



MIRELLA LINDOSO GOMES CAMPOS

**“AÇÃO DA CURCUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA
E SUAS IMPLICAÇÕES NA PERIODONTITE: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS”**

**PIRACICABA
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MIRELLA LINDOSO GOMES CAMPOS

**“AÇÃO DA CURCUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA
E SUAS IMPLICAÇÕES NA PERIODONTITE: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS”**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica, na área de concentração em Periodontia.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Mirella Lindoso Gomes Campos e orientada pelo Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum

Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

C157a Campos, Mirella Lindoso Gomes, 1980-
Ação da curcumina na terapia fotodinâmica e suas
implicações na periodontite: estudo experimental em ratos /
Mirella Lindoso Gomes Campos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Antonio Wilson Sallum.
Coorientador: Marcelo Rocha Marques.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. I. Sallum, Antonio Wilson, 1943- II.
Marques, Marcelo Rocha. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Curcumin effect in photodynamic therapy and its
implications in periodontitis: experimental study in

Palavras-chave em Inglês:

Periodontics

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Antonio Wilson Sallum [Orientador]

Ezymar Gomes Cayana

Suzana Peres Pimentel

Renato Corrêa Viana Casarin

Cristiane Ribeiro Salmon

Data da defesa: 07-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 07 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata MIRELLA LINDOSO GOMES CAMPOS aprovada.

Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM

Prof. Dr. EZYMAR GOMES CAYANA

Profa. Dra. SUZANA PERES PIMENTEL

Prof. Dr. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN

Profa. Dra. CRISTIANE RIBEIRO SALMON

Para minha família:
Meu pai, Manoel Honorato Gomes Neto (I.M.)
Minha mãe, Marinalva Lindoso Gomes
Meu marido, Érico Bruno Viana Campos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, por se fazer presente em todos os momentos de minha vida. Obrigada por ter-me estendido suas mãos nos momentos de fraqueza, por ter-me guiado nos momentos que havia perdido o foco e por ter acreditado em mim, mesmo nos momentos em que a dúvida pairava em minha mente. Obrigada por ter-me concedido forças para realizar as minhas metas e por ter enviado anjos em forma de amigos com quem eu tive o privilégio de compartilhar minha história ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Dr. Jacks Jorge Júnior.

Ao Prof. Dr. Márcio de Moraes, coordenador do curso de Clínica Odontológica e à Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Garcia Rodrigues, coordenadora dos cursos de Pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, por ter acreditado em mim e por ter me dado oportunidade de amadurecer e de crescer dentro da pós-graduação. Muito obrigada pela amizade, carinho e por toda confiança em mim depositada. Seu entusiasmo, altruísmo e amor por tudo o que realiza são contagiantes e inspiradores e conseguem acender a chama do verdadeiro educador naqueles que o rodeiam.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, meu amigo Marcelão, por ter mostrado quais caminhos seguir e, principalmente, por ter caminhado junto. Obrigada por ter-me erguido no momento mais crítico do meu mestrado. Obrigada por ter abraçado e acreditado neste trabalho de doutorado. Mas, principalmente, obrigada por sua amizade.

Aos professores da Periodontia da FOP: Profa. Dra. Karina Silvério Ruiz, Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior e Prof. Dr. Márcio Zafalon Casati pela importante contribuição na minha formação, pelo conhecimento, experiência e pelo senso ético.

Ao professor Dr. Rafael Nóbrega Stipp, por ter tão prontamente aceito colaborar com este trabalho. Obrigada pela disponibilidade, didática, paciência e amizade. Aprendi muito contigo.

Aos professores e queridos amigos que tão prontamente aceitaram participar da minha banca de qualificação: Profa. Dra. Karina Silvério Ruiz; Profa. Dra. Denise Andia e Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp. Muito obrigada por terem feito uma leitura tão minuciosa da minha tese, pelo alto nível de arguição e pelas sugestões que contribuíram tão profundamente para a conclusão deste trabalho.

Aos professores e queridos amigos da minha banca de defesa: Prof. Dr. Ezymar Gomes Cayana; Profa. Dra. Suzana Peres Pimentel; Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Salmon; Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin. Tenho cada um de vocês como grande exemplo a ser seguido. Obrigada por terem aceitado contribuir com este trabalho.

Aos Professores suplentes que aceitaram contribuir com este trabalho: Profa. Dra. Bruna Amorim; Profa. Dra. Fernanda Ribeiro; Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim; Prof. Dr. João Batista César-Neto.

À PDT Pharma, pelo fornecimento dos sachês de curcumina e à Gnatus pelo fornecimento do LED.

Ao bioterista da FOP-UNICAMP Wanderley Vieira, com quem aprendi muito sobre manejo e condução de animais. Obrigada por todo auxílio e paciência durante toda minha pós-graduação.

À Regina Caetano, por ter ajudado em tantos momentos neste trabalho e durante todo meu doutorado. À amiga Rê, pelo carinho, companheirismo e prontidão, tão importantes nesta caminhada.

À Mariana Fugolin, com quem tanto aprendi. Obrigada pela amizade, prontidão, e pelo grande auxílio no processamento histológico, imprescindível para a conclusão deste trabalho.

À Eliete Aparecida F. de Lima, pela amizade, carinho, competência e dedicação indispensáveis ao longo desses anos.

À Eliene Narvaes, por ter me ensinado com tanta receptividade, paciência e carinho a usar o programa de captura de imagens, fazendo-me sentir que a Histologia era minha segunda casa na FOP.

Ao meu pai, Manoel (i.m), por ter sido o meu maior mestre, meu maior incentivador e meu maior exemplo de ética. Compartilhamos apenas dez anos neste plano físico, mas meu amor e minha gratidão pelo senhor são eternos. Obrigada por todo amor a mim dedicado em vida e por continuar presente na minha caminhada.

À minha mãe, Marinalva, guerreira nata, por ser meu maior exemplo de coragem, força e determinação. Obrigada por ter acreditado nos meus sonhos e por ter ajudado em tantas dificuldades nesta trajetória. A saudade muitas vezes doía demais, mas o seu incentivo sempre me fez crer que toda história valeria à pena se fosse para o crescimento. Obrigada por seu amor incondicional, alicerce de minha vida.

Ao meu marido, Érico, por ter aceito dividir sua vida comigo há 9 anos. Obrigada por seu amor, cumplicidade, amizade, carinho e compreensão. Obrigada por ter estado presente sempre que precisei, por ter compartilhado todas as minhas tristezas e minhas alegrias. Obrigada por sonharmos e realizarmos juntos. Sem você, nada disto seria possível.

À minha amiga-irmã Mônica Grazieli Corrêa, com quem eu dei meus primeiros passos há 8 anos na minha história FOPiana, com quem ultrapassei tantos obstáculos e com quem tanto aprendi. Obrigada por todas as vezes que

me ajudaste sem sequer titubear. Obrigada por existir em minha vida. Obrigada imensamente por sua amizade.

À minha amiga que se tornou uma irmã, Ana Paula Giorgetti Bossolan, por ter colaborado com todas as fases deste trabalho. Obrigada por ter compartilhado de tantos momentos da minha vida nestes anos todos e fazer parte da minha história. Obrigada por sua amizade.

À Beatriz Bezerra, outra amiga que virou irmã, com quem muito aprendi. Obrigada pelo carinho, pelos risos e por ter ajudado em tantos obstáculos. Obrigada por sua amizade.

Ao meu amigo-irmão Ezymar Gomes Cayana, de quem tanto sinto saudades. Obrigada por fazer mais simples os momentos complicados e por mostrar o lado belo da vida, quando eu não enxergava sequer saída. Obrigada por ter-me ensinado que as coisas tem seu tempo e que dão certo: é só perseverar. Obrigada por me presentear com sua amizade.

À Viviene Santana, por sua colaboração neste trabalho, por sua amizade, dedicação e paciência. Obrigada por teres acreditado que em 9 meses nós conseguiríamos concluir esses trabalhos hercúleos.

À Ana Livia Fileto, minha querida orientada e amiga, muito obrigada pela dedicação, paciência e carinho que tiveste comigo durante esses anos.

Às minhas queridas amigas e companheiras de mestrado e de doutorado, a “Old generation” Ana Paula Giorgetti, Tatiana Meulmann e Mônica Corrêa, pessoas com quem tive o privilégio de aprender e compartilhar tantos momentos; nossa turma aprendeu o verdadeiro valor da união, o que tornou nossa caminhada mais branda.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação, pelo carinho e por termos compartilhado tantas histórias: Ana Regina Moreira, Viviene Santana,

Camila Camarinha, Miki Saito, Mayra Libério, Tiago Taiete, Tiago Tarbes, Hugo Vale, Lucas Moura, Lucas Queiroz.

Aos amigos que fizeram e fazem toda a diferença: Cristiane Ribeiro Salmon, Renato Casarin, Fernanda Guerra Velasco, Maria Fernanda Peres, Andréia da Silva, Marisi Aidar, Renato Zambon, Fabrícia Suaid, Saulo Cabral, Thaisângela Gomes, Adnelle Paranhos, Adriana Fischer, Alberto Guerreiro, Carol Meloto, Pedro Ricomini, Fernanda Signoretti e Evanilson Dias. Obrigada por todo incentivo, amizade e carinho.

A todos os funcionários da FOP/UNICAMP que direta ou indiretamente tornaram possíveis esses anos de formação.

À Piracicaba, por ter-me acolhido e ter sido meu lar.

“Nada disso é científico, quantitativo. Mas é real. Move corpos. O que comove os homens e os faz agir é sempre o “qualitativo”. Inclusive a ciência. Os cientistas, ao fazerem ciência, não são movidos por razões quantitativas, científicas. São movidos por curiosidade...”

Rubem Alves

RESUMO

A curcumina é uma substância passível de ser fotoativada e, portanto, de ser usada enquanto fotossensibilizador. Devido a não haver um consenso sobre o melhor protocolo clínico de terapia fotodinâmica (TFD) a ser usado em periodontia, este estudo teve como objetivo avaliar histometricamente, histoquimicamente e microbiologicamente a ação da curcumina 10% como fotossensibilizador e de um LED de 450nm de comprimento de onda como fonte de luz na periodontite induzida por ligaduras em ratos. Ambos 1^{os} molares inferiores dos animais foram utilizados e aqueles dos grupos Controle e TFD receberam inserção de ligadura no *baseline*. Desse modo, 45 ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos e avaliados em 3 períodos: TFD - 1 aplicação por semana, seguida de sacrifício em 7 dias (n=10), 14 dias (n=10) e 21 dias (n=10); Controle - molares contralaterais receberam somente ligaduras nos mesmos períodos; Controle Negativo (CN) - 15 animais foram sacrificados em períodos semelhantes (5 animais/período). Histometricamente, não foram verificadas alterações das médias de reabsorção óssea alveolar quando feita análise intergrupo entre os grupos Controle e TFD em 7 dias ($p>0,05$), em 14 dias ($p>0,05$) e em 21 dias ($p>0,05$). A frequência de aplicação do protocolo de TFD não influenciou na extensão da reabsorção óssea causada pela ligadura aos 7, 14 e 21 dias no grupo Controle ($p=0,3$) e TFD ($p=0,2$). O CN também não apresentou alteração nas dimensões do LP ao longo do tempo. Quanto à análise histoquímica, a avaliação intragrupo mostrou que aos 21 dias o grupo TFD tinha um número significativamente menor de células TRAP-positivas/mm na crista óssea alveolar da região de furca quando comparado aos 7 dias ($p=0,04$) e a avaliação intergrupos mostrou que, aos 21 dias, o grupo TFD teve significativamente menos células TRAP-positivas/mm que os demais grupos ($p=0,01$). A análise microbiológica mostrou que o protocolo utilizado de TFD reduziu significativamente o número de colônias aos 7 ($p=0,0003$) e aos 14 dias ($p=0,01$), mas não foi significativo no controle de infecção aos 21 dias ($p>0,05$). Pôde-se concluir que o protocolo de TFD com curcumina 10% foi eficaz no controle de infecção aos 7 e 14 dias, mostrando haver um benefício no controle do biofilme e na redução das células TRAP-positivas, porém foi ineficaz em reduzir a reabsorção óssea alveolar da região de furca de 1^o molar de ratos.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Curcumina; Periodontite; Ratos.

