioticoterapia poderia apresentar (Wood et al. 2006). Da mesma forma, não existem indícios de qualquer dano às células do hospedeiro, independente da combinação fonte de luz/fotossensibilizador empregada (Soukos et al. 1998). A seletividade para as células bacterianas é mais um fator que coloca esta terapia na vanguarda das modalidades terapêuticas, complementares ou não: ocorre a eliminação apenas das células bacterianas, não havendo dano para as células saudáveis do periodonto (Goulart et al. 2010a).

De acordo com estudo de 2009 de Polansky et al., na Periodontia o uso da TFDa teria como objetivo principal o aumento da eficácia na descontaminação das raízes infectadas, pois

inúmeras são as situações que, isoladas ou somadas a outras, contribuem para dificultar uma correta e completa desinfecção das mesmas.

Uma das razões para o insucesso na terapia básica é a capacidade de alguns patógenos de invadir os tecidos periodontais e os túbulos dentinários (Adriaens et al. 1988). Alguns trabalhos *in vitro* mostraram que patógenos fortemente correlacionados com a doença periodontal (DP), como a *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) são susceptíveis à TFDa utilizando azul de metileno (Soukos et al. 2000), azul de toluidina O (Batthi et al. 1998) e ftalocianina (Wood et al. 1999). Outros estudos *in vitro* demonstraram a erradicação de *P.g.*, *Prevotella intermedia* (*P.i.*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) e *Fusobacterium nucleatum* (*F.n.*) pela mesma terapia (Dobson & Wilson 1992, Sarkar & Wilson 1993, Henry et al. 1995, Kömerik et al. 2003, Goulart et al. 2010a).

A TFDa usualmente utiliza o laser como fonte de luz, e os tipos de laser utilizados são bastante variados. A fonte de luz ideal para uso da TFDa em Periodontia é aquela que tenha potência suficiente para, com o menor tempo de irradiação, promover os efeitos do fármaco fotossensível, e ao mesmo tempo seja acessível e presente na maioria dos consultórios odontológicos. Embora o uso de lasers esteja aumentando na odontologia, este ainda não é um equipamento de rotina nos consultórios. Alternativa ainda pouco estudada é o uso de fotopolimerizador com fonte de luz tipo LED (Light Emitting Diode), que mantém as características de baixo custo e apresenta-se instalado na grande parte dos equipamentos odontológicos, agregando ao processo as vantagens da maior potência do LED em relação à fonte de luz convencional dos fotopolimerizadores anteriormente testados (Costa et al. 2012). Diversos fabricantes nacionais tem fotopolimerizadores com fonte de luz LED, e o desenvolvimento de uma ponta adaptadora para uso de TFDa no sulco gengival é um objetivo viável e factível dos pontos de vista tecnológico e econômico.

No que diz respeito aos fotossensibilizantes, inúmeras substâncias já foram testadas, como compostos fenotiazínicos - azul de metileno (Almeida et al. 2008a, Lulic et al. 2009),

azul A (Almeida et al. 2008b, Lulic et al. 2009) e azul de toluidina O (Wainwright 1998, Wainwright 2005, Almeida et al. 2008b) - vermelho neutro, proflavina, laranja acridina e etacridina (Wainwright 1998); e eritrosina (Wood et al., 2006; Goulart et al. 2010b, Costa et al. 2012, Silva et al., 2013). Um dos critérios a serem ponderados para a escolha do fotossensibilizador é o comprimento de onda da fonte de luz, que deve ser específico para a faixa de sensibilização do corante (Lulic et al., 2009). Em estudos recentes, a eritrosina, um corante acessível e de baixa toxicidade mostrou resultados promissores quando utilizado como fotossensibilizante na TFDa em avaliações *in vitro* da inativação de bactérias orais (Wood et al., 2006), tanto ligadas à cárie (Paulino et al. 2005) como à doença periodontal (Goulart et al. 2010a, Goulart et al. 2010b), bem como em relação à *Candida albicans* (Costa et al. 2012).

Desse modo, seria interessante testar, em um modelo *in vivo* de doença periodontal induzida amplamente descrito na literatura (Bezerra et al. 2000, Liu et al. 2006, Marques et al. 2009, Huang et al. 2011), o efeito da TFDa utilizando uma fonte de luz acessível (LED) e um fármaco fotossensível de baixo custo (eritrosina), na busca de uma alternativa complementar de tratamento antimicrobiano da Doença Periodontal.

Referências Bibliográficas

1. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 74(5):656-669.
2. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. *J Periodontol* 1988; 59:222-230.
3. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG.(a) In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008; 79:1081-1088.
4. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG.(b). Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008; 79:2156-2165.
5. Bezerra MM, de Lima V, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha RAC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000; 71:1009-1014.
6. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol* 1998; 68:370-376.
7. Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 114:67-74.
8. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes Jr, AB, Garlet GP, Souza RA, Taba Jr M, Souza SLS, Ribeiro, FJ. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: Cytokine Profile in Gingival Crevicular Fluid, Preliminary Results. *J Periodontol* 2009;80:98-105.
9. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* 1992; 37:883-887.
10. Goulart RD, Bolean M, Paulino TD, Thedei G, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010; 28:53-60.
11. Huang S, Lu F, Zhang Z, Yang X, Chen Y. The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1 α in rat experimental periodontitis. *J Periodontol* 2011; 82:934-941.
12. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:932-940.

13. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, Graves DT. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 2006; 85:510-514.
14. Lulic M, Leiggener Gorog I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36:661–666.
15. Marques MR, dos Santos MC, da Silva AF, Nociti FH Jr, Barros SP. Parathyroid hormone administration may modulate periodontal tissue levels of interleukin-6, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in experimental periodontitis. *J Periodontol Res* 2009; 44:744-750.
16. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:190-192.
17. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr. G, Tedesco A, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 353-359.
18. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36:575–580.
19. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 1993; 28:204–210.
20. Silva JR, Cardoso G, Maciel RR, de Souza NC. Morphological alterations on *Citrobacter freundii* bacteria induced by erythrosine dye and laser light. *Lasers Med Sci* 2013 Aug 24.
21. Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharm Res* 2000; 17:405–9.
22. Wainwright, W. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:13–28.
23. Wainwright W. Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. *Dyes and Pigments* 2005; 73:7-12.
24. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.
25. Wood SR, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B* 1999; 50:1-7.
26. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:680-684.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Introdução e Revisão da Literatura

A periodontite é uma doença multifatorial iniciada pela presença de biofilme bacteriano que interage com os mecanismos de defesa do hospedeiro (Løe et al., 1965; Russel, 1967; Socransck, 1977) e ocasiona intensa resposta inflamatória e destruição tecidual, podendo levar à perda do dente (Sallum et al., 2004).

Estudos têm sugerido que a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nos tecidos periodontais é um fator relevante para a determinação do curso e/ou severidade da doença, provavelmente regulando o balanço entre as MMPs (metaloproteases de matriz) e os TIMPs (inibidores teciduais das metaloproteases), bem como entre RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear- κ B) e a OPG (osteoprotegerina) (Garlet et al., 2006; Cesar-Neto et al., 2007). O balanço entre as MMPs e os TIMPs está relacionado à destruição de tecido conjuntivo, enquanto o balanço entre RANKL e OPG relaciona-se à reabsorção óssea (Garlet et al., 2006; Taubman et al., 2005; Cesar-Neto et al., 2007).

A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um equilíbrio delicado entre a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e a formação óssea mediada pelos osteoblastos. A ligação de RANKL a RANK (Receptor de ativação do fator nuclear Kappa-beta), molécula expressa nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulador para a diferenciação destas células em osteoclastos. Os efeitos de RANKL são regulados pela OPG, que inibe a reabsorção óssea, impedindo a interação entre RANK e RANKL. O conhecimento dos fatores reguladores do sistema RANKL/OPG é importante, tendo em vista que o desequilíbrio deste está relacionado à patogênese das doenças periodontais (Taubman et al., 2005; Garlet et al., 2006; Cochran, 2008).

Outra molécula importante para o metabolismo ósseo é a osteopontina, uma proteína não colágena sintetizada pelos osteoblastos e osteoclastos, necessária para o início da mineralização óssea (Roach, 1994; Sharma e Pradeep, 2006). Também está relacionada à união

de osteoclastos à superfície óssea e sua ausência prejudica a reabsorção óssea (geração de sinais intracelulares essenciais para a mobilidade normal dos osteoclastos) (Sharma e Pradeep, 2006). Além disso, a osteopontina é considerada como uma citocina multifuncional nos fluidos corporais, sendo secretada pelas células inflamatórias (macrófagos, leucócitos, células T e natural *Killer*) e com função quimiotática para monócitos/macrófagos (Sharma e Pradeep, 2006).

As formas de tratamento da doença periodontal existentes atualmente nem sempre são capazes de impedir a progressão da doença. As técnicas de instrumentação (raspagem e alisamento radicular – RAR) apresentam limitações quanto à completa e efetiva eliminação de depósitos microbianos e mineralizados no ambiente subgengival (Adriaens e Adriaens, 2004). Fatores como profundidade inicial da bolsa periodontal, anatomia radicular, desenho dos instrumentos periodontais e habilidade do operador podem influenciar nessa efetividade (Adriaens e Adriaens, 2004).

Apesar da melhora observada em alguns estudos que avaliaram profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, quando na associação de antimicrobianos sistêmicos tais como tetraciclina, metronidazol, amoxiciclina e/ou associações, deve-se atentar para o desenvolvimento de uma possível resistência bacteriana, bem como a correta adesão ao tratamento por parte dos pacientes (Braun et al., 2008). Sendo assim, autores sugerem que o seu uso deve ser restrito a alguns casos, nos quais os pacientes apresentem alta atividade da doença ou um perfil bacteriano específico (de Oliveira et al., 2007). Neste contexto, surgem novas abordagens capazes de otimizar os procedimentos de RAR e proporcionar uma melhora na eficácia do tratamento das doenças periodontais.

A terapia fotodinâmica – TFD – foi reconhecida como uma alternativa terapêutica no começo do século passado, na Alemanha (Ackroyd et al., 2001). A TFD consiste na utilização de uma fonte de luz – geralmente o laser – num comprimento de onda específico, associada a um agente fotossensibilizante – o corante, que funciona como um marcador para células alvo.

Durante a fotoativação, oxigênio reativo é liberado, causando toxicidade para as células alvo, levando-as à morte celular (Metcalf et al., 2006, de Oliveira et al., 2009). É uma opção terapêutica bastante utilizada para o tratamento de tumores localizados porque permite a eliminação das células tumorais (Weidner et al., 1991).

Os resultados promissores despertaram o interesse de outras áreas, dentre elas a Odontologia. Mais especificamente na Periodontia, a terapia começou a ser empregada para a eliminação de bactérias, sendo nesta forma mais recentemente denominada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana – TFDa.

Um dos grandes benefícios da TFDa é aumentar a ação antibacteriana de maneira localizada, sem os indesejáveis efeitos colaterais sistêmicos e sem uma possível resistência bacteriana que uma eventual antibioticoterapia poderia apresentar, utilizando uma fonte de luz e um fármaco fotossensível (Wood et al., 2006).

Da mesma forma, não existem indícios de qualquer dano às células do hospedeiro, independente da combinação fonte de luz/fotossensibilizador empregada (Soukos et al., 1998). A seletividade para as células bacterianas é mais um fator que coloca esta terapia na vanguarda das modalidades terapêuticas, complementares ou não: ocorre a eliminação apenas das células bacterianas, não havendo dano para as células saudáveis do periodonto (Goulart et al., 2010a).

A morte celular que resulta da associação do fotossensibilizador, fonte de luz e oxigênio, geralmente é determinada por um dano na parede celular bacteriana durante a aplicação da TFDa, que pode inibir o crescimento bacteriano ou levar à sua morte. Esse dano é causado por espécies reativas de oxigênio e oxigênio singleto (Babilas et al., 2010). Estudos utilizando microscópio de força atômica demonstraram as consequências da TFDa na parede celular e alterações na superfície das bactérias (Sahu et al., 2009; Jin et al., 2010). As ações antimicrobianas da TFDa são: oxidação, aumento da permeabilidade de íons, perda de potencial de reparo, perda de virulência, inibição da respiração, inibição da interação ribossômica, inibição da replicação, clivagem e mutação (Raghavendra et al., 2009).

De acordo com estudo de 2009 de Polansky et al., na Periodontia o uso da TFDa teria como objetivo principal o aumento da eficácia na descontaminação das raízes infectadas, pois inúmeras são as situações que, isoladas ou somadas a outras, contribuem para dificultar uma correta e completa desinfecção das mesmas.

Uma das razões para o insucesso na terapia básica é a capacidade de alguns patógenos de invadir os tecidos periodontais e os túbulos dentinários (Adriaens et al., 1988). Alguns trabalhos *in vitro* mostraram que patógenos fortemente correlacionados com a doença periodontal (DP), como a *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) são susceptíveis à TFDa utilizando azul de metileno (Soukos et al., 2000), azul de toluidina O (Batthi et al., 1998) e ftalocianina (Wood et al., 1999). Outros estudos *in vitro* demonstraram a erradicação de *P.g.*, *Prevotella intermedia* (*P.i.*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) e *Fusobacterium nucleatum* (*F.n.*) pela mesma terapia (Dobson & Wilson 1992, Sarkar & Wilson 1993, Henry et al., 1995, Kömerik et al., 2003, Goulart et al., 2010a).

A TFDa usualmente utiliza o laser como fonte de luz. De acordo com Andrade et al., em 2007, o laser diodo predomina na literatura de TFDa (Chondros et al., 2009, de Oliveira et al., 2009, Lulic et al., 2009), embora o uso de lasers de Argônio (Wainwright 1998) e de baixa potência de Gallium-Aluminum-Arsenide - GaAlAs (Almeida et al., 2008b) também tenham sido relatados.

A fonte de luz ideal para uso da TFDa em Periodontia é aquela que tenha potência suficiente para promover o menor tempo de irradiação que promova os efeitos do fármaco fotossensível, e ao mesmo tempo seja acessível e presente na maioria dos consultórios odontológicos. Embora o uso de lasers esteja aumentando na odontologia, este ainda não é um equipamento de rotina nos consultórios. Por outro lado, estudos recentes apontam para novos caminhos, com a utilização eficiente de fotopolimerizadores na TFDa (Paulino et al., 2005, Goulart et al., 2010a). Outra alternativa, ainda pouco estudada, é o uso de fotopolimerizador com fonte de luz tipo (LED (“Light Emitting Diode”, ou Diodo Emissor de Luz), que mantém

as características de baixo custo e grande parque de equipamentos já instalados em consultórios, mas agrega ao processo as vantagens da maior potência do LED em relação à fonte de luz convencional dos fotopolimerizadores anteriormente testados (Costa et al., 2012a). Diversos fabricantes nacionais tem fotopolimerizadores com fonte de luz LED, e o desenvolvimento de uma ponta adaptadora para uso de TFDa no sulco gengival é um objetivo viável e factível dos pontos de vista tecnológico e econômico.

No que diz respeito aos fotossensibilizantes, inúmeras substâncias já foram testadas, como compostos fenotiazínicos - azul de metileno (Almeida et al., 2008a, Lulic et al., 2009), azul A (Almeida et al., 2008b), Lulic et al., 2009) e azul de toluidina O (Wainwright 1998, Wainwright 2005, Almeida et al., 2008b), vermelho neutro, proflavina, laranja acridina e etacridina (Wainwright 1998), a curcumina (Koom et al., 2006; Dovigo et al., 2011) e a eritrosina (Wood et al., 2006, Goulart et al. 2010b, Costa et al. 2012a, Silva et al., 2013). Um dos critérios a serem ponderados para a escolha do fotossensibilizador é o comprimento de onda da fonte de luz, que deve ser específico para a faixa de sensibilização do corante (Lulic et al., 2009).

Em estudos recentes, a eritrosina mostrou ser um corante acessível e de baixa toxicidade (Allaker et al., 2009), apresentando resultados promissores quando utilizada como fotossensibilizante na TFDa em avaliações *in vitro* da inativação de bactérias orais (Wood et al., 2006), tanto ligadas à cárie (Paulino et al. 2005) como à doença periodontal (Goulart et al. 2010a), bem como em relação à *Candida albicans* (*C. albicans*) (Costa et al. 2012a).

Wood et al., (2006) realizaram estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar a ação da terapia fotodinâmica utilizando a eritrosina em biofilmes de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), comparando sua eficácia na morte celular em relação a outros dois corantes: o azul de metileno e o porfímero de sódio (Photofrin). Além disso, os autores observaram a localização da eritrosina no biofilme. Para isso, foram cultivados biofilmes de *S. mutans*. Um microscópio confocal a laser foi utilizado para determinar a localização do fotossensibilizador dentro do

biofilme e as incubações foram realizadas com cada fotossensibilizador (22 μ M). O tempo de irradiação foi de 15 minutos, utilizando uma fonte de luz branca de 400 Watts (W). Os resultados mostraram que a eritrosina está associada com a biomassa do biofilme. Em relação à morte celular, a eritrosina mostrou ser mais eficiente do que o Photofrin e o azul de metileno e estas diferenças foram estatisticamente significantes ($P < 0.01$). A terapia fotodinâmica antimicrobiana com todos os três fotossensibilizadores foi cada vez mais eficaz à medida que o biofilme se apresentava mais maduro, sugerindo que as mudanças na arquitetura e composição do biofilme afetam a suscetibilidade à TFDa. Dessa forma, os autores concluíram que a eritrosina como fotossensibilizador apresentou um excelente potencial contra biofilmes orais.

Com o objetivo de comparar o efeito da Terapia fotodinâmica antimicrobiana contra o *A.a*, principal patógeno da doença periodontal agressiva, Goulart et al., 2010b, realizaram um estudo *in vitro*, utilizando a eritrosina ou o azul de metileno como fotossensibilizante, associados a um fotopolimerizador de resina odontológica como fonte de luz. A metodologia empregada consistiu na cultura do *A.a* de acordo com o descrito por Goulart et al., 2010a. A sensibilidade (toxicidade do corante) do azul de metileno e da eritrosina para a TFDa foram determinados e um protocolo de trabalho foi estabelecido. A viabilidade das bactérias foi determinada pela unidade formadora de colônias (cultura planctônica) e por observações microscópicas (biofilme). Os resultados demonstraram que a eritrosina apresentou uma maior eficiência na morte bacteriana tanto na forma planctônica (75%) como no biofilme (77%) quando comparada ao azul de metileno (50% e 54%, respectivamente). Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando o azul de metileno ou a eritrosina como fotossensibilizante associado a um fotopolimerizador de resina odontológica como fonte de luz pode ser uma eficiente opção para a descontaminação de bolsas periodontais na periodontite agressiva.

No ano de 2012, Costa et al (b)., realizaram um estudo com o propósito de avaliar a eficácia da eritrosina e do corante *Rose Bengal* na terapia fotodinâmica, utilizando fonte de luz

LED contra culturas planctônicas e de biofilmes de *C.albicans*, as quais foram submetidas às seguintes condições experimentais: a) tratamento com eritrosina e LED (E + L), b) tratamento com *Rose Bengal* e LED (RB + LED) e c) grupo controle, sem irradiação da luz LED. Após a irradiação, as culturas planctônicas foram avaliadas por contagem de unidades formadoras de colônias, seguido por análise de variância e posterior teste de Turkey ($p < 0,05$). Os biofilmes foram analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados revelaram uma redução significativa de culturas planctônicas ($3,45 \log_{10}$ e $1,97 \log_{10}$) e de biofilmes ($< 1 \log_{10}$) para as amostras que foram sujeitas a terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando a eritrosina ou o *Rose Bengal*, respectivamente. Os dados demonstraram ainda que a TFDa foi eficaz na redução e na destruição de *C. albicans*, blastoconídios e hifas. Sendo assim, os autores concluíram que a TFDa utilizando eritrosina e *Rose Bengal* com irradiação de luz LED é eficaz contra a *C. albicans*.

No entanto, os efeitos da TFDa associando a eritrosina ao LED como fonte de luz ainda não foram testados experimentalmente em animais. Desse modo, seria interessante testar, em um modelo *in vivo* de doença periodontal induzida amplamente descrito na literatura (Bezerra et al. 2000, Liu et al. 2006, Marques et al. 2009, Huang et al. 2011), o efeito da TFDa utilizando uma fonte de luz acessível (LED) e um fármaco fotossensível de baixo custo (eritrosina), na busca de uma alternativa complementar de tratamento antimicrobiano da Doença Periodontal.

PROPOSIÇÃO

Proposição

O presente estudo propõe-se a avaliar o efeito da TFDa no tratamento de periodontite induzida por ligadura em ratos, utilizando o fotopolimerizador de luz LED como fonte de luz e a Eritrosina como fotossensibilizador, por meio de:

- Análise histomorfométrica: avaliação dos parâmetros de área e altura ósseas;
- Análise imunohistoquímica: avaliação da atividade de osteoblastos e osteoclastos;
- Análise imunoenzimática, utilizando kit Multiplex[®], dosando as seguintes moléculas relacionadas ao metabolismo ósseo: ligante do ativador do receptor de fator kappa B nuclear (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Métodos

O presente projeto de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Campus da USP-Ribeirão Preto, tendo sido aprovado (processo número: 12.1.693.53.0, aprovado em 03 de outubro de 2012).

Amostra

Foram selecionados 60 ratos adultos machos do tipo Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso entre 200 a 250 g, provenientes do biotério central da FORP-USP. Foram utilizados somente ratos machos para evitar a influência das variações hormonais sobre o processo de reparo ósseo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas com alimento (ração triturada) e água *ad libitum* antes e durante o período experimental, e permaneceram no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP-USP em ambiente com ciclo de 12 horas de luz e temperatura entre 22 e 24°C.

Indução da Doença Periodontal (DP)

A Indução da DP foi realizada utilizando de um modelo já descrito na literatura (Bezerra et al., 2000), que mimetiza diversos achados da periodontite humana, incluindo biofilme bacteriano, formação de infiltrado inflamatório, perda de inserção conjuntiva e de osso alveolar (Liu et al., 2006). Os animais foram primeiramente pesados para o correto cálculo da dose anestésica. Após anestesia intraperitoneal com a associação de ketamina e xilazina (4:3, aplicação de 100-130 µL/100g do animal): Ketamina (74,1 mg/Kg - Cloridrato de Cetamina a 10% - Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu – SP, BR) e Xilazina (11,2 mg/kg – Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha) os animais foram posicionados na mesa cirúrgica (Bonter Equipamentos para Ensino e Pesquisa, Ribeirão Preto, BR) (Figura 1).

Figura 1. Posicionamento dos animais na mesa cirúrgica para a colocação das ligaduras (A, B, C e D).

Subsequentemente, com auxílio de sonda exploradora e porta agulha, ligaduras (fio de algodão nº 24, Coats Corrente, São Paulo, BR) foram inseridas na região subgengival dos primeiros molares inferiores e dos segundos molares superiores, para indução da DP por meio do acúmulo de biofilme bacteriano. O processo inflamatório resultante com acúmulo de biofilme se caracteriza por uma periodontite aguda, levando à reabsorção óssea alveolar (Rovin et al., 1966) (Figuras 2 e 3).

Figura 2. Colocação da ligadura. A, B, C, D e E, posicionamento da ligadura na região subgengival de um segundo molar superior.

Figura 3. Colocação da ligadura. A, B e C, posicionamento da ligadura na região subgengival de um primeiro molar inferior

Os animais foram acompanhados diariamente no período após a instalação das ligaduras para que fosse observado o comportamento dos mesmos, bem como sua alimentação e hidratação. Caso houvesse qualquer sinal de sofrimento do animal, este seria excluído do estudo e sacrificado por aprofundamento anestésico com Tiopental Sódico 150mg/kg (Thiopentax, Cristália, Brasil) via intraperitoneal. Não foram administrados anti-inflamatórios e antibióticos, pois os mesmos poderiam influenciar nos resultados do estudo.

Após 14 dias, verificada a perda óssea e do aparato de inserção, as ligaduras foram removidas (Figura 4). Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, cada qual contendo 9 ratos e, em seguida, foram realizados (Figura 5) os seguintes procedimentos terapêuticos nos sítios infectados:

Figura 4. Remoção das ligaduras após 14 dias de indução de DP. A e D - acúmulo de placa bacteriana (setas) nas ligaduras posicionadas na região do sulco gengival do segundo molar superior e do primeiro molar inferior. B e E - aspecto das ligaduras após a sua remoção. A seta indica o acúmulo de placa bacteriana sobre o fio de algodão. C e F – Presença de biofilme bacteriano e DP (setas).

Tratamentos realizados nos grupos experimentais

- GRUPO 1 (G1) (n=9) – Não houve nenhum tipo de tratamento;
- GRUPO 2 (G2) (n=9) – Raspagem e Alisamento Radicular (RAR): este procedimento foi realizado com curetas mini-Gracey (Hu-Friedy®, Chicago IL), em 10 movimentos de tração disto-mesiais, nos molares testados. Em seguida, foi realizada irrigação com soro fisiológico;
- GRUPO 3 (G3) (n=9) – Fotopolimerizador de Luz LED: as bolsas formadas pela colocação das ligaduras foram irradiadas com uma fonte de luz LED (Gnatus) com uma ponta modificada, apresentando comprimento de onda de 450nm e intensidade de luz de 67 mW/cm², 10 segundos por sítio (mésio-vestibular, disto-vestibular, vestibular, mésio-lingual, disto-lingual e lingual), totalizando 1 minuto por dente;
- GRUPO 4 (G4) (n=9) - Raspagem e Alisamento Radicular + Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (RAR + TFDa): foi realizada a raspagem da mesma forma como descrita para o grupo 2. Em seguida, foi aplicado o fotossensibilizante Eritrosina, em base líquida, na concentração de 1,0 mg/mL, partindo da porção mais apical para a mais coronária, e aguardado o tempo de 1 minuto para a ação do fotossensibilizante. Os sítios foram novamente irrigados com soro fisiológico para a remoção de possíveis excessos do fotossensibilizante. Após isto, as bolsas foram irradiadas com a fonte de luz LED, de acordo com o descrito no grupo 3.
- GRUPO 5 (G5) (n=9) – TFDa: os animais receberam o protocolo de aplicação da TFDa descrito para o grupo 4, sem a realização da raspagem e alisamento radicular;
- Grupo 6 (G6) (n=9) - Fotossensibilizante: foi aplicado o fotossensibilizante Eritrosina conforme descrito no grupo 4 sem a raspagem e alisamento radicular e sem a aplicação da fonte de luz.

Além dos seis grupos experimentais, o estudo também teve 2 controles internos: um sem doença (n=3), no qual os animais não receberam ligaduras, foram anestesiados e alimentados iguais aos outros grupos e eutanasiados após um período de 14 dias (Controle Interno Positivo Sem Doença = SDP). Os 3 ratos restantes constituíram o Controle Interno

Negativo (Máxima Doença = DP+), apresentando máxima perda óssea (n=3). Estes receberam a ligadura por 14 dias e foram eutanasiados imediatamente após a remoção da mesma.