ABSTRACT

Curcumin is a substance which can be photoactivated and thus be used as a photosensitizer. Because there is no consensus on the best clinical protocol of photodynamic therapy (PDT) to be used in Periodontics, the present study aimed to evaluate histometrically, histochemically and microbiologically the influence of a photodynamic therapy (PDT) using curcumin 10% as a photosensitizer and a 450 wave length LED as a light source in experimental periodontitis in rats induced by ligatures. Both 1st molars were used and those related to PDT and Control groups received ligature insertion on baseline. Thus, 45 rats were randomly assigned into one of three groups and were evaluated at 3 different periods: PDT – one application of PDT per week followed by animal sacrifice at 7 days (n=10), 14 days (n=10) and 21 days (n=10); Control – contralateral molars received only ligature insertion on baseline and were sacrificed at the same periods; Negative Control (NC) – 15 animals were sacrificed in similar periods. Histometric analysis showed that there were no significant differences in alveolar bone loss between Control and PDT on 7 ($p>0.05$), 14 ($p>0.05$) and 21 days ($p>0.05$). Intragroup analysis revealed that time did not influence alveolar bone loss in PDT ($p=0.3$) and Control ($p=0.2$) groups and time did not change periodontal ligament area in NC ($p>0.05$). Histochemistry analysis evaluated TRAP-positive cells/mm on the linear surface of bone crest in furcation region. Intragroup analysis showed a significant lower number of TRAP-positive cells in PDT on day 21 as compared to day 7 ($p=0.04$) and intergroup analysis showed that PDT had significantly less TRAP-positive cells/mm at day 21 as compared to Control and NC ($p=0.01$). Microbiological analysis showed that PDT protocol using 10% of curcumin significantly reduces bacterial colonies count on 7 ($p=0.0003$) and 14 days ($p=0.01$) but was ineffective in infection control on day 21 ($p>0.05$). There were significantly less reduction of bacterial colonies on day 21 as compared to day 7 ($p<0.05$). In conclusion, PDT using curcumin 10% increases biofilm infection control at 7 and 14 days and effectively reduced TRAP-positive cells but was not effective on diminish alveolar bone loss induced by ligatures in furcation region of 1st molars in rats.

Keywords: Photodynamic therapy; Curcumin; Periodontitis; Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Mecanismos Básicos de Ação da Terapia Fotodinâmica.....	6
2.2 Estudos de TFD em Animais	10
2.3 Estudos Clínicos de TFD.....	14
2.4 Curcumina Como Possível Fotossensibilizador	21
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Delineamento Experimental.....	30
4.2.1 Grupo TFD.....	31
4.2.2 Grupo Controle	33
4.2.3 Grupo CN.....	34
4.3 Indução da Periodontite Experimental	34
4.4 Fotossensibilizador.....	35
4.5 Fonte de Luz.....	36
4.6 Cultura Microbiana e Contagem de Colônias	37
4.7 Sacrifício dos Animais e Processamento Histológico	38
4.7.1 Reabsorção Óssea Inter-Radicular	39
4.8 Coloração para Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato - TRAP.....	41
4.9 Calibração da Examinadora.....	42
4.10 Avaliação dos dados.....	42
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
Anexo 1: Protocolo de Aprovação do CEUA/UNICAMP	73

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, resultante da interação do biofilme bacteriano com a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, que pode ser modulada por fatores sistêmicos e ambientais, como o diabetes e o tabagismo (Shlossman *et al.*, 1990; Page & Kornman, 1997; Haffajee *et al.*, 2001). Tal interação resulta na destruição do aparato de inserção dos dentes, ou seja, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar, que em última instância pode levar à perda do elemento dental (Løe *et al.*, 1978; Offenbacher, 1996).

A disbiose do biofilme dental, ou seja, a alteração da ecologia microbiana relacionada à saúde, pode levar a quadros clínicos de doenças periodontais (Darveau, 2009). Com o amadurecimento gradual do biofilme dental ocorrem sucessões bacterianas que alteram a ecologia do biofilme relacionado à saúde periodontal, primariamente constituído por bactérias gram-positivas aeróbias, para um biofilme mais complexo composto de bactérias gram-negativas anaeróbias (Løe *et al.*, 1965; Socransky *et al.*, 1998). Em Periodontia, esse processo marca a ruptura da simbiose do biofilme dental com a saúde tecidual frente ao novo desafio marcado pelo estabelecimento de um biofilme periodontopatogênico, culminando com o desenvolvimento das doenças periodontais (Marsh, 1994). O controle microbiológico do biofilme é, portanto, o foco da terapia periodontal no qual a cura da doença está intimamente relacionada.

O complexo vermelho, *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), definido por Socransky *et al.* (1998), e o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são denominados de periodontopatógenos verdadeiros, ou seja são microrganismos anaeróbicos altamente virulentos capazes de iniciar principalmente processos inflamatórios

de caráter crônico. Assim, a alteração de um biofilme dental composto por microrganismos simbióticos para outro composto por microrganismos disbióticos patogênicos é responsável pela biomodulação dos mecanismos inflamatórios do hospedeiro, contribuindo para que ocorra destruição dos tecidos periodontais e reabsorção do osso alveolar adjacente ao biofilme periodontopatogênico (Darveau, 2009). Tais processos estão relacionados ao aumento da severidade dos parâmetros clínicos da doença periodontal, levando, por exemplo, à constatação de maiores perdas de nível de inserção clínica (NIC), maiores profundidades de sondagem (PS) e aumento dos índices de sangramento marginal e de fundo de bolsa periodontal.

As técnicas de raspagem e de alisamento radicular (RAR), atualmente reconhecidas como padrão ouro do tratamento periodontal, objetivam a biocompatibilização da superfície dento-radicular e, conseqüentemente, o restabelecimento da saúde periodontal a partir da reestruturação de comunidades bacterianas comensais no biofilme dental que sejam compatíveis com a homeostasia dos tecidos periodontais (Haffajee & Socransky, 2005). Porém, mesmo após ter-se alcançado sucesso com a terapia básica não cirúrgica, ou seja RAR ou debridamento com ultrassom, existe um alto risco da existência de um biofilme residual ou da presença de reservatórios de bactérias periodontopatogênicas que possam influenciar negativamente o prognóstico clínico. Isso é devido à possível presença de um biofilme residual virulento em consequência dos desafios mecânicos que o operador pode se deparar frente à complexa anatomia e grandes profundidades das bolsas periodontais, à presença de concavidades radiculares, bifurcações e trifurcações que dificultariam a instrumentação pelo operador (Adriaens & Adriaens, 2004; Umeda *et al.*, 2004), assim como a presença de reservatórios remanescentes de bactérias nos túbulos dentinários e no tecido conjuntivo adjacente (Takasaki *et al.*, 2009) e a presença de cálculo remanescente (Cobb, 2009), comprometendo o sucesso a longo prazo dos sítios tratados.

Por isso, a antibioticoterapia sistêmica tem sido proposta como terapia coadjuvante ao tratamento da doença periodontal para que se obtenha melhor controle da infecção. Porém, a verificação de concentrações abaixo da concentração mínima para ação bactericida da droga observada no sulco gengival, a dependência do compliance do paciente, a observação de efeitos adversos dessas drogas e a constatação de resistência bacteriana junto a cepas mais patogênicas têm restringido seu uso dentro da Periodontia (Meisel & Kocher, 2005). Além disso, a matriz do biofilme forma um ecossistema complexo e de difícil acesso, o que protege as células bacterianas contra a ação dos antibióticos (Feres *et al.*, 2002; Darveau *et al.*, 1997). Devido às limitações de disponibilidade local da droga e ao desenvolvimento de resistência bacteriana, existe uma necessidade contínua de se pesquisarem alternativas à utilização de agentes antimicrobianos sistêmicos.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que pode ser considerada uma potencial alternativa aos métodos tradicionais de terapia periodontal. A técnica consiste no uso de um fotossensibilizador que se liga a uma célula alvo e é ativado por uma luz visível, geralmente do tipo *laser* de baixa intensidade ou diodo emissor de luz (LED) (Meisel & Kocher, 2005). As moléculas do fotossensibilizador excitadas pela luz transferem energia para o oxigênio, criando uma forma de oxigênio hiper-reativa e tóxica, denominada de oxigênio singlete, capaz de reagir com sistemas vivos, destruindo-os (Carvalho *et al.*, 2011). Portanto, a TFD torna-se um método viável de destruição bacteriana sem, todavia, causar resistência microbiana, pois diferentemente dos antibióticos que agem em um alvo específico, o oxigênio singlete possui características de natureza multifuncional e pode interagir com diversas estruturas celulares, reduzindo significativamente as chances de desenvolver resistência frente aos protocolos de TFD. Diversos estudos em animais e em humanos têm mostrado resultados promissores quanto ao uso da TFD na eliminação de bactérias do biofilme supra e subgengival (de Almeida *et al.*,

2008a, b; Cappuyens *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2009; Chondros *et al.*, 2009; Novaes *et al.*, 2007), mostrando ser essa técnica promissora para o tratamento e controle da doença periodontal. Porém, ainda não existe um consenso na literatura sobre um protocolo clínico para uso da TFD em Periodontia no que tange a escolha da fonte de luz, a droga a ser utilizada como fotossensibilizador, o tempo de fotossensibilização necessário para que haja sua fotoativação e a frequência de aplicação da TFD.

Devido a suas propriedades antioxidantes (Pizzo *et al.*, 2010), anti-inflamatórias (Aggarwal & Harikumar, 2009), antitumorais (Lee *et al.*, 2009), anti-leshimanirose (Kaminaga *et al.*, 2003), anti-fúngica (Kaminaga *et al.*, 2003) e anti-bacteriana (De *et al.*, 2009), a curcumina, corante natural derivado da *Curcuma longa*, vem sendo estudada e proposta como possível agente fotossensibilizador na TFD. Uma vez ativada por uma fonte de luz, a curcumina, que em estado natural possui ação antimicrobiana somente em grandes concentrações, desenvolve potente efeito fototóxico em concentrações micromolares (Dahl *et al.*, 1989). Além disso, autores têm proposto que a curcumina auxilia a imunomodulação da resposta inflamatória do hospedeiro, podendo atuar tanto na resposta celular quanto humoral do mesmo (Jagetia & Aggarwal, 2007), auxiliando o processo cicatricial.