Figura 5. Realização dos procedimentos terapêuticos após a indução da DP. A – RAR com curetas mini-Gracey (Hu-Friedy®). B – Aplicação da Eritrosina, em base líquida, na concentração de 1,0 mg/mL. C – Aplicação da fonte de luz LED.

Os animais foram eutanasiados com aprofundamento anestésico de Tiopental Sódico 150mg/kg (Thiopentax, Cristália, Brasil) via intraperitoneal nos períodos de 3, 7 e 15 dias após a remoção das ligaduras (18 animais para cada tempo, 3 de cada um dos grupos experimentais).

Processamento histológico

Inicialmente, realizou-se a dissecação das mandíbulas para se remover a área de interesse e os tecidos moles circunvizinhos envolvidos na pesquisa. Estas foram então seccionadas de modo que cada bloco contivesse o dente de interesse e seus tecidos circunjacentes. As hemimandíbulas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Merck & Co. Inc., New Jersey, USA) em pH 7 por um período de 24 a 48 horas e, em seguida, submetidas ao vácuo para melhor penetração da solução fixadora. A seguir, cada peça foi envolvida em gaze, identificada e colocada suspensa em um recipiente (Becker) contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético - Merck) a 4%, pH 7,4, sobre um agitador magnético, a fim de ser descalcificada por múltiplos banhos. No recipiente com a solução descalcificadora, uma corrente elétrica de 80 mA foi deixada constante para acelerar a descalcificação. Foi utilizado um volume de solução 10 vezes maior que o da peça, e esta solução foi trocada duas vezes por semana.

Após o período de descalcificação as peças foram lavadas exaustivamente em água corrente e depois em água destilada. Subsequentemente, foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de etanol (Merck): 50% durante a noite, duas horas e meia a 70%, 80% e 90%, e novamente durante a noite a 95%. No dia seguinte: duas horas no etanol absoluto I, três horas no etanol absoluto II e, finalmente, três horas no etanol absoluto III. Após isso, as peças foram deixadas durante a noite em uma mistura (1:1) de etanol absoluto e benzol (Merck). Subsequentemente, as peças foram incubadas em três banhos sucessivos de uma hora e meia em benzol. Em seguida, foram realizados os banhos de parafina: duas horas na parafina I e duas horas na parafina II. Por fim, as peças foram incluídas em parafina aquecida a 60°C. A inclusão das peças foi realizada de maneira padronizada, com o auxílio de uma inclusora Histo Embedder (Leica Reichert & Jung Products - Heildelberg, Alemanha). Posteriormente, cortes seriados de 6 mm na direção mesio-distal foram obtidos e montados sobre lâminas de vidro. Os cortes foram então desparafinizados em xilol (Merck), hidratados em série decrescente de etanol (5 minutos em cada: 100% - duas vezes, 95%, 90%, 80%, 70% e 50%), lavados em água destilada e corados com hematoxilina e eosina ou tricrômico de mallory. Após as colorações, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol (2 minutos em cada concentração de etanol): 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Finalmente, as lâminas foram diafanizadas com xilol (2 vezes de 5 minutos) e montadas com Permount (Thermo Fischer Scientific, Hanover Park, IL, USA).

A análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador.

Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica os cortes histológicos (2 por bloco) foram fotografados utilizando um microscópio trinocular para campo claro e fluorescência (modelo DMLB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heidelberg, Alemanha) com objetiva de 2,5, acoplado a uma câmera DFC300FX. A mensuração da perda óssea foi realizada com auxílio de um *software* de aquisição e análise de imagens LAS versão 4.1.0. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

distância linear entre a junção-cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar remanescente nas regiões proximais mesial e distal e no centro da bifurcação (Figura 6) e medidas da área de perda óssea alveolar na região de bifurcação (avaliação percentual de tecido mole e tecido ósseo presentes na área da bifurcação) (Figura 7).

As medidas lineares de cada lâmina foram somadas, obtendo-se o valor de perda óssea linear da lâmina, e a média das duas lâminas avaliadas resultou no valor de perda óssea linear do animal.

Para avaliar as medidas da área de perda óssea alveolar na região de bifurcação (avaliação percentual de tecido mole e tecido ósseo presentes na área da bifurcação) foi confeccionada uma grade retangular padronizada (Figura 9), apresentando uma área de 1,5 mm², posicionada em sua linha coronal de forma a coincidir com o teto da bifurcação dos primeiros molares inferiores. A área entre as raízes delimitada apicalmente pela base do retângulo foi considerada como área total (100%); a partir daí, foram medidos os valores percentuais internos a essa grade de tecido mole e tecido ósseo. O valor das medidas de área do animal também foi dado pelo valor médio das duas lâminas avaliadas (tecido mole e tecido ósseo).

Figura 6. Medidas de perda óssea linear. Primeiro molar inferior lado esquerdo do Grupo 3 após 7 dias de tratamento: 1= medida linear da perda óssea distal, 2= medida linear da perda óssea na bifurcação, 3= medida linear da perda óssea mesial.

Figura 7. Esquema para mensuração da área de tecido mole e tecido ósseo na região de bifurcação. A - grade retangular; B - área total dos tecidos (amarelo); C - área de tecido mole (amarelo) e D - área de tecido ósseo (amarelo).

Imunohistoquímica para identificação da atividade de osteoblastos

Os cortes montados sobre lâminas de vidro gelatinizadas (0.5% de gelatina e 0,05% de alúmen de cromo em água destilada) foram desparafinizados, hidratados e a atividade da peroxidase endógena bloqueada com 1% de H₂O₂ (Merck) em PBS (Phosphate Buffered Saline – Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). A ligação inespecífica foi bloqueada com PBS contendo 2% de BSA (Bovine Albumin Serum – Sigma-Aldrich St. Louis, MO) por 30 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS + BSA 1% por 2 horas à TA em câmara úmida ou durante a noite a 4°C. As lâminas foram então lavadas abundantemente em PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado à HRP (horseradish peroxidase) diluído em PBS + BSA 1% por 60 minutos à TA em câmara úmida. Após esta incubação as lâminas foram exaustivamente lavadas com PBS e incubadas com o substrato específico para a enzima 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) e H₂O₂ por 20 minutos à TA. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por 10 minutos e contra-coradas com hematoxilina de Harris. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol (2 minutos em cada concentração de etanol): 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Finalmente, as lâminas foram diafanizadas com xilol (2 vezes por 5 minutos) e montadas com Permount. Como controle negativo, o anticorpo primário foi omitido ou substituído por IgG normal (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) na mesma concentração utilizada para o anticorpo primário.

Anticorpo primário utilizado:

Identificação de atividade de osteoblastos – anticorpo monoclonal de camundongo anti-osteopontina de rato (MPIIB10-1, Developmental Studies Hybridoma Bank), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Paulo Tambasco do departamento Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da FORP-USP. Utilizado na concentração final de 1:800 e incubação por 2 horas à TA em câmara úmida.

Anticorpo secundário utilizado:

- Goat anti-mouse horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch). Utilizado na concentração final de 1:750.

Análise imunohistoquímica para identificação de TRAP

Os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados por meio de sequencia graduada de etanol. Ao final de cada fase da reação imunohistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (0,1 M, pH 7,4). Posteriormente, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3 % durante 1 hora e, em seguida, em soro de albumina bovina a 1 % durante 2 horas, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena e os sítios não específicos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada um dos grupos experimentais foram incubadas com o anticorpo primário de cabra anti - rato fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), durante 24 horas. Os cortes foram então incubados com um anticorpo secundário biotinilado durante 2 horas e subsequentemente tratados com um conjugado de estreptavidina com HRP por 1 hora. A reação foi revelada com o uso de 3,3'- DAB e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo, onde todos os procedimentos descritos foram realizados, com exceção da utilização do anticorpo primário.

Identificação da Atividade de Osteoblastos e Osteoclastos

As lâminas foram analisadas e fotografados utilizando um microscópio trinocular para campo claro e fluorescência (modelo DMLB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heidelberg, Alemanha) com objetiva de 2,5, acoplado a uma câmera DFC300FX. Um *software* analisador de imagens foi utilizado para a captura e análise das imagens .(LAS versão 4.1.0.).

Para quantificar a secreção de osteopontina na matriz óssea, foi confeccionada uma grade retangular padronizada (Figura 8A), apresentando uma área de 1,5 mm², posicionada em sua linha coronal de forma a coincidir com o teto da bifurcação dos primeiros molares

inferiores. A área entre as raízes delimitada apicalmente pela base do retângulo foi considerada como área total (100%); a partir daí, foram marcadas as áreas onde havia secreção de osteopontina na matriz óssea (Figura 8B).

A quantificação das células TRAP-positivas foi realizada com uma grade padronizada. A área total analisada incluiu uma região de 1,5 mm², localizada na região de bifurcação dos primeiros molares inferiores. O limite coronal dessa área coincidia com o teto da bifurcação dos molares, estendendo-se apicalmente por 1,5 mm². A imunomarcacão foi definida como as marcações acastanhadas presentes no compartimento citosólico das células. As células TRAP-positivas foram contadas em aumento de 2,5x.

Figura 8. Esquema para mensuração da área de secreção de osteopontina na matriz óssea na região de bifurcação. A - grade retangular; B - área onde houve a secreção de osteopontina (azul).

Figura 9. Quantificação das células TRAP positivas (identificadas pelas setas).

Dosagem imunoenzimática de moléculas relacionadas ao metabolismo ósseo

Nos tecidos moles adjacentes à superfície lingual dos segundos molares superiores, as moléculas relacionadas à reabsorção óssea (OPG e RANK-L) foram quantificadas por meio de ensaios imunoenzimáticos, utilizando os Kits Milliplex® RBN-31K (OPG) e RBN-31K (RANK-L) – Millipore Corporation].

Os tecidos moles ao redor dos molares superiores nos quais foi induzida a DP foram cuidadosamente removidos com o auxílio de um punch dermatológico nº 2 e armazenados em PBS contendo coquetel inibidor de proteases (1:100 – Sigma-Aldrich). Em seguida, foram homogeneizados manual (gral e pistilo) e mecanicamente (Ultra-Stirrer ULTRA 80-II, Eikonal do Brasil, São Paulo, SP, BR), centrifugados (4000 rpm / 15 min a 4°C), o sobrenadante obtido coletado e centrifugado novamente e, em seguida, o novo sobrenadante foi congelado a -80°C até o momento da dosagem de citocinas seguindo as recomendações do fabricante. A dosagem de moléculas foi realizada no Instituto Gênese de Análises Científicas (IgAc – São Paulo, SP, BR).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média + desvio padrão dos grupos em cada período, considerando o animal como unidade experimental. A significância das diferenças entre os grupos em cada período de análise (3, 7 e 15 dias), bem como intra-grupos (avaliando a diferença entre os períodos de 3, 7 e 15 dias) foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA one way) seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Em todas as análises, foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$).

R

RESULTADOS

Resultados

O grupo tratado com raspagem e alisamento radicular associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana apresentou uma menor perda óssea linear quando comparado aos outros grupos experimentais.

A figura 10 mostra os valores médios de perda óssea linear. O maior valor (6,74 mm) foi do grupo com Doença Periodontal Máxima, e o menor valor (1,66 mm) do grupo sem Doença Periodontal, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Aos três dias, foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os grupos G1 (sem tratamento), DP+ (doença máxima) e SDP (sem doença) *versus* todos os outros grupos experimentais. Além disso, houve diferença significativa entre o G4 (RAR + TFDa) e todos os outros grupos experimentais, com o grupo 4 apresentando menores valores de perda óssea linear.

Aos sete dias, o G4 apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos G1, G2 (RAR), G3 (LED) e DP+. Essas diferenças também ocorreram entre os grupos DP+ *versus* G2, G5 (TFDa) e G6 (ERI) e SDP *versus* G1, G2, G3, G5, G6 (para todas as avaliações, $p < 0,05$). Na avaliação de quinze dias, os resultados demonstraram diferenças ($p < 0,05$) entre o G4, DP+ e SDP e todos os outros grupos experimentais. A análise intra-grupos mostrou diferenças significantes entre G6.3d e G6.7d e G6.3d e G6.15d ($p < 0,05$).

Figura 10. Média $\pm$ desvio-padrão da perda óssea linear dos primeiros molares inferiores. Houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos: grupos G1(sem tratamento), DP+ (doença máxima) e SDP (sem doença) *versus* todos os outros grupos experimentais. Além disso, houve diferença significativa entre o G4(RAR + TFDa) e todos os outros grupos experimentais, com o grupo 4 apresentando menores valores de perda óssea linear. Aos sete dias, o G4 apresentou diferenças estatisticamente significantes com os grupos: G1, G2(RAR), G3(LED) e DP+. Essas diferenças também se apresentaram nos grupos: DP+ *versus* G2, G5(TFDa) e G6(ERI) e SDP *versus* G1, G2, G3, G5, G6. Na avaliação de quinze dias, os resultados demonstraram diferenças entre o G4, DP+ e SDP e todos os outros grupos experimentais. A análise intra-grupos mostrou diferenças significantes entre G6.3d e G6.7d e G6.3d e G6.15d ($p < 0,05$).

Nos grupos tratados com RAR + TFDa houve menores percentuais de tecido mole e maiores percentuais de tecido ósseo.