Portanto, é de suma importância que se conduzam pesquisas para que se identifiquem novas possibilidades terapêuticas em Periodontia e, dentro da TFD mais especificamente, a eficácia da curcumina no processo de biocompatibilização. Isso possibilitaria o desenvolvimento de protocolos clínicos que fossem mais compatíveis com a integridade dos tecidos periodontais e mais efetivos na eliminação dos periodontopatógenos e conseqüentemente no restabelecimento da saúde desses tecidos. Dessa forma, é interessante que sejam realizados estudos que avaliem a ação da curcumina na TFD e quais implicações do uso desse protocolo na evolução e no controle da periodontite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A TFD foi descoberta acidentalmente em 1900, quando Oscar Raab, aluno de Hermann von Tappeiner, então diretor do Instituto de Farmacologia da Universidade de Ludwig-Maximilians em Munique, percebeu que os resultados de sua avaliação da toxicidade da acridina ($C_{13}H_9N$) em *Paramecium caudatum*, um tipo de protozoário, eram dependentes do horário do dia no qual o experimento era realizado e, conseqüentemente, da exposição de luz que as soluções de acridina contendo *Paramecium caudatum* eram expostas. Raab percebeu que esse tipo de protozoário era mais efetivamente inativado quando as soluções eram colocadas próximo às janelas do laboratório e ficavam expostas à luz que passava por elas (Valenzeno, 1990; Soukos *et al.*, 2011). O termo “ação fotodinâmica” foi introduzido em 1904 por Hermann von Tappeiner e, possivelmente, foi assim denominado para melhor distinguir esse fenômeno do processo anteriormente descrito pelo autor que avaliava somente a ação da luz sobre a inativação de microrganismos. (Moan & Peng, 2003a; Moan & Peng, 2003b).

Atualmente, a TFD é aceita pela comunidade científica como modalidade terapêutica para diversas formas de patologias. Sua aplicação pode ser dividida principalmente em dois grupos de acordo com o tipo de célula-alvo da terapia: ação em células-alvo do hospedeiro, como diversos tipos de cânceres (Hsi *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2012; Nanashima *et al.*, 2012), acne (Hong *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012), psoríase (Salah *et al.*, 2009; Fernández-Guarino *et al.*, 2009), queratose actínica (Tschen *et al.*, 2006); ação em células-alvo de microrganismos responsáveis por infecções diversas (Hamblin *et al.*, 2002; Hamblin *et al.*, 2003). Devido à promissora ação antimicrobiana da TFD, a técnica tem sido proposta em Odontologia como alternativa ao uso de antimicrobianos sistêmicos tradicionalmente utilizados no controle de infecções orais (Wilson *et al.*, 1995; Chabrier-Roselló *et al.*, 2005).

2.1 Mecanismos Básicos de Ação da Terapia Fotodinâmica

O efeito da TFD ocorre basicamente pela ação de três componentes distintos: luz visível que não cause dano celular; fotossensibilizador; formas tóxicas de oxigênio formadas a partir da interação da luz visível com o fotossensibilizador (Takasaki *et al.*, 2009; Soukos & Goodson, 2011).

Os princípios básicos fotobiológicos que regem a TFD são (Meisel & Kocher, 2005):

- a) Lei de Grotthus-Draper: A luz utilizada deve ter um comprimento de onda apropriado para que seja absorvida, pois apenas a luz que pode ser absorvida poderá desencadear uma reação fotoquímica do fotossensibilizador.
- b) Lei de Stark-Einsten: Todas as moléculas do fotossensibilizador envolvidas na reação de foto-indução absorvem um quantum de energia emitida pela fonte de luz utilizada.
- c) Lei de Bunsen-Roscoe: O efeito fotoquímico é uma função do produto da intensidade da luz aplicada e do tempo de duração da exposição à luz.

Após o fotossensibilizador ter entrado em contato e ter-se ligado às células-alvo, dá-se a exposição da solução a uma fonte de luz de espectro visível, fazendo com que as moléculas do fotossensibilizador sejam excitadas pela absorção de fótons. Assim, as moléculas excitadas do fotossensibilizador transferem a energia capturada em forma de fótons para moléculas de oxigênio, formando o oxigênio singleto ou radicais livres, ambos apresentando propriedades citotóxicas para as células. Dessa forma, podem ocorrer duas reações distintas em decorrência do processo de fotossensibilização (Figura 1):

- 1) Reação do tipo I: Mais fraca. Ocorre a reação de transferência de elétrons entre as moléculas do fotossensibilizador excitadas ao seu triplo estado e uma molécula de substrato orgânico, a qual produz radicais iônicos e radicais livres. Os radicais livres são capazes de reagir com o oxigênio intra-molecular das células, produzindo espécies altamente reativas de oxigênio, como superóxidos, radicais de hidroxilas e peróxido de hidrogênio. Tais espécies causam danos biológicos irreparáveis à membrana celular (Takasaki *et al.*, 2009).
- 2) Reação do tipo II: Mais citotóxica. Ocorre a transferência de energia de moléculas do fotossensibilizador excitadas ao seu triplo estado diretamente às moléculas de oxigênio. O produto formado, denominado de oxigênio singleto, é altamente reativo e citotóxico, sendo considerado a espécie de oxigênio de maior citotoxicidade obtida na TFD (Konan *et al.*, 2002). O oxigênio singleto é capaz de oxidar diversas estruturas celulares como, organelas proteínas, ácidos nucleicos e colesterol, levando à lise celular. Essa forma de oxigênio possui uma difusão de aproximadamente $0,02\mu\text{m}$ e meia-vida $<0,04\mu\text{s}$ (Moan & Berg, 1991). Quando o fotossensibilizador for manipulado em solventes com características apolares, semelhante das membranas celulares, o tempo de ação do oxigênio singleto aumenta consideravelmente, passando para $20\mu\text{s}$, quando manipulado em etanol, e $250\mu\text{s}$, quando manipulado em clorofórmio (Meisel & Koucher, 2005).

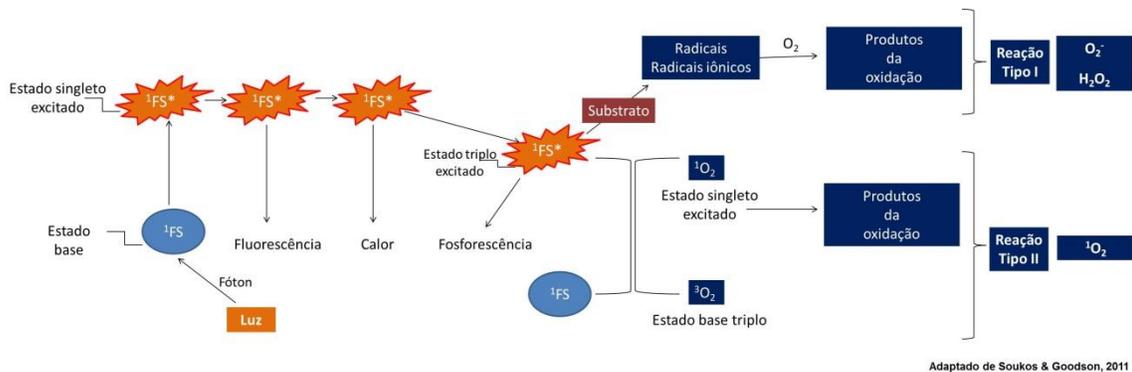


Figura 1- Esquema das reações tipo I e tipo II (Adaptado de Soukos & Goodson, 2011).

A propriedade antimicrobiana conferida à TFD é baseada, principalmente, na formação do oxigênio singleto obtido na reação do tipo II e sua consequente interação com a membrana citoplasmática e com o DNA dos microrganismos (Soukos & Goodson, 2011). Dessa forma, a formação dos tipos tóxicos de oxigênio pode ocorrer extra-celular ou intra-celular, dependendo da molécula que receberá o fóton do estado excitado do fotossensibilizador.

Assim, a TFD pode ser utilizada para tratamento de bactérias, protozoários, vírus e fungos. Devido ao seu curto tempo de vida, a migração do oxigênio singleto torna-se limitada dentro do tecido e depende diretamente do local de aplicação do fotossensibilizador e do perímetro de ação da fonte de luz. Isso permite que a reação seja bem delimitada, levando a uma ação localizada sem causar danos a células e moléculas de sítios distantes do local de aplicação (Moan & Berg, 1991).

Idealmente, nem o fotossensibilizador nem a fonte de luz utilizada na fotoativação deveriam induzir isoladamente um efeito citotóxico para célula. Portanto, teoricamente, o efeito antimicrobiano da TFD só poderia ocorrer quando da associação dessas duas variáveis. A eficácia fototerapêutica está na dependência do coeficiente de absorção do corante fotossensibilizador utilizado, na concentração alcançada nas células-alvo e na fonte de energia

utilizada como luz (Meisel & Kocher, 2005). A dose de luz é expressa em J/m^2 e é produto do tempo e da intensidade (W/m^2) (Profio & Doiron, 1987). Dessa forma, a luz necessária para que ocorra a fotoativação do fotossensibilizador deve ter um comprimento de onda específico e um nível baixo de energia que consiga ser absorvido pelo corante do fotossensibilizador e, dessa forma, desencadear uma reação preferencialmente do tipo II.

Como poderá ser visto a seguir, a literatura atual preconiza o uso de *lasers* de baixa intensidade e, mais recentemente, de LEDs para o desencadeamento da ação fotodinâmica, pois ambas as fontes de luz mostram serem tecidualmente biocompatíveis e serem capazes de desencadear a ação de ativação do oxigênio singleto e, portanto, mediar a ação antimicrobiana.

Historicamente utilizavam-se na Odontologia modelos *lasers* de altas doses de energia que pretendiam, principalmente, esterilização do sítio contaminado por ação térmica, promovendo uma esterilização local (Kato *et al.*, 1998; Walsh, 1997). Porém, o dano tecidual secundário inerente a seu uso restringia sua aplicação. O desenvolvimento de *lasers* colimados, coerentes e monocromáticos, possibilitou o uso de uma fonte de luz de baixa energia e de intensidade homogênea que era adequada para ativação da reação fotodinâmica, reduzindo assim os efeitos colaterais inerentes aos *lasers* mais potentes (Takasaki *et al.*, 2009). Esses *lasers* são reconhecidos por produzirem efeitos fotoquímicos e fotoelétricos, a despeito do efeito térmico produzido por *lasers* de alta potência, permitindo que sejam desencadeadas ações analgésicas, biomoduladoras e anti-inflamatórias sobre tecidos mineralizados e moles (Brugnera *et al.*, 1998).

Os LEDs têm se mostrado uma opção viável na TFD. Seu uso possibilita variar a irradiância do espectro e a razão entre a radiação infravermelha visível (Meisel & Kocher, 2005). Outras vantagens da tecnologia LED são: possibilidade de aumentar o tempo de irradiação da solução sem

causar danos colaterais; ter melhor custo-benefício; ser de mais fácil manuseio do que o uso *lasers* (Mongardini *et al.*, 2012).

Estudos têm mostrado uma maior susceptibilidade de bactérias Gram-positivas à TFD. Huang *et al.* (2012) estudaram *in vitro* o efeito antimicrobiano da TFD sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas e verificaram que as bactérias gram-positivas foram mais facilmente atingidas pela reação de tipo I e de tipo II. Malik *et al.* (1990) avaliaram a ação de um tipo de composto a base de porfirina e hemina sobre algumas espécies de bactérias gram-positivas, a saber *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Bacillus cereus* e verificaram alta taxa de morte bacteriana após 2 horas de tratamento.

Braham *et al.* (2009) observaram *in vitro* *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) cultivadas em estado planctônico tratadas com uma solução fotossensibilizadora de azul de metileno 0,01% fotoativada por um *laser* de diodo não-térmico com comprimento de onda de 670nm, aplicado nas amostras por intermédio de um cabo de fibra óptica acoplado, durante 60 segundos. Os autores verificaram uma redução média de $4\log_{10}$ de *Pg*, além do protocolo de TFD ter sido efetivo na redução de ação de protease total, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1- β (IL-1 β), mostrando que a TFD pode ser efetiva não apenas na morte de bactérias periodontopatogênicas Gram-negativas, mas também pode auxiliar o processo de cicatrização a partir da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias.

2.2 Estudos de TFD em Animais

Estudos pré-clínicos conduzidos em animais são de suma importância para avaliação de mecanismos fisiológicos e patológicos,

permitindo o aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, de diagnóstico e de tratamento de doenças.

Em Odontologia, os modelos desenvolvidos em ratos e camundongos têm sido vastamente aplicados para avaliação da interação de doenças sistêmicas com diversas infecções orais e periodontais, assim como para investigação de novas técnicas e de drogas com intuito de se desenvolverem e aprimorarem novos protocolos para futuro uso clínico. Os modelos desenvolvidos em ratos têm sido atualmente muito utilizados por diversos grupos de pesquisa devido ao baixo custo de manutenção desses animais quando comparado a outros modelos experimentais, por serem de fácil manuseio e transporte, pela possibilidade de se conseguir padronização adequada de características genéticas, por terem um sistema tecnicamente conhecido e pelo operador conseguir boa reprodutibilidade dos modelos aplicados (Pellegrini *et al.*, 2009). Como curiosidade, em pesquisa feita na base de dados Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) utilizando como palavras-chave “periodontal research” e “rats”, pôde-se verificar, em 22 de Novembro de 2012, exatos 1285 trabalhos indexados nesse portal que usam esse modelo animal em estudos dentro da Periodontia, o que mostra a grande aplicabilidade dos modelos nessa espécie.

Estudos em ratos têm sido utilizados para avaliação de vários protocolos de TFD como monoterapia ou terapia coadjuvante à RAR e têm mostrado resultados promissores. Qin *et al.* (2008) avaliaram, em ratos, o efeito da TFD como monoterapia para o tratamento da periodontite induzida por ligadura. Para tanto, os autores utilizaram como fotossensibilizador uma solução de azul de toluidina diluída em solução salina estéril aplicada em um volume de 50µl (1mg/ml), deixando a solução em contato com os tecidos periodontais por 10 minutos. Após a aplicação do fotossensibilizador, os autores utilizaram como fonte de luz para o processo da TFD, um *laser* de diodo com 635nm de comprimento de onda, potência de 61mW e densidade de energia

159mW/cm² com auxílio de uma ponteira de aplicação de fibra óptica com 0,8mm de diâmetro. A fotoativação foi feita por 75 segundos. Após seis semanas do início da indução da periodontite, os autores removeram as ligaduras e os animais foram divididos em três grupos: somente RAR; somente TFD; controle. Os animais foram sacrificados 30 dias após o tratamento. Os autores constataram que ambas as modalidades terapêuticas promoveram efeito bactericida significativo sobre o biofilme quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$), porém sem diferenças significativas entre si. Os sinais clínicos de inflamação como coloração da gengiva, índice de placa, índice gengival, PS, foram semelhantes entre os grupos RAR e TFD. Não houve diferença, também, quanto à quantidade do infiltrado inflamatório entre esses dois grupos. Os autores concluem que o protocolo de TFD utilizado no estudo é eficaz para o tratamento da periodontite e que pode haver um alto potencial clínico em sua utilização.

Em um estudo experimental, de Almeida *et al.* (2008a) avaliaram a eficácia de um protocolo de TFD na evolução da periodontite induzida por ligadura de algodão em 1^{os} molares de ratos. Dois dias após a inserção das ligaduras, os animais foram divididos em um dos grupos: controle, somente ligadura; 1ml contendo 100mg/ml de azul de metileno; aplicação de *laser* de gálio-alumínio-arsênio com 685nm de comprimento de onda, potência de 0,05W e densidade de energia 0,037W/cm² por 1 minuto; TFD (*laser* de gálio-alumínio-arsênio + 1ml contendo 100mg/ml de azul de metileno). Aos 7 dias, o grupo TFD teve menor reabsorção óssea na região de furca quando comparado aos demais ($p < 0,01$), aos 15 dias, os grupos TFD e azul de metileno tiveram significativamente menos reabsorção óssea na região de furca quando comparados aos grupos controle e *laser* e aos 30 dias não foi verificada diferença intergrupos. Os autores mostraram que a TFD pode ser uma alternativa para controle de reabsorção óssea na região de furca em sítios com periodontite.

Em outra publicação, de Almeida *et al.* (2008b) avaliaram o efeito da TFD usada como terapia coadjuvante da RAR em ratos diabéticos com periodontite induzida por ligadura de algodão. Para tanto, uma solução de 100µg/ml de fenotiazina como fotossensibilizador foi utilizada, deixando-a agir por 1 minuto e depois fotoativando-a com um *laser* de baixa intensidade de gálio-alumínio-arsênio (GaAIs) com 660nm de comprimento de onda, 4J densidade de energia por ponto de aplicação, aplicado com intermédio de uma ponteira de 0,07cm², por 133 segundos em cada sítio (3 face vestibular, 3 na face lingual). Após 7 dias, os animais tiveram as ligaduras removidas e os sítios tratados. Os autores verificaram histometricamente que o protocolo aplicado de TFD como terapia coadjuvante da RAR reduziu significativamente ($p<0,05$) a reabsorção óssea da região de furca dos dentes com periodontite experimental em 7, 15 e 30 dias.

Fernandes *et al.* (2009) avaliaram o efeito da TFD como terapia coadjuvante da RAR em ratos imunossuprimidos pela administração de dexametasona em que se desenvolveu periodontite induzida por ligadura de algodão. Para tanto, uma solução de 1ml contendo 100µg/ml de azul de ortotoluidina foi utilizada como fotossensibilizador, deixando-a agir por 1 minuto e depois fotoativando-a com um *laser* de baixa intensidade de gálio-alumínio-arsênio (GaAIs) com 660nm de comprimento de onda, 4J densidade de energia por ponto de aplicação, aplicado com intermédio de uma ponteira de 0,07cm², por 133 segundos. Após 7 dias, os animais tiveram as ligaduras removidas e os sítios tratados. O grupo saudável e o grupo imunossuprimido tratados com RAR + TFD tiveram redução significativa na reabsorção óssea ($p<0,05$), constatada radiograficamente, quando comparados com os respectivos que receberam somente RAR. Histometricamente, os animais tratados com RAR + TFD de ambos os grupos tiveram significativamente menos reabsorção óssea quando comparados à RAR e com o grupo RAR + azul de orto-toluidina em 30 dias ($p<0,05$).

Carvalho *et al.* (2011) avaliaram o efeito da TFD como terapia coadjuvante à RAR em ratos com periodontite induzida por intermédio de ligadura de algodão. Os autores utilizaram uma solução com concentração final de $0,8 \times 10^{-7}$ de eosina como fotossensibilizador. A solução foi fotoativada por 1 minuto, usando-se um LED de comprimento de onda variável entre 440-480nm e uma densidade de energia de $0,69 \text{W/cm}^2$. As ligaduras foram removidas após 7 dias de indução da periodontite e os sítios foram tratados. Sete dias após os tratamentos terem sido realizados, os animais foram sacrificados. Os autores verificaram reduções significativas ($p < 0,05$) na reabsorção óssea, na migração de neutrófilos e na expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no grupo TFD + RAR quando comparado ao grupo eosina + RAR, mostrando o efeito imunomodulador da TFD na redução da resposta imuno-inflamatória e, conseqüentemente, na redução da reabsorção óssea dos dentes com periodontite induzida.

2.3 Estudos Clínicos de TFD

Estudos clínicos também têm sido realizados para avaliação da eficácia da TFD como monoterapia e como terapia coadjuvante.

Em um estudo clínico de boca dividida, Mongardini *et al.* (2012), avaliaram o efeito de curta duração da TFD em parâmetros clínicos e microbiológicos em sítios periodontais residuais de pacientes com periodontite crônica. Os pacientes tiveram sítios tratados com RAR (lado controle) ou RAR + TFD (lado teste) utilizando um LED de espectro vermelho com 628nm de comprimento de onda e um fotossensibilizador com uma solução contendo uma concentração de 0,1mg/ml de azul de orto-toluidina. Após 7 dias de terapia, os autores verificaram uma redução significativa no sangramento à sondagem dos sítios do lado teste ($p < 0,001$) e houve um maior número ($p = 0,01$) de sítios do

lado teste apresentando pelo menos uma redução de 2mm na profundidade de sondagem. Todas as bactérias avaliadas, a saber, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf), *Fusobacterium nucleatum* spp. (Fn) e *Prevotella intermedia* (Pi) também tiveram quantidades significativamente reduzidas no lado teste após 7 dias da terapia, mostrando o efeito benéfico da TFD como terapia coadjuvante após um curto período de avaliação.

Porém, Theodoro *et al.* (2012) não verificaram resultados clínicos significativos usando o mesmo fotossensibilizador. Os autores avaliaram o efeito clínico e microbiológico da TFD como coadjuvante da terapia básica de RAR em um modelo de boca dividida. Os autores usaram azul de orto-toluidina (100µ)g/ml e *laser* de diodo GaAlAs com comprimento de onda de 660nm, 4,5J de energia e com 0,07cm² de área de incidência do foco em pacientes com periodontite crônica. Os autores não verificaram nenhuma melhora clínica nos parâmetros periodontais avaliados após 180 dias, porém, observaram, através de avaliação por reação de cadeia de polimerase (PCR), reduções significativas (p<0,05) de todos os periodontopatógenos avaliados no grupo em que foi associada TFD com RAR (Aa, Pg, Pi, Tf e *Prevotella nigrescens*) quando comparado ao grupo de RAR.