Os valores médios percentuais de tecido mole (englobando tecido inflamatório remanescente, fibras em neoformação, etc.) estão expressos na figura 11. O maior valor (86,78%) foi apresentado pelo grupo com Doença Periodontal Máxima, e o menor valor (23,27%, referente ao espaço do ligamento periodontal normal da área) foi do grupo Sem Doença Periodontal, sendo que a diferença entre eles foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). No período de 3 dias todos os grupos apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo DP+. Aos 7 dias, o G4 apresentou os menores valores numéricos, embora sem diferenças estatisticamente significantes. Estas aconteceram apenas entre os grupos G1, G2 e G3 *versus*

DP+ ($p<0,05$). Aos quinze dias, as diferenças ocorreram em todos os grupos *versus* DP+ e nos grupos G2 e G3 *versus* SDP. A análise intra-grupos não mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$).

Figura 11. Porcentagem de tecido mole na bifurcação dos primeiros molares inferiores (PMI). Houve diferenças estatisticamente significantes entre grupos para os grupos SDP *versus* DP+. No período de 3 dias todos os grupos apresentaram diferenças significativas do grupo DP+. Aos 7 dias, o G4 apresentou os menores valores numéricos, embora sem diferenças estatisticamente significantes. Esta aconteceu apenas entre os grupos G1, G2 e G3 *versus* DP+ ($p<0,05$). Aos quinze dias, as diferenças ocorreram em todos os grupos *versus* DP+ e nos grupos G2 e G3 *versus* SDP. A análise intra-grupos não mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$).

A figura 12 mostra os valores percentuais médios de tecido ósseo na bifurcação dos PMI. O maior valor (63,46%) foi do grupo Sem Doença Periodontal, e o menor valor (13,29%) do grupo com Doença Periodontal Máxima, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). Para todos os tempos os valores numéricos que mais se aproximaram do grupo SDP foram os do G4, embora sem diferença estatística. No período de três dias, a única diferença observada foi entre o G6 e o DP+. Com sete dias, os resultados demonstraram diferenças entre DP+ *versus* G4, G5 e G6. Aos quinze dias, todos os grupos apresentaram diferenças estatísticas quando comparados a DP+ (para todas as avaliações, $p<0,05$). Houve uma tendência nos grupos de aumento progressivo com o tempo, com todos

aproximando, no período de 15 dias, do valor médio do Grupo SDP. A análise intra-grupos não mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$).

Figura 12. Porcentagem de tecido ósseo na bifurcação dos primeiros molares inferiores. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para o grupo SDP *versus* DP+ ($p<0,05$). Para todos os tempos os valores numéricos que mais se aproximaram do grupo SDP foram do G4, embora sem diferença estatística. No período de três dias, houve diferença significativa entre G6 e DP+. Com sete dias, os resultados demonstraram diferenças entre DP+ *versus* G4, G5 e G6. Aos quinze dias, todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados a DP+ (para todas as avaliações, $p<0,05$). A análise intra-grupos não mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$).

A secreção de osteopontina e o número de células TRAP positivas foram menores no grupo tratado com RAP + TFDa;

A análise descritiva da porcentagem da secreção de osteopontina na área da bifurcação avaliada foi utilizada como marcador da atividade de osteoblastos. A figura 13 demonstra esses valores médios. Esse resultado descritivo sugere que há um aumento nos níveis de osteopontina nos grupos sem tratamento, indicando intensa atividade osteoblástica, que os níveis diminuem com o tempo, até atingir em todos os grupos, no período de 15 dias, níveis próximos do grupo SDP. Além disso, em todos os tempos, os menores níveis absolutos de osteopontina estão relacionados ao G4.

Figura 13. Valores médios da porcentagem de osteopontina secretada na matriz óssea. . O resultado descritivo sugere que há um aumento nos níveis de osteopontina nos grupos sem tratamento, indicando intensa atividade osteoblástica, que os níveis diminuem com o tempo, até atingir em todos os grupos, no período de 15 dias, níveis próximos do grupo SDP. Além disso, em todos os tempos, os menores níveis absolutos de osteopontina estão relacionados ao G4.

A técnica de imuno-histoquímica utilizada para a detecção de células TRAP positivas foi altamente específica, havendo ausência de coloração dessas proteínas no controle negativo. A quantificação dos valores médios está representada na figura 14. No período de três dias foram observadas diferenças entre o G4 e os grupos G1 e G2. Significância estatística das diferenças também foi observada no G1 *versus* todos os grupos experimentais e no G3 quando comparado ao G2 e G6 (para todas as análises, $p < 0,05$). No tempo de 7 dias, diferenças significantes ocorreram entre o G4 e os grupos G1, G3, G5 e G6, além de entre G1 *versus* G2 e G5. Aos quinze dias, o número de células TRAP positivas foi numericamente menor do que nos períodos de 3 e 7 dias para todos os protocolos de tratamento. O G4 apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparado com o G3 e G5 ($p < 0,05$). Diferenças estatísticas foram observadas ainda entre DP+ e SDP, e entre DP+ e SDP *versus* todos os grupos de tratamento (para todos os tempos experimentais). Na análise intra-grupos, as diferenças foram entre: G4.7d e G4.15d, G1.3d e G1.15d, G2.7d e G2.15d, G3.3d e G3.7d, G3.3d e G3.15d, G6.3d e G6.15d e G6.7d e G6.15d ($p < 0,05$).

Figura 14. Valores médios do número de células TRAP positivas por mm². No período de três dias foram observadas diferenças significantes entre o G4 *versus* G1 e G2, entre G1 *versus* todos os outros grupos de tratamento e entre G3 *versus* G2 e G6. No tempo de 7 dias, diferenças significantes ocorreram entre o G4 e os grupos G1, G3, G5 e G6, bem como entre G1 *versus* G2 e G5. Aos quinze dias, o número de células TRAP positivas foi numericamente menor do que nos períodos de 3 e 7 dias para todos os protocolos de tratamento. O G4 apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparado com G3 e G5. Diferenças estatísticas foram também observadas entre DP+ e SDP, e entre DP+ e SDP *versus* todos os grupos (para todos os tempos experimentais). Na análise intra-grupos, as diferenças significantes foram entre: G4.7d e G4.15d, G1.3d e G1.15d, G2.7d e G2.15d, G3.3d e G3.7d, G3.3d e G3.15d, G6.3d e G6.15d e G6.7d e G6.15d ($p < 0,05$).

Análise imunoenzimática de moléculas relacionadas com a reabsorção óssea mostrou melhores resultados no grupo tratado com RAR + TFDa.

A figura 15 mostra a quantificação de RANKL, marcador relacionado ao processo de reabsorção óssea. A maior quantificação foi obtida pelo grupo de doença periodontal máxima, e a menor pelo grupo sem doença periodontal. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SDP *versus* DP+. Para o tempo de três dias, o G4 apresentou diferenças significantes em relação aos grupos G1, G2, G3 e G5. Diferenças estatísticas também foram encontradas entre os grupos G1 *versus* G6, bem como entre todos os grupos *versus* SDP. Nenhuma diferença estatisticamente significante foi encontrada para o período de 7 dias. Aos quinze dias, houve significância nas diferenças entre DP+ e todos os grupos (para todas estas comparações, $p < 0,05$). Na análise intra-grupos, houve diferenças estatisticamente significantes entre: G4.3d e G4.7d, G4.3d e G4.15d, G1.3d e G1.7d, G1.3d e G1.15d ($p < 0,05$).

Figura 15. Quantificação tecidual de RANKL. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SDP *versus* DP+. Para o tempo de três dias, o G4 apresentou diferenças com: G1, G2, G3 e G5. Diferenças também foram encontradas entre os grupos G1 e G6 e todos os grupos *versus* SDP. Nenhuma diferença estatisticamente significante foi encontrada para o período de 7 dias. Aos quinze dias, a diferença encontrada foi entre DP+ e todos os grupos (para todas estas comparações, $p < 0,05$). Na análise intra-grupos, houve diferenças estatisticamente significantes entre: G4.3d e G4.7d, G4.3d e G4.15d, G1.3d e G1.7d, G1.3d e G1.15d ($p < 0,05$).

A quantificação de Osteoprotegerina (OPG) (Figura 16) mostrou diferenças estatisticamente significantes períodos de período de três e sete dias entre o G4 e todos os outros grupos experimentais, além de todos os grupos *versus* SDP. Aos 15 dias, as diferenças significantes foram: G4 *versus* G3, G5, G6 e DP+. Essas diferenças também foram observadas entre G1 e G2 *versus* DP+ e também entre o G1, G2, G3, G5 e G6 *versus* SDP. As diferenças entre os grupos DP+ e SDP também foram significantes (para todas as análises, $p < 0,05$). Na análise intra-grupos não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Figura 16. Quantificação tecidual de OPG. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas no período de três dias entre o G4 e todos os grupos experimentais, além de todos os grupos *versus* SDP. Com sete dias, houve a manutenção das diferenças encontradas entre o G4 e todos os grupos e do grupo SDP *versus* os demais grupos experimentais. Aos 15 dias, as diferenças foram: G4 *versus* G3, G5, G6 e DP+. Essas diferenças também foram observadas entre G1 e G2 *versus* DP+ e também nos grupos G1, G2, G3, G5 e G6 *versus* SDP. Os grupos DP+ e SDP também demonstraram essa diferença ($p < 0,05$). Na análise intra-grupos não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

A relação RANKL/OPG é um importante parâmetro de avaliação do metabolismo de neoformação/destruição óssea. A figura 17 mostra os valores dessa relação (RANKL/OPG x 100) nos grupos experimentais. O menor valor é o do grupo sem doença periodontal, e o grupo que recebeu como tratamento a RAR + TFDa apresenta tendência de se aproximar desse valor com o tempo. Aos três dias foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo G4 e DP+, bem como entre G4 e todos os outros grupos experimentais; além disso, houve significância nas diferenças entre SDP *versus* G1, G2, G3, G5 e G6 e DP+ *versus* SDP. No tempo de sete dias, as diferenças significantes foram entre G1, G5 e G6 *versus* SDP. Na avaliação de 15 dias, essas diferenças foram entre os grupos G1, G5 e G6 *versus* SDP e G2 e G4 *versus* DP+. A análise intra-grupos mostrou diferenças estatisticamente significantes entre G1.3d e G1.15d, G5.3d e G5.7d e G5.7d e G5.15d ($p < 0,05$).

Figura 17. Relação entre as concentrações de RANKL/OPG x 100. Aos três dias foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo G4 e todos os grupos experimentais e DP+, bem como entre SDP *versus* G1, G2, G3, G5 e G6 e DP+ *versus* SDP. No tempo de sete dias, as diferenças foram entre o G1, G5 e G6 *versus* SDP. Na avaliação de 15 dias, essas foram entre os grupos G1, G5 e G6 *versus* SDP e G2 e G4 *versus* DP+. A análise intra-grupos mostrou diferenças estatisticamente significantes entre G1.3d e G1.15d, G5.3d e G5.7d e G5.7d e G5.15d ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Discussão

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da TFDa como adjuvante para o tratamento da doença periodontal induzida por ligaduras em ratos, por meio da análise de parâmetros histomorfométricos, imuohistoquímicos e imunoenzimáticos. Os resultados obtidos demonstram melhoras estatisticamente significantes em vários parâmetros avaliados no grupo onde a TFDa foi usada como adjuvante à RAR.

A presença de microrganismos é fundamental para o início da doença periodontal, mas a amplificação e progressão desse processo é altamente dependente da resposta inflamatória e imunológica gerada pelo hospedeiro frente às bactérias ou a seus produtos. O sucesso da terapia periodontal é baseado no controle quantitativo e qualitativo dos microrganismos responsáveis pela instalação e perpetuação da doença e na redução dos sinais inflamatórios. A terapia convencional estabelecida para o tratamento da doença periodontal consiste basicamente na realização da raspagem e alisamento radicular, associada ou não a agentes antimicrobianos. Essa forma de tratamento é capaz de reduzir a carga bacteriana e atingir um bom efeito terapêutico na maioria dos casos (Badersten et al. 1987, Berkstein et al. 1987, Killoy 1998).

Entretanto, em alguns casos o sucesso da terapia convencional pode não ser totalmente alcançado, principalmente no que se refere à eliminação de depósitos bacterianos, ou seus produtos, em áreas profundas de bolsas periodontais e em regiões de complexa morfologia radicular, como na região das bifurcações, invaginações e concavidades (Wasserman e Hirschfeld, 1998). Além disso, o aumento na prevalência de resistência bacteriana aos antimicrobianos pode influenciar na eficácia da terapia convencional (Slots e Rams 1990, Walker, 1996). Desse modo, pesquisas recentes têm buscado novas modalidades terapêuticas que possam agir como adjuvantes à terapia convencional de combate à ação microbiana (Taubman et al., 2005).

No presente estudo foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), em todos os períodos de avaliação histomorfométrica, em relação ao parâmetro da perda óssea alveolar, ao comparar o grupo que foi tratado apenas com RAR com o grupo onde a TFDa foi associada à RAR. Observou-se também que ao realizar apenas a RAR, os valores médios se mantiveram estáveis ao longo dos períodos avaliados, enquanto que no grupo onde foi realizada RAR + TFDa, esses valores diminuíram. Além disso, o grupo RAR + TFDa apresentou um maior percentual de tecido ósseo na área de bifurcação (e consequentemente, menor porcentagem de tecido mole).