Em outro estudo clínico de boca dividida, Cappuyns *et al.* (2012) avaliaram o efeito da TFD em bolsas periodontais residuais de pacientes com histórico de periodontite crônica tratada previamente com abordagem não-cirúrgica (RAR). Para realização da TFD, os autores utilizaram como fotossensibilizador uma solução contendo 100µg/ml de cloreto de fenotiazina aplicada nas bolsas residuais com auxílio de uma cânula. Após um minuto de ação, os sítios foram lavados com água e irradiados subgingivalmente com um *laser* de diodo com comprimento de onda de 660nm com auxílio de uma ponteira de fibra ótica. Os autores não verificaram melhoras clínicas e

microbiológicas entre os grupos TFD e TFD + RAR após dois meses de avaliação.

Fontana *et al.* (2009) avaliaram o efeito da TFD sobre bactérias planctônicas e de biofilme cultivado de pacientes com periodontite crônica. Para tanto, os autores utilizaram, como fonte de luz, um *laser* de diodo com 665nm de comprimento de onda, 100mW/cm² de densidade e 30J/cm² de energia e, como fotossensibilizador, duas concentrações de azul de metileno (25µg/ml e 50µg/ml). Cada poço de cultivo bacteriano foi incubado com o fotossensibilizador por cinco minutos e irradiado em seguida por cinco minutos. Os autores verificaram um efeito significativamente maior na redução do número de bactérias planctônicas tratadas com TFD (redução de 63%) quando comparadas à redução bacteriana obtida no biofilme (redução de 32%) submetido ao mesmo protocolo (p<0,05). Os autores verificaram, ainda, uma redução significativamente maior no número de bactérias do biofilme tratado com maior concentração de azul de metileno (p<0,05). Os autores concluíram que a TFD não possui a mesma eficácia em bactérias organizadas em biofilme, possivelmente pela reduzida penetração do fotossensibilizador em seu interior e mesmo que maiores concentrações do fotossensibilizador sejam usadas, a redução do número de colônias ainda é menor do que aquele reportado por tratamentos utilizando antibióticos em condições similares.

Em um estudo clínico controlado, duplo-cego e randomizado, Lulic *et al.* (2009) avaliaram o efeito da TFD utilizando como fonte de luz um *laser* de diodo com comprimento de onda de 670nm e 75mW/cm² de densidade de energia e cloreto de fenotiazina como fotossensibilizador durante um período de avaliação de 12 meses. Para tanto, os autores selecionaram pacientes adultos com periodontite crônica em terapia de suporte periodontal e que tivessem pelo menos um sítio com PS residual ≥5mm com ou sem sangramento. Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo teste (RAR +TFD) e grupo controle (RAR + fotossensibilizador + frequência do *laser* que não fotoativava o cloreto de

fenotiazina). O fotossensibilizador foi injetado nas bolsas periodontais, deixado em contato com os tecidos por três minutos e fotoativado em seguida por um minuto. Esse procedimento foi realizado após a RAR no *baseline*, 1, 2, 7 e 14 dias, totalizando 5 aplicações. Os autores verificaram uma redução significativa ($p=0,01$) na média da PS entre o *baseline* e seis meses após o tratamento. O tempo não influenciou a redução da PS no grupo controle. Após seis meses, foram detectadas maiores reduções na PS no grupo teste quando comparado ao controle. Foi detectado aos seis meses ganho significativo de NIC no grupo teste comparado ao controle ($p=0,01$). Os autores detectaram redução significativa de SS a favor do grupo teste em 3, 6 e 12 meses. Os autores concluem que a repetição desse protocolo de TFD associado à RAR foi capaz de melhorar os padrões clínicos periodontais.

Em um estudo clínico, Sigusch *et al.* (2010) avaliaram o efeito de um procedimento de desinfecção de boca toda utilizando TFD sobre pacientes com periodontite crônica localizada que tinham sido detectadas presença de *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) 3 semanas após a realização dos procedimento de RAR. As avaliações clínicas e microbiológicas foram realizadas no *baseline* (3 semanas após RAR), 1, 4 e 12 semanas após. O protocolo de TFD realizou em um estágio a desinfecção de boca toda, utilizando fenotiazina como agente fotossensibilizador e como fonte de luz *laser* de diodo com 660nm de comprimento de onda aplicado com nos sítios periodontais e na língua com auxílio de uma ponteira de fibra óptica de 0,6mm de diâmetro. O fotossensibilizador foi deixado agir por um minuto nos sítios e cada face do dente e da língua (divididos em seis partes) foi fotoativada por 10 segundos, totalizando um minuto por dente/língua. Os autores verificaram após 12 semanas que o grupo tratado com TFD após RAR apresentou índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e vermelhidão gengival significativamente menores quando comparados ao grupo controle não tratado com TFD ($p<0,05$). Nenhuma diferença intergrupo, porém,

foi verificada quanto ao NIC. A avaliação microbiológica por PCR revelou níveis significativamente inferiores de *F. nucleatum* no grupo TFD após 12 semanas. Os resultados deste estudo corroboram o uso desse protocolo de TFD como terapia coadjuvante da RAR para que se alcance melhor controle microbiológico e de sinais clínicos de inflamação periodontal.

Novaes Jr *et al.* (2011) avaliaram o efeito de um protocolo de TFD sobre o perfil microbiológico de pacientes com periodontite agressiva. O estudo do tipo boca dividida foi realizado em dentes monorradiculares com PS ≥ 5 mm. Em cada par contralateral, um dente foi escolhido aleatoriamente para receber RAR ou TFD. O protocolo de TFD utilizou cloreto de fenotiazina como agente fotossensibilizador e *laser* de diodo com 660nm de comprimento de onda como fonte de luz aplicado nos sítios periodontais com auxílio de uma ponteira de fibra óptica de 0,6mm de diâmetro. O fotossensibilizador foi deixado agir por um minuto nos sítios e o tempo total de fotoativação com o *laser* foi de três minutos/dente. A coleta das amostras de placa subgengival foram feitas 7 dias antes dos tratamentos, *baseline* e 90 dias pós-tratamento. A avaliação de 40 espécies de bactérias foi realizada pela técnica de DNA-DNA *checkerboard*. A avaliação intergrupo de 90 dias mostrou que o grupo em que foi utilizada TFD foi mais eficaz na redução de *A.a* ($p < 0,05$). Porém, o grupo tratado com RAR mostrou maiores reduções na contagem de espécies bacterianas no grupo vermelho (*P.g*, *T.d*, *T.f*) ($p < 0,05$). Os autores concluem que o protocolo de TFD usado no estudo e RAR agem de formas distintas sobre grupos bacterianos específicos, sugerindo que o uso da TFD como terapia adjunta à RAR poderia ser benéfica ao tratamento não cirúrgico da periodontite agressiva.

Uma revisão sistemática com metanálise publicada por Azarpazhooh *et al.* (2010) avaliou o efeito da TFD enquanto monoterapia ou terapia adjunta ao tratamento de pacientes com periodontite. Foram incluídos estudos clínicos randomizados, realizados em pacientes adultos (maiores de 18 anos) com periodontite. As medidas de avaliação primária foram NIC, PS. As medidas de

avaliação secundária foram sangramento à sondagem, índice de sangramento de boca toda, índice gengival, índice de placa, recessão gengival, investigação microbiológica, efeitos adversos e halitose. Todos os protocolos de TFD foram considerados como elegíveis. Assim, dos 24 estudos potenciais inicialmente selecionados, cinco foram incluídos na revisão sistemática. Desses cinco estudos, quatro utilizaram como cloreto de fenotiazina como fotossensibilizador e um utilizou azul de metileno. Todos os estudos, exceto o que utilizou azul de metileno (fonte de luz usada foi *laser* diodo arsênio-gálio) usaram *laser* de diodo como fonte de luz. O tempo de irradiação do fotossensibilizador variou de 10 segundos a 1,11 minutos. Os autores verificaram apenas aumento numérico significativo no ganho de NIC e na redução da PS nos grupos TFD + RAR, porém os resultados não têm relevância clínica (0,34mm e 0,25mm respectivamente). Assim, os autores concluem que não há evidência clínica do benefício da TFD aplicada como monoterapia ou terapia adjunta nos resultados, porém, reconhecem a heterogeneidade da amostra.

Em outra revisão sistemática com metanálise publicada em 2011, Sgolastra *et al.* também avaliaram o efeito da TFD enquanto monoterapia ou terapia adjunta ao tratamento de pacientes com periodontite crônica. Foram incluídos estudos clínicos randomizados e controlados com delineamento paralelo, realizados em pacientes maiores de 18 anos diagnosticados com periodontite crônica, comparando TFD enquanto monoterapia e como terapia adjunta à RAR ou em combinação com um placebo. As variáveis primárias avaliadas foram ganho de NIC e redução de PS. As variáveis secundárias foram recessão gengival, índice de placa (IP), índice gengival (IG), efeitos adversos e análises microbiológicas. Assim, dos 13 estudos potenciais inicialmente selecionados, sete foram incluídos na revisão sistemática. Desses sete estudos, quatro utilizaram como cloreto de fenotiazina como fotossensibilizador, dois utilizaram azul de metileno e um usou cloreto de tônium. Todos os estudos utilizaram como fonte de luz *lasers* de diodo com

comprimento de onda variando de 643-680nm e tempo de fotossensibilização de 60 segundos. Dos estudos avaliados, três mostraram benefício significativo na redução de SS no grupo TFD + RAR quando os valores foram comparados ao *baseline* e dois mostraram redução significativa no índice de sangramento de boca toda. Nenhuma diferença foi detectada quanto ao índice de placa. Quanto aos resultados microbiológicos, um estudo mostrou redução significativa de *P.g* a favor do grupo TFD + RAR e outro estudo mostrou reduções significativas de *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga* no grupo TFD + RAR. A metanálise mostrou que aos três meses o grupo TFD + RAR teve significativos ganhos de NIC e redução da PS ($p<0,05$). Porém, aos seis meses nenhuma diferença foi observada entre os grupos quanto ganho de NIC, redução de PS ou recessão gengival. Assim, os autores concluem que não há evidência clínica para usar esses protocolos de TFD enquanto monoterapia, porém o uso da TFD enquanto terapia adjunta à RAR foi capaz de promover melhoras de parâmetros clínicos a curto prazo.

Campos *et al.* (2012) verificaram, em um estudo clínico prospectivo de boca dividida, o efeito da TFD como método coadjuvante à RAR de bolsas periodontais residuais que necessitavam de reinstrumentação. Para realização da TFD os autores utilizaram como fotossensibilizador o azul de metileno e como fonte de luz um *laser* de diodo com comprimento de onda de 660nm, 60mW de potência e densidade de energia de 129J/cm. Os autores reavaliaram os pacientes após três meses e verificaram melhoras clínicas associadas à TFD: lado tratado com RAR + TFD teve ganhos significativos de inserção clínica (NIC) comparados ao lado RAR ($p<0,05$) e, também, maiores reduções de sangramento à sondagem em sítios com profundidade de sondagem menores que 5mm ($p<0,05$).

Em outro estudo de boca dividida, Bassir *et al.* (2012) avaliaram o efeito adjunto da TFD em sítios previamente tratados com abordagem não-cirúrgica com RAR. Os sítios previamente tratados com RAR foram divididos

para receber uma das modalidades de terapia adjunta imediatamente após a RAR, 7 dias e 14 dias: somente LED (comprimento de onda 625-635 nm); somente fotossensibilizador (azul de toluidina 0,01mg/ml), TFD (LED + Fotossensibilizador), controle sem terapia adjunta. Após um e três meses, os autores não observaram nenhuma melhora nos parâmetros clínicos periodontais avaliados entre os grupos, mostrando que nesse protocolo não houve melhora clínica atribuída à TFD.