Considerando que a TFDa não é um método mecânico, é esperada a ocorrência de cálculo residual com seu uso isolado (de Oliveira et al., 2007). Este fato pode dificultar a penetração do fotossensibilizador e, assim, reduzir o seu efeito (Polansky et al., 2009). Dessa forma, tratamentos combinados (RAR + TFDa) podem ser indicados, pois RAR e TFDa podem ter efeitos sinérgicos ou mesmo aditivos (Polansky et al., 2009). A RAR pode fisicamente reduzir a biomassa bacteriana sobre a superfície radicular e na bolsa periodontal, enquanto que a TFDa apresenta um diferente espectro de atividade devido à sua natureza não invasiva e habilidade em eliminar microrganismos, causando alterações na membranas e/ou proteínas da membrana plasmática e lesões no DNA bacteriano (Polansky et al., 2009). Os resultados histomorfométricos do presente estudo concordam com tais afirmativas, pois embora a RAR ou TFDa como tratamentos isolados tenham apresentado certa efetividade (principalmente a RAR), os melhores resultados foram registrados para a associação da remoção mecânica do biofilme por RAR + TFDa, o que corrobora por sua vez estudos realizados em animais (Komerik et al., 2003; Almeida et al., 2007; Almeida et al., 2008b; Qin et al., 2008) e em humanos (Braun et al., 2008; Andersen et al., 2007) os quais demonstraram que a TFDa pode ser útil como adjuvante à terapia mecânica no tratamento da doença periodontal.

A osteopontina é uma citocina pró-inflamatória multifuncional que também está relacionada com a resposta imune, inflamação e algumas doenças degenerativas (Jansson et al.,

2002; Hur et al., 2006). Sua relação com a resposta imune e inflamatória inclui a regulação do equilíbrio Th1/Th2 (Ashkar et al., 2000) e regulação da produção de IL – 17 (Shinohara et al., 2008). Além disso, também atua na regulação da resposta imune inata, aumentando o acúmulo de neutrófilos e de macrófagos nos locais de injúria (Banerjee et al., 2006; Diao et al., 2004; Giachelli et al., 1998). No presente estudo foi realizada a marcação da secreção de osteopontina como indicador da atividade de osteoblastos. O gráfico descritivo (Figura 13) sugere que os níveis de osteopontina estão aumentados nos grupos sem tratamento, indicando intensa atividade osteoblástica, provavelmente em resposta à maior intensidade e persistência do processo inflamatório, e que os menores valores para todos os tempos foram correlacionados ao G4. Observou-se ainda que os níveis diminuíram com o tempo em todos os grupos de tratamento, até atingir, no período de 15 dias, níveis próximos do grupo SDP.

O osteoclasto é um macrófago específico formado pela diferenciação de células precursoras de monócitos/macrófagos na superfície óssea ou perto dela, em resposta a fatores osteoclastogênicos, principalmente contra o RANKL, o qual desempenha um papel importante na diferenciação dos osteoclastos e pode mediar e ativar este processo (Boyle et al 2003; Burgess et al.1999; Teitelbaum 2000). Estas células em diferenciação expressam TRAP e evoluem se fundindo para produzir células multinucleadas capazes de reabsorver uma matriz mineralizada (Bilezikian et al. 2002). Garcia et al., 2013a, avaliaram os efeitos da TFDa (100 µg /mL de AM) na reabsorção óssea, utilizando marcação de células TRAP positivas. Os resultados obtidos revelaram uma intensa atividade de reabsorção óssea no tempo de 7 dias, que foi gradualmente reduzida em 15 e 30 dias. Além disso, os animais tratados com RAR + TFDa usando 100 µg /mL de AM apresentaram um menor número de células marcadas pelo TRAP quando comparado ao grupo que recebeu a RAR isoladamente. Os resultados do presente estudo concordam com esses dados: foi observado um pico na marcação de células TRAP positivas no período de 7 dias no G2, G4 e G6, e em todos os grupos houve uma diminuição desses valores no tempo de 15 dias. Outro achado importante foi um menor número

de células TRAP positivas no tempo de três dias no G4 quando comparado ao G2, sendo essa diferença média de 6 células (aproximadamente 15% do valor médio de células par os dois grupos).

As proteínas RANKL e OPG modulam a osteoclastogênese. RANKL é uma molécula-chave na ativação dos osteoclastos e OPG é um importante receptor para RANKL. Dessa forma, a relação RANKL/OPG determina a velocidade e a intensidade da reabsorção óssea mediada pela osteoclastogênese (Kajiya et al., 2010). Estudos prévios mostraram que a diminuição dos níveis de RANKL após a TFDa ou RAR resultaram numa melhora dos parâmetros clínicos periodontais, podendo assim, servir como um importante marcador da atividade da doença periodontal (de Oliveira et al., 2009; de Oliveira et al., 2007). Os resultados do presente estudo demonstraram uma redução estatisticamente significativa ($p > 0,05$) dos níveis de RANKL do G4 em relação ao G2 (redução de 1,65 pg/mL). Foram encontradas também diferenças intra-grupos entre G4.3d e G4.7d, bem como entre G4.3d e G4.15d, mostrando um processo contínuo de diminuição da concentração dessa molécula nesse grupo experimental.

A OPG atua como um agente protetor, inibindo a diferenciação de osteoclastos (Theoleyre et al., 2004). Garcia et al., 2013a em um estudo realizado em ratos, utilizando a TFDa com AM (azul de metileno) e AT (azul de toluidina) e um laser de baixa intensidade observaram uma redução da expressão de RANKL e um aumento nos valores de OPG. Outros estudos avaliando TFDa (100 µg/mL de AT) em animais (Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2013b) também mostraram uma maior expressão de OPG e uma menor expressão de RANKL. No presente estudo, no grupo tratado com RAR + TFDa houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da expressão de OPG em relação à RAR isolada (7,66 pg/mL – 3 dias e 7,14 pg/mL – 7 dias) e a todos os outros grupos experimentais nos tempos de 3 e 7 dias.

A relação RANKL/OPG tem sido utilizada para determinar a diferenciação e ativação dos osteoclastos. Assim, o balanço entre esses dois fatores é importante modulador da

reabsorção óssea (Theoleyre et al., 2004). O aumento dessa razão está associado à formação óssea, enquanto a sua diminuição está associada à reabsorção óssea (Cochran, 2008). Estudos clínicos (Kawai et al., 2006; Wara-aswapati et al., 2007; Crotti et al., 2003; Mogi et al., 2004; Bostanci et al., 2007; Lu et al., 2006) investigaram as concentrações de RANKL e OPG em tecidos gengivais ou fluido crevicular, extraídos a partir de indivíduos com periodontite para determinar a relação RANKL/OPG. Embora tenham ocorrido variações nas concentrações de RANKL e OPG em alguns estudos, a tendência geral foi a mesma: os valores da relação RANKL/OPG foram maiores nos indivíduos com periodontite (Kawai et al., 2006; Wara-aswapati et al., 2007; Crotti et al., 2003; Mogi et al., 2004; Bostanci et al., 2007; Lu et al., 2006), evidenciando o papel crítico do RANKL na osteoclastogênese e na perda óssea na doença periodontal (Taubman et al., 2007). Os resultados do presente estudo concordam com estes achados da literatura, pois o grupo que recebeu a TFDa em associação com a RAR e mostrou histomorfometricamente menos destruição periodontal também apresentou valores reduzidos da relação RANKL/OPG (mostrada em múltiplo de 100 para melhor visualização gráfica na Figura 17) quando comparado aos outros grupos.

O fotossensibilizador e a fonte de luz ideal devem ser atóxicos para os seres humanos e ter uma combinação adequada de emissão de comprimento de onda e absorção por parte do corante. A eritrosina é atualmente usada na rotina clínica como um agente de evidênciação de placa e na TFDa, em estudos *in vitro*, demonstrou induzir a morte celular bacteriana em biofilmes de *S. mutans* (Wood et al., 2006; Metcalf et al., 2006). Costa et al., 2012a, mostraram que a TFDa utilizando a eritrosina em associação ao LED apresentou atividade antifúngica na candidíase bucal, sem que houvesse danos para os tecidos adjacentes e com uma redução significativa da aderência da *C. albicans* às células epiteliais bucais. Seus efeitos benéficos também foram observados contra o *A.a* em um estudo realizado por Goulart et al., 2010b, no qual foram comparados os efeitos da associação do AM ou da eritrosina a um fotopolimerizador

de resina odontológica, e foram observados resultados mais favoráveis no grupo em que a eritrosina foi utilizada.

Garcia et al., em 2013a, realizaram um estudo comparativo em ratos utilizando duas concentrações de AM e AT (100 µg/mL e 10 mg/mL) e um laser indium–gallium–aluminum–phosphorus (laser de baixa intensidade) com comprimento de onda de 660 nm. A análise dos dados revelou uma diminuição da inflamação e uma redução significativa da perda óssea na região de bifurcação dos animais tratados com RAR+TFDa, tanto com o AM como com o AT, principalmente nas concentrações mais baixas. No entanto, ao utilizar o AM na concentração de 10 mg/mL o grupo de 15 dias não obteve um controle efetivo da perda óssea. No presente estudo foi observada uma redução da perda óssea alveolar estatisticamente significativa ($p<0,05$) nos três períodos avaliados.

Diversos estudos foram desenvolvidos utilizando a concentração de 100 µg/mL de AM (Almeida et al., 2007; Almeida et al., 2008a) ou AT (Almeida et al., 2008b; Fernandes et al., 2009; Garcia et al., 2013a), e obtiveram resultados favoráveis ao usar a TFDa como adjuvante a RAR para o tratamento da periodontite induzida em ratos. Por outro lado, os ensaios clínicos em humanos têm utilizado o AM na concentração de 10 mg/mL (Braun et al., 2008; Christodoulides et al., 2008; Chondros et al., 2009; de Oliveira et al., 2009), e alguns destes revelaram que não há vantagens no uso de TFDa como terapia adjuvante para o tratamento da doença periodontal (Christodoulides et al., 2008; Chondros et al., 2009). No presente estudo, o uso da RAR + TFDa com uma concentração muito baixa de eritrosina (1,0 mg/mL) houve benefícios na diminuição da perda óssea alveolar demonstrada tanto por parâmetros histomorfométricos (redução da perda óssea periodontal), imunohistoquímicos (atividades osteoblástica e osteoclástica mais próxima do grupo sem doença periodontal) e imunológicos (níveis mais próximos do grupo sem doença periodontal para RANKL, OPG e relação RANKL/OPG).

CONCLUSÃO

Conclusão

O uso coadjuvante da TFDa, utilizando eritrosina e fonte de luz LED, em associação à raspagem e alisamento radicular apresentou os melhores resultados terapêuticos no tratamento da doença periodontal induzida por ligaduras em animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 74(5):656-669.
- Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontology* 2000 2004; 36:121-45.
- Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. *J Periodontol* 1988; 59:222-230.
- Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque related-diseases. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33:8-13.
- Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007; 78:566-575.
- Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. (a). In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008; 79:1081-1088.
- Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG. (b). Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008; 79:2156-2165.
- Andersen R, Loeble N, Hammond D. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007; 18:34-38.
- Andrade, A.K.P.; De Micheli, G.; Feist, I.S. Utilização do Laser de Diodo de Alta Potência em Periodontia e Implantodontia: Revisão de Literatura. *Rev Odontol USP*. v.19, n.3, p.312-9, 2007. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature* 2000; 408:535-536.
- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000; 5454:860-864.
- Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies R-M. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2010; 26:118-132.
- Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. 4-year observations of basic periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1987; 14:438-444.
- Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK. Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J Pathol* 2006 208:473-485.
- Berkstein S, Reiff RL, McKinney JF, Killoy WJ. Supragingival root surface removal during maintenance procedures utilizing an air-powder abrasive system or hand scaling. An in vitro study. *J Periodontol* 1987; 58:327-330.
- Bezerra MM, de Lima V, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha RAC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000; 71:1009-1014.
- Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol* 1998; 68:370-376.

- Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan G.A. Principles of bone biology. San Diego: *Academic Press* 2002 3-16.
- Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol* 2007; 34:370-376.
- Boyle WJ, Simonet W.S, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423: 337–342.
- Braun A, Dehn C, Kraus F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35:877–884.
- Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *Journal of Cell Biology* 1999; 145:527–538.
- Cesar-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking modulates interleukin-6: interleukin-10 and RANKL: osteoprotegerin ratios in the periodontal tissue. *J Periodontol Res* 2007; 42:184-191.
- Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009; 24:681-688.
- Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008; 79:1638-1644.
- Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008; 79:1569-1576.
- Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. (a). Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 114:67-74.
- Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. (b). The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses* 2012; 55:56-63.
- Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res* 2003; 38:380-387.
- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007; 78:965–973.
- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes Jr, AB, Garlet GP, Souza RA, Taba Jr M, Souza SLS, Ribeiro, FJ. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: Cytokine Profile in Gingival Crevicular Fluid, Preliminary Results. *J Periodontol* 2009;80:98-105.
- Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onóe K, Denhardt D, Rittling S, Uede T.

- Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 2004; 21:539-550.
- Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* 1992; 37:883-887.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* 2011; 87:895-903.
- Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de 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*. 2011; 38:1106-14.
- Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH. (a). Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontol Res* 2013 Nov 9. doi: 10.1111/jre.12138. [Epub ahead of print].
- Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, Ervolino E, Theodoro LH. (b). Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* 2013; 84:556-65.
- Garlet GP, Cardoso, CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:12-20.
- Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152:353-358.
- Goulart RD, Bolean M, Paulino TD, Thedei G, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P.(a). Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010; 28:53-60.
- Goulart R, Thedei G, Souza S, Tedesco A, Ciancaglini P.(b). Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010; 28:85-90.
- Henry CA, Judy M, Dyer B, Wagner M, Matthews J. Sensitivity of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in liquid media to argon laser. *Photochem Photobiol* 1995; 61:410-413.
- Huang S, Lu F, Zhang Z, Yang X, Chen Y. The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1 α in rat experimental periodontitis. *J Periodontol* 2011; 82:934-941.
- Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat. Immunol* 2006; 8:74-83.
- Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in *eta-1/osteopontin*-deficient mice. *J Immunol*. 2002; 168:2096-2099.
- Jin H, Huang X, Chen Y, Zhao H, Ye H, Huang F, Xing X, Cai. Photoinactivation effects of hematoporphyrin monomethyl ether on gram-positive and -negative bacteria detected by atomic force microscopy. *J Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 88:761-770.

- Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol* 2010; 8;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5532.
- Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006; 169:987-998.
- Killoy WJ. Chemical treatment of periodontitis: local delivery of antimicrobials. *Int Dent J* 1998;48:305-315. Review.
- Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:932-940.
- Koom HK, Leung AWN, Yue KKM, Mak NK. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology* 2006; 25:205-215.
- Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, Graves DT. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 2006; 85:510-514.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36:177-187.
- Lulic M, Leiggener Gorog I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36:661-666.
- Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2006; 41:354-360.
- Marques MR, dos Santos MC, da Silva AF, Nociti FH Jr, Barros SP. Parathyroid hormone administration may modulate periodontal tissue levels of interleukin-6, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in experimental periodontitis. *J Periodontal Res* 2009; 44:744-750.
- Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:190-192.
- Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83:166-169.
- Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr. G, Tedesco A, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 353-359.
- Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36:575-580.
- Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2008; 43:162-167.
- Raghavendra M, Koregol A, Bhola S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J* 2009; 54:102-109.

- Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int* 1994; 18:617-28.
- Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* 1966; 3:193-204.
- Russel AL. Epidemiology of periodontal disease. *Int Den Journal* 1967; 17:282-296.
- Sahu K, Bansal H, Mukherjee C, Sharma M, Gupta PK. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of toluidine blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2009; 96:9–16.
- Sallum AW, Martins AG, Sallum EA. A doença periodontal e o surgimento de um novo paradigma. In: *Periodontia Médica: Uma abordagem integrada*. Editora Senac São Paulo. p. 21-39, 2004.
- Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 1993; 28:204–210.
- Sharma CG, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2006; 77:1674-80.
- Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, Cantor H. Engagement of the Type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* 2008; 29:68–78.
- Silva JR, Cardoso G, Maciel RR, de Souza NC. Morphological alterations on *Citrobacter freundii* bacteria induced by erythrosine dye and laser light. *Lasers Med Sci* 2013 Aug 24.
- Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* 1990;17:479-493.
- Socransky SS. Microbiology of periodontal disease – present status and future considerations. *J Periodontol* 1977; 48:497-504.
- Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2595–2601.
- Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharm Res* 2000; 17:405–9.
- Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005; 76:2033-2041.
- Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *J Clin Periodontol* 2007; 34:367-369.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000 ; 289:1504–1508.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:457-475.
- Wainwright, W. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:13–28.
- Wainwright W. Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. *Dyes and Pigments* 2005; 73:7-12.

Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol* 2000 1996;10:79-88.

Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadam A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL up regulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2007; 78:1062-1069.

Wasserman B, Hirschfeld I. The relationship of initial clinical parameters to the long-term response in 112 cases of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998;15:38-42.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.

Wood SR, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B* 1999; 50:1-7.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:680-684.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do comitê de ética no uso de animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.693.53.0), intitulado "Avaliação Histomorfométrica e Imunoenzimática do Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Doença Periodontal Induzida, Utilizando Fármaco e Fonte de Luz de Baixo Custo. Estudo *in vivo* em ratos", de autoria de **Paula Gabriela Faciola Pessoa de Oliveira** e de **Sérgio Luis Scombatti de Souza**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP** foi aprovado em reunião da CEUA de 03.10.2012.

Colaboradores: Arthur Belém Novaes Junior;
Mário Taba Junior
Daniela Palloto
Marcio F.M. Grisi
Michel Messoria

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.693.53.0), entitled: "Avaliação Histomorfométrica e Imunoenzimática do Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Doença Periodontal Induzida, Utilizando Fármaco e Fonte de Luz de Baixo Custo. Estudo *in vivo* em ratos", by **Paula Gabriela Faciola Pessoa de Oliveira** and **Sérgio Luis Scombatti de Souza**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the **Campus of Ribeirão Preto – USP**, and was approved in the meeting, October, 3 2012.

Ribeirão Preto, 17 de outubro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7064

Anexo B – Artigo científico submetido para publicação no Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.

TITLE PAGE

Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical, immunohistochemical and immunoenzymatic evaluation.

Paula Gabriela Faciola Pessôa de Oliveira (paulapessoa@usp.br)^a

Adriana Maria Mariano Silveira e Souza (drisilvesouza@gmail.com)^a

Arthur B. Novaes Jr. (novaesjr@forp.usp.br), Chairman of Periodontology^a

Mário Taba Jr. (mtaba@forp.usp.br), Professor of Periodontology^a

Michel R. Messoria (m.messoria@forp.usp.br), Professor of Periodontology^a

Daniela B. Palioto (palioto@forp.usp.br), Professor Periodontology^a

Márcio F.M. Grisi (mgrisi@forp.usp.br), Professor of Periodontology^a

Antônio Cláudio Tedesco (atedesco@usp.br), Professor of Chemistry^b

Sérgio L.S. Souza, (scombatti@forp.usp.br), Professor of Periodontology^a

^aDepartment of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Philosophy, Science and Arts, University of São Paulo, Av. Dos Bandeirantes 3900, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Address for correspondence and reprints:

Sérgio Luís Scombatti de Souza

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP)

Departamento de CTBMF e Periodontia, Av. do Café, s/n, 14040-904. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Fax number: +55 16 36024135

E-mail: scombatti@forp.usp.br

ABSTRACT

Scaling and root planing (SRP) may not be always affective in preventing Periodontal Disease (PD) progression. The aim of this study was to evaluate the adjunctive effect of aPDT to SRP on induced PD in rats, analyzing histomorphometrical, immunohistochemical and immunoenzymatic parameters.

Ligatures were placed around the mandibular first molars and maxillary second molars of 60 rats to induce PD. After 14 days, the ligatures were removed and the animals were divided into six groups, with 9 animals each: G1=no treatment; G2=SRP; G3=Light Emitting Diode (LED); G4=SRP+aPDT; G5=aPDT; G6=Erythrosine. The animals were euthanized after 3, 7 and 15 days. There were also two control groups (n=3): Without PD (WPD) induction; with maximum PD (PD+).

In the histomorphometrical analysis of linear bone loss, G4 showed statistically significant differences to other experimental groups after 3 and 15 days. TRAP positive cells counting was significantly lower in G4 when compared to G2 and PD+ after 3 days. Immunoenzymatic assay showed significantly lower levels of RANKL for G4 when compared to G1, G2, G3, G5 and PD+ after 3 days, and higher levels of Osteoprotegerin (OPG) for G4 when compared to all other experimental groups after 3 and 7 days (for all analysis, ANOVA one way + Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$).

The adjunctive use of aPDT in combination with SRP showed the best therapeutic results in the treatment of periodontal disease in rats.

Key words: Periodontitis; Photodynamic Therapy, Erythrosine.

Introduction

Periodontitis is a multifactorial disease initiated by the presence of bacterial biofilm that interacts with host defense mechanisms [1,2], and causes intense inflammatory response and alveolar bone resorption, leading to tooth loss [3].

Bone resorption is a complex biological event, mediated by many molecules. The receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK)–RANK ligand (RANKL)–Osteoprotegerin (OPG) system is one of the main local regulators of bone metabolism, including alveolar bone, and also plays a critical role in the development and functioning of the immune system, representing a molecular link between the immune system and bone metabolism. RANKL binds directly to RANK on the surface of osteoclast progenitors or mature osteoclasts, promoting osteoclast formation and activation, as well as inhibition of mature osteoclast apoptosis. OPG is a decoy receptor for RANKL, and it prevents interaction with RANK. The RANKL–OPG ratio holds major responsibility for the regulatory activity of osteoclasts, and it can be assessed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity for revision [4,5].

Osteopontin (OPN) is phosphoprotein with various roles in the immune responses. It is secreted by T cells, macrophages and osteoblasts, binds to a series of integrins, as an intact protein or as proteolytically cleaved fragments [6]. Its activities associated with immune/inflammatory responses include regulation of Th1/Th2 balance [7], enhancement of dendritic cell function [8] and regulation of IL-17 production [9]. It is also important in the regulation of the innate immune response, enhancing the accumulation of neutrophils and macrophages at sites of injury [10, 11].

The aim of periodontal treatment is to reestablish the biocompatibility of radicular surfaces exposed by disease, by removing periodontopathogenic microorganisms, thus allowing for the subsequent attachment of periodontal tissues [12]. Most commonly, this can be achieved by mechanical scaling and root planing (SRP) [13]. However, such treatment is not always successful because it is often difficult to reduce bacterial deposits and their endotoxins from deeper periodontal pockets. Alternative mechanisms of antimicrobial therapy, such as local and systemic antibiotics, have been proposed to address these limitations [14]. Furthermore, many bacterial strains have gained resistance to antimicrobial agents often used in parallel to mechanical instrumentation. In this way, a new approach to periodontal treatment, called antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), involves the use of low-intensity light and a nontoxic photosensitizer agent [15] to reduce periodontal pathogens. aPDT has the advantages of being a specific therapy-targeting cell, having no collateral effects, and do not lead to the selection of resistant bacterial species [16]. In the aPDT, reactive oxygen is produced to kill target cells when the photosensitizer is excited by light in the presence of oxygen [16].

Light emitting diodes (LED) have been described as a promising light source for use as lasers substitute, because they are characterized by wider emission bands, are smaller in size, weigh less, cost less, exhibit greater flexibility in terms of the irradiation time, can be used in treatment and are easy to operate [17]. Furthermore, blue LED are already used in dentistry as bleaching tools that do not damage

oral tissues, as a substitute for photopolimerizers in clinical practice. LEDs have shown potent activity in PDT and absence of antimicrobial action when used alone [18].

In recent studies, erythrosine was recognized as an accessible dye with low toxicity [19], showing promising results when used as a photosensitizer in aPDT in *in vitro* studies, promoting the inactivation many gram-positive and gram-negative oral bacteria [20] both connected to dental caries [21] or to periodontal disease [22, 23], as well as other oral microorganisms, like *Candida albicans* [24].

As far as we know, the effects of the association of LED + Erythrosine in aPDT were not yet tested in animal models. In this context, the aim of the present study is to evaluate the effect of aPDT using an accessible light source (LED) and a low cost photosensitive drug (erythrosine), as an adjuvant therapy for Periodontal Disease treatment, evaluating histomorphometrical, immunohistochemical and immunoenzymatic parameters.

Materials and Methods

The study was previously approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation, Campus USP-Ribeirão Preto, Brazil (protocol number: 12.1.693.53.0).

Sample

Sixty adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighing between 200 to 250 g, from the Central Animal Facility at FMRP-USP were selected. Only male rats were used to avoid the influence of hormonal variations on the process of bone repair. The animals were kept in appropriate plastic cages with crumbled die) and water *ad libitum* before and during the experimental period, and remained in the Animal Facility of the Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, in an environment with 12-hour light/dark cycle and temperature from 22°C to 24°C.

Induction of Periodontal Disease (PD)

The induction of periodontal bone loss in rats was done as previously described [25], with minor modifications. The animals were weighed to calculate the correct dose of anesthetic. After intraperitoneal anesthesia with a combination of ketamine and xylazine (4:3, injection of 100-130 µL/100g of the animal): Ketamine (74.1 mg/g - Ketamine Hydrochloride 10% - Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu – SP, BR) and xylazine (11.2 mg/kg - Dopaser, Calier Laboratories S/A, Barcelona, Spain), ligatures (cotton thread nº 24, Coats Corrente, Sao Paulo, BR) were inserted in the subgingival region of the first inferior molars and second superior molars, in order to promote the induction of PD through the accumulation of bacterial biofilm. The inflammatory process resulting from the accumulation of bacterial biofilm is characterized by an acute periodontitis, leading to alveolar bone resorption [26].

Experimental groups

The animals were monitored daily for the period after the placement of the ligatures in order to observe their behavior, as well as feeding and hydration. Neither anti-inflammatory nor antibiotics were used, as they could influence the results of the study. After 14 days, confirming bone loss, the ligatures

were removed. The animals were then randomly divided into 6 experimental groups (G), 9 rats each, and then the following therapeutic procedures were performed in the infected sites:

- GROUP 1 (n = 9) - No treatment was done;
- GROUP 2 (n = 9) - SRP: using mini Gracey curettes (Hu-Friedy®, Chicago IL), through 10 distal mesial traction movements, followed by irrigation with saline solution;
- GROUP 3 (n = 9) – LED: the periodontal pockets formed by the placement of the ligatures were irradiated by LED (Gnatus) with a modified tip, with a wavelength of 450nm and a maximum power of 67 mW/cm², 10 seconds/site (totaling 1 minute/tooth);
- GROUP 4 (n = 9) - SRP + aPDT: scaling and root planing was performed the same way as described for group 2. Then, the Erythrosine dye was applied on a net basis, with a concentration of 1.0 mg/mL, starting from the most apical portion of the pocket to the coronal portion, and was left in site for 1 minute. Then, the sites were again irrigated with saline solution to remove photosensitizer in excess, and after that the pockets were irradiated with the LED, according to what described for group 3.
- GROUP 5 (n = 9) – aPDT: the animals received the application protocol of aPDT described for group 4 (without SRP);
- GROUP 6 (n = 9) – Erythrosine: the photosensitizer was applied as described in group 4 (without SRP and without the LED application).