Os estudos clínicos apresentados mostraram a facilidade de aplicação da TFD e a eficácia de vários dos protocolos apresentados no controle do biofilme e na melhora de parâmetros clínicos periodontais. Porém, ainda faz-se necessário avaliar a aplicabilidade de novos protocolos que possam aumentar a eficácia antimicrobiana da TFD.

2.4 Curcumina Como Possível Fotossensibilizador

Como visto nesta revisão de literatura, ainda não existe um consenso sobre o melhor protocolo clínico de TFD a ser utilizado em periodontia. Portanto, fazem-se necessárias pesquisas de novas substâncias fotossensibilizadoras que possam ser utilizadas nos procedimentos de TFD com finalidade de potencializar o efeito antimicrobiano sobre o biofilme periodontal.

A curcumina [(E,E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] é um pigmento fenólico amarelo extraído do açafrão da terra, que é obtido, por sua vez, do rizoma pulverizado da *Curcuma longa* juntamente com a demetoxi-curcumina e a bisdemetoxi-curcumina (Bhawana *et al.*, 2011). Inicialmente utilizado como corante e conservante de comida, foi posteriormente usado como remédio caseiro em toda Ásia. Atualmente, a curcumina tem atraído a atenção dos pesquisadores devido suas potenciais

ações farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes (Pizzo *et al.*, 2010), anti-inflamatórias (Aggarwal & Harikumar, 2009), antitumorais (Lee *et al.*, 2009), anti-leshimaniose (Kaminaga *et al.*, 2003), anti-fúngica (Kaminaga *et al.*, 2003) e anti-bacteriana (De *et al.*, 2009). Em estado natural, a curcumina é praticamente insolúvel em água. Apresenta-se, porém, solúvel em meio alcalino, apesar de ter rápida degradação hidrolítica em soluções com PH básico, levando à condensação de corantes e à formação de subprodutos indesejáveis à base de metano (Tønnesen *et al.*, 2002). Por isso, estudos como de Bhawana *et al.* (2011) e de Abdel *et al.* (2012) vêm avaliando métodos de nanoparticularização ou de alteração molecular da estrutura da curcumina para torná-la solúvel em água.

A curcumina e seus derivados têm sido propostos como potenciais agentes fotossensibilizadores que poderiam ser utilizados na TFD com finalidade antimicrobiana. Sua capacidade de absorver a luz é devida à presença de dois sistemas conjugados de elétrons que lhe permitem absorção luminosa. É essa capacidade de absorver a luz que lhe confere sua coloração amarelada. Portanto, as propriedades químicas e biológicas de suas moléculas na presença de luz poderiam ser alteradas e, possivelmente, potencializadas (Dahl *et al.*, 1989). Sua máxima absorção ocorre em comprimentos de onda relativamente baixos (300–500nm) (Araújo *et al.*, 2012).

A utilização da curcumina como fotossensibilizador deve ser restrita à aplicação tópica, sendo de uso ideal em feridas infectadas superficialmente ou em infecções orais. Isso se deve ao fato do comprimento de onda correspondente a sua fotoativação ser também o mesmo absorvido por biomoléculas, comprometendo, dessa forma, sua penetração nos tecidos adjacentes (Hegge *et al.*, 2011). Além disso, a curcumina possui baixa toxicidade no escuro, o que é uma característica desejada a um fotossensibilizador (Dahl *et al.*, 1989; Meisel & Kocher, 2005).

Tønnesen *et al.* (1987) mostraram que produtos provenientes da fotossensibilização das moléculas de curcumina, como ácido ferúlico e vanilina, não são responsáveis por sua citotoxicidade. O mecanismo fotossensibilizador da curcumina ainda não é bem conhecido, mas parece depender da presença de oxigênio para que ocorra (Dahl *et al.*, 1989; Tønnesen *et al.*, 1987). Atualmente, sabe-se que o efeito citotóxico das moléculas de curcumina submetidas à fotossensibilização ocorrem devido à produção de formas tóxicas de oxigênio, como oxigênio singlete (Chignell *et al.*, 1994), peróxido de hidrogênio e superóxido (Dahl *et al.*, 1989; Dovigo *et al.*, 2011).

Dahl *et al.* (1989) avaliaram o efeito citotóxico da curcumina na presença da luz em bactérias Gram-positivas, a saber *Sacrina lutea* (atualmente denominada de *Micrococcus luteus*) e *Staphylococcus aureus*, e sobre bactérias Gram-negativas, a saber *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Os autores verificaram uma maior ação citotóxica da curcumina fotoativada sobre as bactérias Gram-positivas, sendo o *Staphylococcus aureus* a bactéria que melhor respondeu à terapia. Os autores também verificaram através de determinação amperométrica que a reação de fotoativação da curcumina não produz oxigênio singlete, mas sim peróxido de hidrogênio que, apesar de ser menos citotóxico, possui período de ação relativamente mais longo participando ativamente no efeito antimicrobiano desse protocolo. Os autores não verificaram efeito citotóxico da curcumina sem fotoativação nas concentrações micromolares utilizadas mostrando que não há citotoxicidade da curcumina nessa concentração.

Chignell *et al.* (1994) mostraram que a fotoquímica da curcumina, incluindo os tipos tóxicos de oxigênio produzidos, estão em dependência do microrambiente no qual a molécula foi diluída. Os autores verificaram que solventes apróticos, como tolueno e acetonitrila, produzem uma maior quantidade de oxigênio singlete do que os solvente próticos. Os autores verificaram maior produção de oxigênio singlete quando a solução contendo

curcumina foi diluída em tolueno, benzeno e acetonitrila e fotoativada em seguida. Porém, quando concentrações semelhantes de curcumina foram diluídas em etanol, isopropanol, dodecil sulfato de sódio e micelas de Triton-X em “água pesada” (D₂O: oxigênio e deutério) foi verificada uma queda de 10 vezes na produção de oxigênio singleto. Os autores verificaram, também, que a geração de oxigênio singleto depende pouco da concentração de O₂ no meio, mostrando que soluções de tolueno saturadas de oxigênio tiveram um aumento de apenas 6% na produção de oxigênio singleto quando comparada à solução de tolueno contendo apenas 14% de oxigênio em sua composição. Os autores discutem que se houvesse possibilidade de diluição de altas concentrações de curcumina em solvente aquosos ou água, poderia se verificar produção de peróxidos e uma maior produção de oxigênio singleto.

Em uma criteriosa e extensa revisão, Jagetia & Aggarwal (2007) abordaram os estudos dos últimos 30 anos que avaliaram os efeitos da curcumina no sistema imunológico. Os autores mostraram que a curcumina é um potente agente imunomodulador celular e que pode modular a ativação de células T e B, macrófagos, neutrófilos, células natural killers (NK) e células dendríticas. Além disso, os autores mostraram que a curcumina tem funções de imunomodular a resposta de citocinas e quimiocinas: reduzem a produção de fator de necrose tumoral (TNF); reduzem a produção de interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12; inativa a transcrição de fator NF- κ B. A ingestão de baixas doses de curcumina também tem mostrado efeito benéfico em doenças autoimunes, como Alzheimer, diabetes, esclerose múltipla, alergias, asma e artrite reumatoide. Sua aplicação tópica em gel de curcumina 1% tem mostrado redução na densidade de células T CD8⁺, mostrando efetividade no tratamento de psoríase. Portanto, a ação da curcumina está para além da ação antimicrobiana, mostrando que o benefício de seu uso pode ser, em parte, explicado pela imunomodulação celular e humoral promovida por esse pigmento.

Autores têm avaliado as propriedades antifúngicas da curcumina. Martins *et al.* (2009) avaliaram *in vitro* o efeito inibitório da curcumina sobre a adesão epitelial de 33 cepas de fungos. As concentrações utilizadas de curcumina foram de 0,5-256mg/L e o grupo controle do estudo foi tratado com concentrações entre 0,06-64 mg/L de fluconazol. A curcumina mostrou ser mais eficiente que o fluconazol na inibição nas cepas de *P. brasiliensis* MG05 (0,5mg/L x 16mg/L), pb18 (2mg/L x 8mg/L) e B339 (2mg/L x 8mg/L). A curcumina mostrou ser mais eficaz na inibição da adesão epitelial de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis* Cd22 e *Candida dubliniensis* Cd28, mostrando ser um agente com ação antifúngica promissora. Dovigo *et al.* (2011) avaliaram o efeito citotóxico da curcumina como fotossensibilizador de um protocolo de TFD sobre *Candida albicans* (*C. albicans*). Assim, os autores utilizaram uma solução *stock* de curcumina 200 μ M diluída em uma solução salina contendo 10% de DMSO. Os autores utilizaram um LED azul com comprimento de onda variando de 440-460nm e irradiância de 22mWcm⁻². Foram avaliados diferentes tipos de fluência (1,32-37,5Jcm⁻²), tempo de irradiação da luz (1 a 29 minutos), concentração da curcumina (0,005 μ M a 20 μ M), tempo de ação da curcumina (5 e 20 minutos), aqui denominado de período de pré-irradiação (PIR) em suspensões contendo *C. albicans* em estado planctônico e em biofilme. Os autores verificaram que a PIR da curcumina sobre o biofilme é uma variável importante nos resultados obtidos e que períodos mais longos de PIR (máximo usado de 20 minutos) foram importantes para que a curcumina penetrasse mais profundamente no biofilme e aumentasse a redução do metabolismo da *C. albicans*. Verificaram, ainda que fluência de luz acima de 5,28 Jcm⁻² não foi capaz de aumentar o efeito citotóxico da curcumina. Introduzindo trinitreto de sódio (NaN₃) nas reações, os autores verificaram menores taxas de oxigênio singleto produzido pela fotoativação e verificaram que possivelmente o efeito antimicrobiano desse protocolo estaria primariamente relacionado à produção de peróxido de oxigênio que, por sua vez, também exerce efeito antimicrobiano. Embora a TFD

tenha sido fototóxica para os macrófagos, a terapia foi mais eficaz na inativação das células planctônicas do que o das células de defesa. A taxa de fotodegradação da curcumina dentro das soluções preparadas indicou que curtos períodos de iluminação são suficientes para a que haja correta fotoativação do corante, conseguindo-se o efeito citotóxico esperado.

Bhawana *et al.* (2011) incorporaram moléculas de curcumina a nanopartículas, conseguindo uma ótima solubilidade em água. Os autores avaliaram a eficácia antimicrobiana de soluções com microconcentrações de curcumina diluídas em água (nanoparticulada) e em DMSO (natural). Os autores observaram que menores concentrações inibitórias mínimas de soluções com curcumina nanoparticulada eram necessárias para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger*. Da mesma forma, o halo de inibição desses microrganismos, quando testadas soluções com curcumina natural diluída em DMSO e nanoparticulada, ambas contendo 400µg/ml, mostrou ser maior na solução nanoparticulada. Os autores acreditam que a melhor ação antimicrobiana ocorreu devido ao tamanho reduzido das nanopartículas (2-4nm) enquanto as dissolvidas em DMSO eram significativamente maiores (500-800nm), permitindo uma melhor penetração celular. Além disso, os autores hipotetizaram que, devido ao tamanho das nanopartículas de curcumina, as mesmas se ancoraram à parede bacteriana, rompendo-a e, assim, penetrando na célula e rompendo a estrutura dos componentes internos celulares, aumento ainda mais sua efetividade.

Em um estudo clínico, Araújo *et al.* (2012) avaliaram o efeito de um protocolo de desinfecção de boca pela TFD usando curcumina. Para tanto, os autores utilizaram uma solução de curcumina hidrossolúvel numa concentração de 1,5g/L como fotossensibilizador e como fonte de luz um LED de 450nm de comprimento de onda e 67mW/cm² de intensidade, com uma fluência estimada em 20,1J/cm². Os autores coletaram saliva de 13 pacientes saudáveis após o

bochecho de 5 minutos com 20ml da solução de 1,5 g/L de curcumina para cultura de microrganismos. Os pacientes foram divididos em dois grupos: TFD (luz + curcumina) ou só curcumina. Os resultados do grupo sem luz e sem curcumina foram omitidos do estudo. Os pacientes do grupo TFD foram submetidos à exposição de luz (LED) por mais 5 minutos. Os autores verificaram redução significativa ($p < 0,05$) na quantidade de colônias de bactérias do grupo TFD, que mostrou um declínio de 68% contra apenas 9% observados no grupo só curcumina. Com isso, os autores concluem que a curcumina não possui citotoxicidade quando não estimulada pela luz e que a desinfecção de boca toda foi capaz de reduzir em uma única aplicação a quantidade de bactérias salivares.

Por outro lado, Ribeiro *et al.* (2012) mostraram em um estudo *in vitro* que a citotoxicidade da curcumina na TFD não estaria somente relacionada a microrganismos. Os autores avaliaram o efeito da TFD em culturas de *S. aureus* susceptíveis e não-susceptíveis à metilina e em fibroblastos. Para tanto, utilizaram soluções com concentrações finais de curcumina, diluídas em solução salina, 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M, ficando 20 minutos em contato com as culturas antes da fotoativação. As soluções continham concentração final constante de 10% de DMSO. As soluções foram ativadas com um dispositivo de LED com 455nm de comprimento de onda e foram testadas três fluências de luz (18,0J/cm², 25,5J/cm², 37,5J/cm²). Os autores não deixaram explícito o tempo de fotoativação. As concentrações das soluções com curcumina contendo 5 μ M, 10 μ M, e 20 μ M resultaram na total eliminação das culturas de *S. aureus* susceptíveis à metilina em qualquer das fluências utilizadas na fotoativação com LED. A total eliminação de *S. aureus* não-susceptíveis à metilina ocorreu utilizando-se a solução de 20 μ M de curcumina associada à fluência 37,5J/cm² do LED. Os autores também verificaram que a atividade metabólica dos fibroblastos reduziu em 68%, 75,1% e 80% quando expostos a 5 μ M, 10 μ M, e 20 μ M de curcumina em combinação ao LED (TFD).

Os autores perceberam, ainda, que apenas poucos fibroblastos tratados com TFD continuaram aderidos à placa de vidro, mostrando que esse protocolo de TFD pode não somente ser citotóxico ao fibroblasto como também altera sua adesão à superfície. Assim, mais estudos são necessários para verificar a interação desse protocolo com os tecidos vivos, avaliando-se a biocompatibilidade com tecidos orais da TFD usando-se curcumina.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivos avaliar um protocolo de TFD utilizando-se um sal de curcuminóides com concentração final de curcumina 10%, como fotossensibilizador, e um LED (450nm), como fonte de luz, em dentes de ratos com periodontite experimental induzida por ligadura:

- I. *In vivo*: Histometricamente e histoquimicamente a influência deste protocolo de TFD sobre a evolução da periodontite.
- II. *In vitro*: o efeito antimicrobiano deste protocolo de TFD no biofilme retido nas ligaduras a partir da contagem geral de colônias bacterianas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 45 ratos adultos com 16 semanas de idade, machos, da raça Wistar, pesando entre 350g e 400g. Os animais foram acondicionados no biotério da FOP-UNICAMP, mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais passaram por um período de 5 dias para a aclimação ao ambiente do laboratório, a uma temperatura de 22º a 24º C. Esta pesquisa foi aceita pela Comissão de Ética em Experimentos com Animais sob protocolo de número 2727-1 (Anexo 1).

4.2 Delineamento Experimental

O experimento realizado foi do tipo boca dividida e ambos 1^{os} molares inferiores dos animais receberam inserção de ligadura no *baseline*. Os lados foram aleatoriamente escolhidos por sorteio para receber só a inserção de ligadura (grupo Controle) ou ligadura e TFD (grupo TFD). O grupo controle negativo (CN) não recebeu nem inserção de ligadura e nem TFD. Dessa forma, 45 ratos foram alocados aleatoriamente em um dos grupos abaixo (Figura 2):

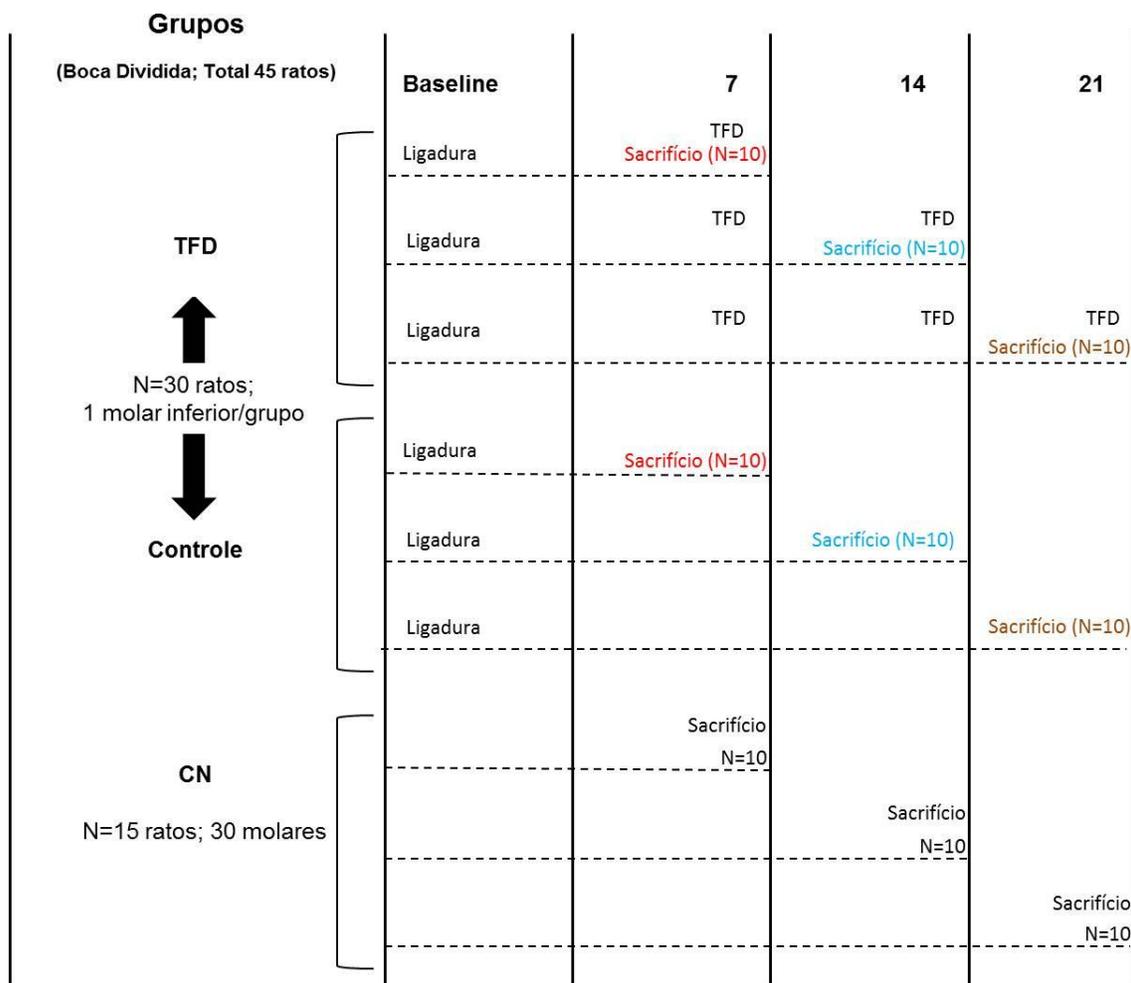


Figura 2 – Representação esquemática dos grupos experimentais e regimes de aplicação da terapia fotodinâmica (TFD).

4.2.1 Grupo TFD

No grupo TFD, 30 animais receberam em um dos 1^{os} molares inferiores aleatoriamente escolhidos por sorteio a colocação de ligaduras de algodão subgingivalmente no *baseline* sob anestesia com ketamina (1ml/kg) (Dopalen[®]; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3ml/kg) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP,

Brasil). Para correta inserção da ligadura, os animais tiveram seus maxilares abertos por intermédio de um aparato de Doku. Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 períodos para avaliar a ação da TFD nos sítios com periodontite induzida: 7 dias; 14 dias; 21 dias.

No 7º dia após a inserção da ligadura, os 30 animais foram novamente anestesiados com ketamina (1ml/kg) (Dopalen®; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3ml/kg) (Virbaxil®; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil) e tiveram novamente seus maxilares abertos por intermédio de um aparato de Doku. Dessa forma, o 1º molar inferior aleatoriamente escolhido foi isolado relativamente com segmentos de gaze para que se seguisse a administração de 5 gotas de uma substância fotoativadora à base de Curcumina 10%. A solução ficou em contato pré-irradiação com a superfície do 1º molar ligado por 60 segundos (de Almeida *et al.*, 2008b; Fernandes *et al.*, 2009; Theodoro *et al.*, 2012; Cappuyns *et al.*, 2012) e foi fotoativada em seguida pela exposição a um LED de luz azul com comprimento de onda de 450nm. A fonte de luz foi localizada a aproximadamente 0,5mm da superfície oclusal do dente por 60 segundos (de Almeida *et al.*, 2008a, b; Carvalho *et al.*, 2001; Lulic *et al.*, 2009). Após a realização da TFD (Curcumina 10% + LED), as ligaduras de 10 animais (correspondentes àqueles do período de 7 dias) foram coletadas e esses 10 animais foram sacrificados por decapitação. As hemimandíbulas foram obtidas para realização dos procedimentos histológicos e as ligaduras para procedimentos microbiológicos.

No 14º dia, 20 animais foram novamente anestesiados de acordo com a técnica detalhada no parágrafo anterior e tiveram suas mandíbulas abertas por intermédio do aparato de Doku. O mesmo molar submetido à TFD aos 7 dias recebeu aos 14 dias a 2ª aplicação do protocolo de TFD descrito acima, respeitando a forma de aplicação da Curcumina 10%, o período de pré-irradiação do fotossensibilizador e o período de fotoativação. As ligaduras de 10

animais (corresposndentes àqueles do período de 14 dias) foram coletadas e esses mesmos animais foram sacrificados por decapitação. As hemimandíbulas foram obtidas para realização dos procedimentos histológicos e as ligaduras para procedimentos microbiológicos.