In addition to the six experimental groups, the study also had two internal controls: one without disease (WDP, n = 3), in which the animals did not receive ligatures: they were also anesthetized and fed equal to other groups and were euthanized after 14 days (Positive Internal Control Without Disease). The 3 remaining rats were the Negative Internal Control (Maximum Disease), with maximum bone loss (PD+, n = 3). These animals received the ligature for 14 days and were euthanized immediately after its removal.

The animals of 6 experimental groups were euthanized by deepening the anesthesia with Sodium Thiopental 150mg/kg (Thiopentax, Cristália, Brazil) intraperitoneally in the periods of 3, 7 and 15 days after the removal of the ligatures (18 animals for each time, 3 of each experimental group).

Laboratorial procedures

The specimens were demineralized with EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid - Merck & Co. Inc., NJ) 4 %, pH 7.4. Serial paraffin sections (6 µm) were obtained in the mesial–distal direction. Some sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and Mallory Trichrome (MT).

For histomorphometrical analysis the histological sections (2 slides/block) were photographed using a Leica Microscope (model DMLB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heidelberg, Germany) with the objective of 2.5 connected to a digital camera (Leica DFC300FX). The measurement of bone loss was performed using an image analyzer software (LAS version 4.1.0, Leica). The following parameters were evaluated: linear distance between the cementum-enamel-junction (CEJ) to the remaining alveolar crest in the distal, mesial and center of bifurcation and measurements of the alveolar bone loss in the furcation region (percentages of soft tissue and bone tissue in the furcation area) (Figure

1A). The linear measurements of each slide were added, obtaining the value of the linear bone loss of the slide, and the average value of two slides resulted in the linear bone loss of the animal.

The area of bifurcation alveolar bone and soft tissue was also measured (percentage of bone and soft tissue present in the area of the bifurcation – Figure 1B, 1C and 1D). A rectangular grid patterned, with an area of 1.5 mm² was positioned in a coronal line to coincide with the roof of the bifurcation of the first mandibular molars. The area between the roots apically bounded by the base of the rectangle was considered as the total area (100%); thereby, the percentage values inside this grid of soft tissue and bone tissue were measured, and again the values for the animals were also calculated as the averages of two slides (soft tissue and bone tissue).

Immunohistochemistry to identify the osteoblasts activity

Sections mounted on gelatinized glass slides (0.5 % gelatin and 0.05% chromium alumin in distilled water) were deparaffinized, rehydrated, and the endogenous peroxidase activity blocked with 1% H₂O₂ (Merck) in PBS (Phosphate Buffered Saline - Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). The nonspecific binding was blocked with PBS containing 2% of BSA (Bovine Serum Albumin - Sigma-Aldrich St. Louis, MO) for 30 minutes at room temperature (RT). Then, the samples were incubated with primary antibody diluted in PBS + BSA 1% for 2 hours at RT in a humid chamber. The slides were then washed thoroughly in PBS and incubated with secondary antibody conjugated to HRP (horseradish peroxidase) diluted in PBS + BSA 1% for 60 min at RT in a humid chamber. After this incubation the slides were rinsed thoroughly in PBS and incubated with 3, 3'- diaminobenzidine (DAB) and H₂O₂ for 20 minutes at RT. Subsequently, they were washed in running water for 10 minutes and counter-stained with Harris hematoxylin. After staining, the slides were dehydrated in ascending series of ethanol (2 minutes in each ethanol concentration): 50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 100%. Finally, the slides were cleared with xylene (2 times for 5 minutes) and mounted with Permount (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA). As negative control, the primary antibody was omitted or replaced with standard IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) at the same concentration used for the primary antibody.

Antibodies

The following antibodies were used: primary antibody to identification of osteoblasts activity – mouse monoclonal antibody anti-rat osteopontin (MPIIB10-1, Developmental Studies Hybridoma Bank), used at a final concentration of 1:800. The secondary antibody was goat anti-mouse HRP (Jackson ImmunoResearch), used at a final concentration of 1:750.

Immunohistochemical analysis for detection of TRAP-positive cells

The histological sections were deparaffinized and rehydrated in a decrease graded series of ethanol. At the end of each stage of the immunohistochemical reaction, the histological slides were washed with PBS (0.1M, pH 7.4). Subsequently, the slides were immersed in hydrogen peroxide 3% for 1 hour and then in BSA 1% for 12 hours to block the endogenous peroxidase and nonspecific sites, respectively. The slides containing samples of each of the experimental groups were incubated with the

primary antibody - goat anti-rat tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) for 24 hours. The sections were then incubated with a biotinylated secondary antibody for 2 hours and subsequently treated with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate for 1 hour. The reaction was developed using the chromogen 3,3'-diaminobenzidine and counterstained with Harris hematoxylin. All samples were accompanied by a negative control (specimens subjected to the aforementioned procedures but without the primary antibodies).

Identification of the osteoblasts and osteoclasts activity

The slides were analyzed and photographed using a trinocular microscope for bright field and fluorescence (model DMLB, Leica Microsystems) with a 2.5x objective coupled to a digital camera (Leica DFC300FX). The analysis of the images was performed using an image analyzer software (LAS version 4.1.0).

To quantify the secretion of osteopontin in the bone matrix, a standard rectangular grid was made (Figure 2A), with an area of 1.5 mm², positioned in its coronal line in order to coincide with the roof of the bifurcation of the first mandibular molars. The area between the roots apically bounded by the base of the rectangle was considered as the total area (100%); from there, was established the areas where there were secretion of osteopontin in the bone matrix (Figure 2B).

The quantification of the TRAP-positive cells was done with a standardized grid. The total area analyzed included an area of 1.5 mm² (Figure 2C) inside the bifurcation of the first inferior molars. The coronal limit of this area coincided with the roof of the bifurcation of the molars, extending 1.5 mm apically. The immunostaining was defined as brownish marks present in the cytosolic cells compartment. The TRAP-positive cells were counted in a 2.5x microscope objective.

Immunoenzymatic dosage of molecules related to bone metabolism

In the soft tissues adjacent to the lingual surface of the maxillary second molars, molecules related to bone resorption (OPG and RANK-L) were quantified by immunoenzymatic assay (Luminex xMAP) using Milliplex[®] Kits (RBN-31K-OPG and RBN-31K-RANK-L – Millipore Corporation, Bedford, MA).

The surrounding soft tissues of the upper molars in which the PD was induced were carefully removed with a dermatological punch n° 2 and stored in PBS containing protease inhibitor cocktail (1:100 - Sigma- Aldrich, St. Louis, MO). After that, the soft tissues were manual and mechanically (Ultra Stirrer ULTRA 80-II, Eikonal do Brasil, São Paulo, SP, BR) homogenized, centrifuged (4,000 rpm / 15 min at 4°C), the supernatants were collected and centrifuged again and then the new supernatants were frozen at -80°C until the cytokine dosage following the manufacturer's recommendations.

Statistical Analysis

The results were expressed as average + standard deviation of the experimental groups in each period, considering the animal as an experimental unit. The significance of differences between groups in each analysis period (3, 7 and 15 days) as well as intra-groups (assessing the differences between the

periods of 3, 7 and 15 days) was verified by the Analysis of Variance (ANOVA one way) followed by the post-hoc Tukey test. For all analysis, the significance level was 5% ($p < 0.05$).

Results

Figure 3 shows the values of linear bone loss. The highest value (6.74 mm) was from the group with PD+, and the lowest value (1.66 mm) from the WPD group, being a statistically significant difference ($p < 0.05$). On the third day, statistically significant differences were observed for G1 (no treatment), PD+ and WPD *versus* all other experimental groups. Furthermore, there was significant differences between G4 (SRP + aPDT) and all other experimental groups, with group 4 exhibiting lower values of linear bone loss. On the seventh day, G4 showed statistically significant differences when compared to G1, G2 (SRP), G3 (LED) and PD+. These differences also occurred between the PD+ group *versus* G2, G5 (aPDT) and G6 (ERI) and between WPD *versus* G1, G2, G3, G5, G6. On day 15 evaluation, the results showed differences between G4, PD+ and WPD to all other experimental groups. The intra-group analysis showed significant differences between G6.3d *versus* G6.7d and G6.3d *versus* G6.15d (for all evaluations, $p < 0.05$).

The average percentages of soft tissue (including remaining inflammatory tissue, neoformed fibers, etc.) and bone tissue in the furcation area of the mandibular first molars (MFM) are shown in Figure 4. The PD+ group presented the highest value (86.78%). The lowest value (23.27%, referring to the normal periodontal ligament space) was from the WPD group, and the difference between them was statistically significant. After 3 days, all other groups showed significant differences to PD+ group. On the seventh day, G4 presented the lowest numeric values, although with no statistically significant differences, which occurred between G1, G2 and G3 *versus* PD+. On the fifteenth day, the statistically significant differences occurred in all groups *versus* PD+ and in G2 and G3 *versus* WPD (for all evaluations, $p < 0.05$). The intra-group analysis showed no statistically significant differences ($p > 0.05$).

The highest value of bone tissue area was from WPD group (63.46%), and the lowest value from the PD+ group (13.29%), and difference between them was significant. For all the experimental times, values of G4 were the closest to the ones of WPD group. After three days, the only statistically significant difference observed was between the G6 and PD+. Within seven days, the results showed significant differences between PD+ *versus* G4, G5 and G6. On the fifteenth day, all groups showed significant differences when compared to PD+ (for all evaluations, $p < 0.05$). There was also a tendency of a progressive increase of values within time in all groups, with all of them approaching, after 15 days, the average value of the WPD group. Intra-group analysis showed no statistically significant differences ($p > 0.05$).

The percentage of osteopontin secretion was used as a marker of osteoblasts activity. Figure 5 shows these average values. This descriptive result suggests that there are increased levels of osteopontin in the untreated groups, indicating intense osteoblastic activity, which levels decrease with

time, reaching in all groups, after 15 days, similar WPD group levels. Furthermore, at all times, the lowest levels of osteopontin on treated groups are related to G4.

The immunohistochemical technique used for detecting TRAP yielded high specificity, as evidenced by the total absence of labeling in the negative controls for the immunohistochemical reactions. The average of the TRAP-positive cells per mm² is shown in Figure 6. For the three-day period, G4 (34) showed significant differences when compared to the groups G1 (57), G2 (40) and PD+ (67). Statistically significant differences were also found between G1 and all the other groups, and between G3 (57) *versus* G2 and G3 *versus* G6 (43). After seven days, the differences were found between G4 (37) *versus* G1 (55), G3 (47), G5 (43) and G6 (47), as well as between G1 *versus* G2 and G1 *versus* G5. On the fifteenth day, the number of TRAP-positive cells was lowest than 3d and 7d for all treatment protocols. The G4 (28) showed significant differences when compared to G3 (38) and G5 (38). The difference between PD+ *versus* WPD were also significant. Furthermore, there was significant difference between WPD and PD+ *versus* all groups on all experimental times (for all analysis, $p < 0.05$). The intra-group analysis showed statistically significant differences between G4.7d and G4.15d, G1.3d *versus* G1.15d, G2.7d *versus* G2.15d, G3.3d *versus* G3.7d, G3.3d *versus* G3.15d, G6.3d *versus* G6.15d and G6.7d *versus* G6.15d ($p < 0.05$).

The quantification of RANKL and OPG is shown on Figure 7. The highest and lowest levels of RANKL were obtained by the PD+ and WPD groups, respectively. There were statistically significant differences between WPD *versus* PD+ group. For the three-day period, G4 (3.69 pg/ml) showed significant differences when compared to G1 (6.44 pg/ml), G2 (5.84 pg/ml), G3 (6.19 pg/ml), G5 (5.94 pg/ml) and PD+ (6.87 pg/ml). Differences were also found between the groups G1 *versus* G6 and between all groups *versus* WPD. No statistically significant differences were found for the period of seven days. On the fifteenth day, there were significant differences between PD+ and all other groups (for all these comparisons, $p < 0.05$). In the intra-group analysis, there were statistically significant differences between G4.3d *versus* G4.7d, G4.3d *versus* G4.15d, G1.3d *versus* G1.7d and G1.3d *versus* G1.15d ($p < 0.05$).

The quantification of OPG showed that the closest values to the WPD group were in the group in which was held SRP + aPDT (G4). Statistically significant differences were observed in the period of three and seven days between G4 and all experimental groups, and between all groups *versus* WPD. On the fifteenth day, the significant differences were: G3 *versus* G4, G5, G6 and PD+. These differences were also observed between G1 and G2 *versus* PD+ and between G1, G2, G3, G5 and G6 *versus* WPD. The differences between WPD and PD+ groups were also statistically significant (for all analysis, $p < 0.05$). The intra-group analysis showed no statistically significant differences ($p > 0.05$).

The RANKL/OPG ratio is an important parameter for evaluating the metabolism of bone destruction/neoformation. Figure 8 shows the values of this ratio (RANKL/OPG $\times$ 100) in the experimental groups. The lowest value is from the WPD group, and the group that received the SRP + aPDT treatment tended to approach this value over time. After three days, statistically significant

differences were observed between G4 and all other experimental groups, as well as *versus* PD+. There were also differences between WPD *versus* G1, G2, G3, G5 and G6, and between PD+ *versus* WPD. After seven days, the significant differences were between G1, G5 and G6 *versus* WPD. On the fifteenth day evaluation, the statistically significant differences were between G1, G5 and G6 *versus* WPD and G2, G4 *versus* PD+. The intra-group analysis showed statistically significant differences between G1.3d *versus* G1.15d, G5.3d *versus* G5.7d and G5.7d *versus* G5.15d (for all analysis, $p < 0.05$).

Discussion

The present study was carried out in order to evaluate the effect of aPDT as an adjuvant for the treatment of ligatures-induced periodontal disease in rats, analyzing histomorphometrical, immunohistochemical and immunoenzymatic parameters. The results showed significant improvements in several parameters evaluated in the group where the aPDT was used as an adjuvant to SRP.

Despite the presence of microorganisms being critical for the onset of periodontal disease, the amplification and progression of this process is highly dependent on the inflammatory and immune response generated by the host in the presence of bacteria or their products. The success of periodontal therapy is based on a quantitative and qualitative control of the microorganisms responsible for establishing and perpetuating the disease and the reduction of the inflammatory signs. The conventional therapy established for the treatment of periodontal disease is basically scaling and root planing, with or without antimicrobial agents. This kind of treatment is able to reduce the bacterial load and to achieve an excellent therapeutic effect in most cases [27].

However, in some cases the success of the conventional therapy might not be fully achieved, especially regarding the elimination of bacterial deposits and their products in areas of deep periodontal pockets and regions of complex root morphology, such as the furcation region, invaginations and concavities [28]. Furthermore, the increased prevalence of bacterial resistance to antimicrobial agents can influence the effectiveness of conventional therapy [29]. Thus, current studies have stimulated the search for new therapeutic modalities that can act as an adjuvant to conventional therapy to combat microbial action [30].

In the present study, statistically significant differences were observed ($p < 0.05$) in all periods of histomorphometrical evaluation regarding alveolar bone loss parameter, when comparing the group treated only with SRP with the group where the aPDT was associated to the SRP. It was also observed that in the SRP group the average values remained stable over the evaluation period, whereas in the group where SRP + aPDT was accomplished, these values decreased. Additionally, the SRP + aPDT group showed a higher percentage of bone tissue in the furcation area (and consequently, a lower percentage of soft tissue).

Considering that the aPDT is not a mechanical method, the presence of residual calculus is expected to occur when this procedure is the single therapy [31]. This can interfere on the penetration of

the light pointer and, thereafter, reduce its effect [32]. That is why combined treatments (SRP + aPDT) may be indicated, considering that SRP and aPDT may have synergistic or even additive effects [32]. The SRP can physically reduce the bacterial biomass on the root surface and in the periodontal pocket, while aPDT exhibits a different spectrum of activity due to its noninvasive nature and the ability to eliminate microorganisms through changes in the membranes and/or membrane proteins and bacterial DNA lesions [32]. The histomorphometric results of this study are in agreement with such statements, since although the SRP or aPDT as isolated treatments have shown some effectiveness (mainly SRP), the best results were achieved with the combination of mechanical removal of the biofilm by SRP + aPDT. Our results corroborate animal [33, 34] and humans studies [35, 36], which demonstrated that the aPDT may be useful as an adjuvant to mechanical therapy in periodontal disease treatment.

Osteopontin is a multifunctional pro-inflammatory cytokine that is also related to the immune response, inflammation and certain degenerative diseases [37]. Its relationship with the immune and inflammatory response includes the regulation of Th1/Th2 balance [7] and IL – 17 production [9]. Besides that, it also participates in the regulation of the innate immune response by increasing neutrophils and macrophages accumulation at injury sites [10, 11]. In present study the secretion of osteopontin was used as an indicator of osteoblasts activity. The descriptive graph (Figure 13) suggests that the levels of osteopontin are increased in the untreated groups, probably in response to the higher intensity and persistence of the inflammatory process, and the lowest values for all experimental periods were correlated to G4. It was also observed that the levels of OPN decreased with time in all groups, reaching values close to the WPD group levels at 15 days.

The effect of aPDT (methylene blue 100 μ g /mL) on bone resorption were positive, when evidenced by TRAP detection [38]. The results revealed intense bone resorption at 7 days, and gradual reduction until 15 and 30 days. Additionally, animals treated with SRP + aPDT presented lower quantity of TRAP positive cells, when compared to the group that received only SRP. The results of present study are in agreement with this data. A peak of TRAP positive cells levels was observed after 7 days on G2, G4 and G6, and in all groups those values diminished after 15 days. Other important finding was a lower rate of TRAP positive cells in 3 days on G4 (34), when compared to G2 (40) – approximately 15% less trap-positive cells.

RANKL and OPG proteins modulate the osteoclastogenesis. RANKL is a key molecule in the activation of osteoclasts and OPG is an important receptor for RANKL. Previous studies have shown that decreased levels of RANKL after aPDT or SRP resulted in improvement of clinical periodontal parameters, and in this way, it can be used as an important marker of periodontal disease [31, 39]. The results of this study demonstrated a statistically significant decrease ($p < 0,05$) in RANKL levels for G4 when compared to G2 (decrease of 1,65 pg/mL, representing 30% of G2 value). Also, there were intra-groups differences between G4.3d *versus* G4.7d and G4.3d *versus* G4.15d.

The OPG acts as a protective agent by inhibiting osteoclast differentiation [40]. A study in rats [38] using aPDT with MB (methylene blue) and TB (toluidine blue) and a low intensity laser, observed

a reduction of RANKL expression and an increase in OPG values. Other animal studies also support this assertion [41, 42]. Our results are in agreement with these previous researches: the group treated with SRP + aPDT showed a statistically significant increase ($p < 0,05$) in the expression of OPG compared to SRP alone (7.66 pg/mL decrease after 3 days and 7.14 pg/mL decrease after 7 days) and to all other experimental groups at 3 and 7 days evaluation periods.

The RANKL/OPG ratio has been used to determine the differentiation and activation of osteoclasts. Thus, the RANKL/OPG ratio determines the speed and intensity of bone resorption mediated by the osteoclastogenesis [43], acting as an important modulator of bone resorption [40]. The increase in this ratio is associated with bone resorption, while its decrease is associated with bone formation [44]. Clinical studies [45, 46, 47] investigated the concentrations of RANKL and OPG in gingival tissues or crevicular fluid extracted from subjects with periodontitis in order to determine the RANKL/OPG ratio. Although there were variations in the concentrations of RANKL and OPG in some studies, the general trend was the same: the values of the RANKL/OPG ratio were higher in patients with periodontitis [45, 46, 47], emphasizing the critical role of RANKL in osteoclastogenesis and bone loss in periodontal disease [48]. The results of the present study are in agreement with these findings, since the group that received the aPDT in association with SRP and showed histomorphometrically less periodontal destruction also showed reduced values of the RANKL/OPG ratio when compared to other groups.

The ideal photosensitizer and light source must be nontoxic to humans and have an appropriate combination of wavelength emission and absorption by the dye. Erythrosine is currently used in clinical practice as a dental plaque disclosing agent and *in vitro* studies have shown that when it is used in aPDT procedures it can induce cell death in bacterial biofilms of *S. mutans* [20, 49]. The aPDT using erythrosine in association with LED light showed antifungal activity in oral candidiasis with a significant reduction in the *C. albicans* adhesion to buccal epithelial cells and without any damage to the adjacent tissues [24]. Its beneficial effects were also observed against *A.a* [23], in which the effects of the combination of MB or erythrosine to a dental resin photopolymerizer were compared, and more favorable results were observed in the group where erythrosine was used.

A comparative study in rats [38] using two concentrations of MB and TB (100 µg/mL e 10 mg/mL) and an indium-gallium-aluminum-phosphorus laser (low intensity laser) with wavelength of 660 nm was conducted. The data analysis revealed a decrease in inflammation and a significant reduction of bone loss in the furcation area of the animals treated with SRP + aPDT with both the MB and the TB, especially at lower concentrations. However, when using MB at a concentration of 10 mg/mL, the fifteenth day group did not obtain an effective control of bone loss. In the present study, a statistically significant reduction of alveolar bone loss ($p < 0.05$) was observed during all the evaluation period.

Several studies were developed using the concentration of 100 µg/mL of MB [33, 34] or TB [38], and favorable results were obtained when using aPDT as an adjuvant to SRP for the treatment of

periodontitis induced in rats. On the other hand, human clinical trials have used the MB in concentration of 10 mg/mL [35,39, 50, 51]; and some of these studies have found that there is no advantage in using aPDT as an adjuvant therapy for the treatment of periodontal disease [50, 51]. In this study, the use of SRP + aPDT with a very low concentration of erythrosine (1.0 mg/mL) showed benefits in the reduction of alveolar bone loss, demonstrated by histomorphometrical (reduction of periodontal bone loss), immunohistochemical (osteoblastic and osteoclastic activity nearest to the group without periodontal disease) and immunological (RANKL, OPG and RANKL/OPG ratio levels closer to the group without periodontal disease) parameters.

Conclusion

It was concluded that the adjunctive use of aPDT (Erythrosine dye + LED) in combination with scaling and root planing showed the best therapeutic results in the treatment of ligature-induced periodontal disease in rats.

Aknowledgements

The authors would like to thank Prof. Dr. Paulo Tambasco, from the Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology - FORP-USP, for providing primary antibody for osteoblasts activity quantification, Profa. Dra. Flávia Furlaneto for the Immunohistochemistry Assay and Amanda Bertin, for assisting the animal experimental procedures. The authors also thanks Brazilian Foundation for the Improvement of Higher Education (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Grant 476313/2011-2), for financial support of the study.

References

- [1] Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36:177-187.
- [2] Socransky SS. Microbiology of periodontal disease – present status and future considerations. *J Periodontol* 1977; 48:497-504.
- [3] Sallum AW, Martins AG, Sallum EA. A doença periodontal e o surgimento de um novo paradigma. In: *Periodontia Médica: Uma abordagem integrada*. Editora Senac São Paulo. p. 21-39, 2004.
- [4] Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 2010;19:345–354.
- [5] Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* 2012;39:239–248.
- [6] Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity and cancer. *Toxicol Sci* 2007; 103:4–13.
- [7] Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000; 287:860–4.
- [8] Renkl AC, Wussler J, Ahrens T et al. Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood* 2005; 106:946–55.
- [9] Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, Cantor H. Engagement of the Type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* 2008; 29:68–78.
- [10] Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK. Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J Pathol* 2006; 208:473–85.
- [11] Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152:353–8.
- [12] Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000 2004; 36:59–97.
- [13] Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993; 64:243–253.
- [14] Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:932–940.
- [15] Wilson M, Dohson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8:182–187.
- [16] Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat* 2005; 4:283–293.

- [17] Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 324–30.
- [18] Soares BM, Silva DL, Sousa GR, Amorim JCF, Resende MA, Pinotti M, Cisalpino PS. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *Photochem Photobiol B Biol* 2009;94:65–70.
- [19] Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque related-diseases. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33:8–13.
- [20] Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:680-684.
- [21] Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr. G, Tedesco A, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 353-359.
- [22] Goulart RD, Bolean M, Paulino TD, Thedei G, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010; 28:53-60.
- [23] Goulart R, Thedei G, Souza S, Tedesco A, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010; 28:85-90.
- [24] Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 114:67-74.
- [25] Bezerra MM, de Lima V, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha RAC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000; 71:1009-1014.
- [26] Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* 1966; 3:193-204.
- [27] Berkstein S, Reiff RL, McKinney JF, Killoy WJ. Supragingival root surface removal during maintenance procedures utilizing an air-powder abrasive system or hand scaling. An in vitro study. *J Periodontol* 1987; 58:327-330.
- [28] Wasserman B, Hirschfeld I. The relationship of initial clinical parameters to the long-term response in 112 cases of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998;15:38-42.
- [29] Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* 1990;17:479-493.
- [30] Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005; 76:2033-2041.

- [31] de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007; 78:965–973.
- [32] Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36:575–580.
- [33] Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007; 78:566–575.
- [34] 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* 2008; 79:2156–2165.
- [35] Braun A, Dehn C, Kraus F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35:877–884.
- [36] Andersen R, Loeble N, Hammond D. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007; 18:34–38.
- [37] Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168:2096–2099.
- [38] Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, 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. *J Periodontal Res* 2013 Nov 9. doi: 10.1111/jre.12138. [Epub ahead of print].
- [39] de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes Jr, AB, Garlet GP, Souza RA, Taba Jr M, Souza SLS, Ribeiro, FJ. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: Cytokine Profile in Gingival Crevicular Fluid, Preliminary Results. *J Periodontol* 2009;80:98-105.
- [40] Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:457-475.
- [41] Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de 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*. 2011; 38:1106-14.
- [42] 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; 84:556-65.

- [43] Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol* 2010; 8;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5532.
- [44] Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008; 79:1569-1576.
- [45] Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasodom A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL up regulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2007; 78:1062-1069.
- [46] Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol* 2007; 34:370-376.
- [47] Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 2006; 41:354-360.
- [48] Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *J Clin Periodontol* 2007; 34:367-369.
- [49] Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:190-192.
- [50] Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008; 79:1638-1644.
- [51] Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009; 24:681-688.

Figure Legends

Figure 1. Measurements of linear bone loss and scheme for measuring furcation soft and bone tissue areas. A- Lower left first molar of group 3, 7 days after treatment: 1 = linear measure of bone loss in the distal face, 2 = linear extent of bone loss in the furcation, 3 = linear measure of bone loss in the medial face. B- rectangular grid, C - total area (yellow), D – soft tissue area (yellow) and E - bone tissue area (yellow).

Figure 2. Secretion of osteopontin in the bone matrix and the quantification of TRAP-positive cells. A- rectangular grid, B- total area of osteopontin secretion (blue), C- quantification of TRAP-positive cells.

Figure 3. Average $\pm$ standard deviation of linear bone loss on the first lower molars.

Figure 4. Percentage of soft and bone tissue in the bifurcation area of MFM

Figure 5. Percentage averages of osteopontin secretion into bone matrix.

Figure 6. Average number of TRAP positive cells per mm².

Figure 7. Quantification of RANKL and OPG (Average $\pm$ standard deviation values of immunoenzymatic assay).

Figure 8. Relationship between the concentrations of RANKL/OPG x 100.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8