No 21^º dia, os 10 animais restantes foram novamente anestesiados de acordo com a mesma técnica descrita e tiveram suas mandíbulas abertas por intermédio do aparato de Doku. O mesmo molar submetido à TFD aos 7 e aos 14 dias recebeu aos 21 dias a 3^a aplicação do protocolo de TFD descrito acima, respeitando, mais uma vez, a forma de aplicação da Curcumina 10%, o período de pré-irradiação do fotossensibilizador e o período de fotoativação. As ligaduras desses 10 animais (corresposndentes àqueles do período de 21 dias) foram coletadas e os mesmos foram sacrificados por decapitação. As hemimandíbulas foram obtidas para realização dos procedimentos histológicos e as ligaduras para procedimentos microbiológicos.

4.2.2 Grupo Controle

No Grupo Controle, os 1^{os} molares inferiores contralaterais dos 30 animais receberam somente a colocação de ligaduras de algodão subgengivalmente sob anestesia, como já descrito anteriormente, nos mesmos períodos de 7 (n=10), 14 (n=10) e 21 (n=10) dias. A escolha do lado controle foi feita aleatoriamente por sorteio. Visto que os animais do grupo Controle foram os mesmos animais do grupo TFD, esses animais foram sacrificados nos mesmos períodos já descritos: 7 (n=10); 14 (n=10) e 21 (n=10) dias. As hemimandíbulas foram obtidas para realização dos procedimentos histológicos e as ligaduras para procedimentos microbiológicos.

4.2.3 Grupo CN

No Grupo CN, 15 animais não receberam nem ligadura e nem TFD. Cada período de sacrifício foi pareado aos períodos dos grupos TFD e Controle, com finalidade de se obterem dados iniciais de espessura de ligamento periodontal e de atividade osteoclastos para confirmação do sucesso do modelo de periodontite experimental induzido por ligadura aplicado neste estudo: 7 dias (n=5); 14 dias (n=5); 21 dias (n=5). Em cada período de sacrifício, as duas hemimandíbulas de cada animal foram obtidas para realização dos procedimentos histológicos.

4.3 Indução da Periodontite Experimental

Os animais foram anestesiados por meio da administração intramuscular de ketamina (1ml/kg) (Dopalen[®]; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3ml/kg) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil). Os maxilares foram abertos por meio do aparato de Doku modificado e os dentes foram gentilmente espaçados por intermédio de uma lima endodôntica modificada. A inserção desse instrumento foi realizada entre o 1^o e o 2^o molar inferior para prover o espaço necessário para a inserção das ligaduras de algodão (linha 10 para pipa Pinheiro, Coats Corrente LTDA, São Paulo, SP, Brasil). As ligaduras foram posicionadas bilateralmente ao redor dos primeiros molares inferiores de todos os animais, exceto aqueles pertencentes ao grupo controle negativo (CN), de forma a ficarem posicionadas subgengivalmente. Foram realizados três nós simples, travando-os em sua execução. As ligaduras foram fixadas de forma que os nós ficassem posicionados na face mesial do primeiro molar inferior.

4.4 Fotossensibilizador

Foi administrada uma substância fotossensibilizadora à base de Curcumina 10% diluída em água destilada segundo informação do fabricante (PDT-Pharma, Cravinhos, Brasil) no grupo TFD na frequência de 1 vez nos animais sacrificados com 7 dias (realizada no 7º dia), 2 vezes nos animais sacrificados com 14 dias (realizadas no 7º e no 14º dias) e 3 vezes nos animais sacrificados com 21 dias (realizadas no 7º, 14º e 21º dias). Cada sachê continha 66,7% de N-metil-d-glutamina, 17,8% de curcumina e 15,5% de demais curcuminóides. Uma vez manipulado o sal de curcumina, a solução foi acondicionada em frascos de âmbar envoltos em papel alumínio para que não sofressem influência da luz. Cinco gotas da solução de Curcumina 10%, equivalente a 250µl, (Conselho Regional de Enfermagem, 2011) foram administradas ao redor do primeiro molar que foi isolado de forma relativa com gaze (Figura 3). A solução ficou em contato com a superfície do 1º molar ligado por 60 segundos pré-irradiação e foi fotoativada em seguida.



Figura 3 – Primeiro molar inferior com ligadura isolado relativamente com gaze a fim de receber a solução fotossensibilizadora de curcumina 10%.

4.5 Fonte de Luz

A fotoativação do fotossensibilizador de curcumina 10% foi realizada por intermédio de um protótipo de luz emissora de diodo (LED) azul com comprimento de onda de 450nm (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Para tanto, foi utilizada uma ponteira lateral que permitia exposição da superfície a uma potência de 310mW e um poder de densidade de 122,04mW/cm². A fonte de luz foi localizada a aproximadamente 0,5mm da superfície oclusal do dente e a luz foi aplicada por 60 segundos (Figura 4).



Figura 4 – Fotoativação da solução de curcumina 10% utilizando-se um LED azul com ponteira lateral para aplicação da luz.

4.6 Cultura Microbiana e Contagem de Colônias

Previamente ao sacrifício dos animais, as ligaduras de cada dente foram removidas e colocadas em microtubos esterilizados contendo 450 μ l de solução fluida reduzida de transporte (RTF) descrita previamente por Syed e Loesh (1972). Cada eppendorf contendo a ligadura foi agitado em vórtex por 60 segundos (AP 56, Tecnalise, Piracicaba, SP, Brasil) para que o biofilme fosse removido da ligadura e dispersado na solução. Com o auxílio de uma pipeta, 50 μ l da suspensão foram coletados e diluídos em 450 μ l RTF. Treze diluições sucessivas foram realizadas e alíquotas de 25 μ l de cada diluição foram semeadas em placas de ágar sangue completo, composto por meio Brucella agar com hemina e vitamina K 43,1g/L (Sigma Chemical Co., St Louis, MO,

EUA) acrescidos de sangue desfibrinado de carneiro na proporção de 50ml de sangue para 1L do meio. As placas foram previamente divididas em três terços, e cada um foi semeado em triplicata segundo a diluição referente. As placas semeadas foram incubadas em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera de 80% N₂, 10% de CO₂ e 10% H₂ à temperatura de 37°C, durante 4 dias.

Após desenvolvimento das colônias bacteriana em anaerobioses, foi determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) através de contagem realizada no contador manual (CP 600, Phoenix Equipamentos Científicos, Araraquara, SP, Brasil).

4.7 Sacrifício dos Animais e Processamento Histológico

Os animais foram submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de 1ml/kg de ketamina (Dopalen; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brasil) e 0,3ml/kg de cloridrato de xylazina (Virbaxil; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil). Os animais foram sacrificados por decapitação e as mandíbulas foram removidas e hemi-seccionadas em sua sífise. O material obtido foi imerso em formol a 10% com tampão fosfato (pH 7,0) por 24 horas. Em seguida, as hemi-mandíbulas foram imersas em PBS e a solução trocada por três vezes, sendo que a última troca foi mantida por mais 24 horas. As hemi-mandíbulas foram então descalcificadas com EDTA 20%, com trocas diárias de solução, durante 30 dias, à temperatura ambiente. Após a desmineralização, os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Secções longitudinais méso-distais de 6µm de espessura foram obtidas por auxílio de um micrótomo (Leica RM2155, Germany) (Figura 5). As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina e as imagens da região da furca foram capturadas por microscópio óptico em aumento de 50X (5X objetiva e 10X ocular, Axioskop

2 plus, Zeiss, Jena, Germany). Os parâmetros reabsorção óssea e densidade óssea foram avaliados com auxílio do programa Image-Pro[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

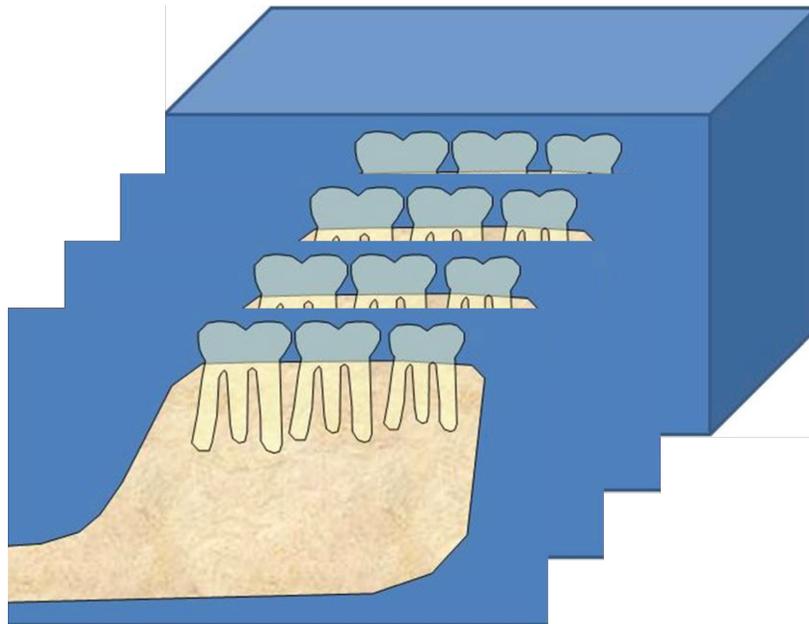


Figura 5 –Esquema mostrando a orientação do corte histológico.

4.7.1 Reabsorção Óssea Inter-Radicular

Escolhida a orientação de corte mais conveniente para a delimitação da região da bifurcação dos primeiros molares mandibulares, foram obtidos cortes seriados de 6 μ m de espessura a partir da tábua óssea vestibular e foram separados os cortes nos quais a região de bifurcação foi identificada. Para a estimativa de volume, foi desprezado o primeiro corte, selecionando-se os demais cortes de forma equidistante segundo o número total de cortes histológicos obtidos por dente. Desse modo, dez cortes histológicos

equidistantes foram selecionados por dente para avaliação histométrica e digitalizados em um aumento de 50X (5X objetiva e 10X ocular).

Utilizando-se o sistema de pontos de um retículo quadriculado (Image-Pro[®], Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), foi mensurada a área de tecido conjuntivo proveniente da reabsorção do tecido ósseo da região interradicular. O retículo foi constituído de quadrados de 0,08mm de aresta e 0,0064mm² de área (Figuras 6 e 7). O retículo foi posicionado de maneira que sempre incluísse dentina coronária e radicular e o tecido ósseo, sendo computados os pontos que coincidissem com as intersecções das arestas dos quadrados adjacentes que estavam dentro da área de tecido conjuntivo presente na região interradicular em consequência da perda óssea. A área de reabsorção óssea foi calculada utilizando-se a fórmula *Área reabsorvida = N^o de pontos x Área do quadrado*. A área de reabsorção óssea da região de furca foi encontrada a partir da média das leituras dos dez cortes equidistantes por dente, expressa em mm².

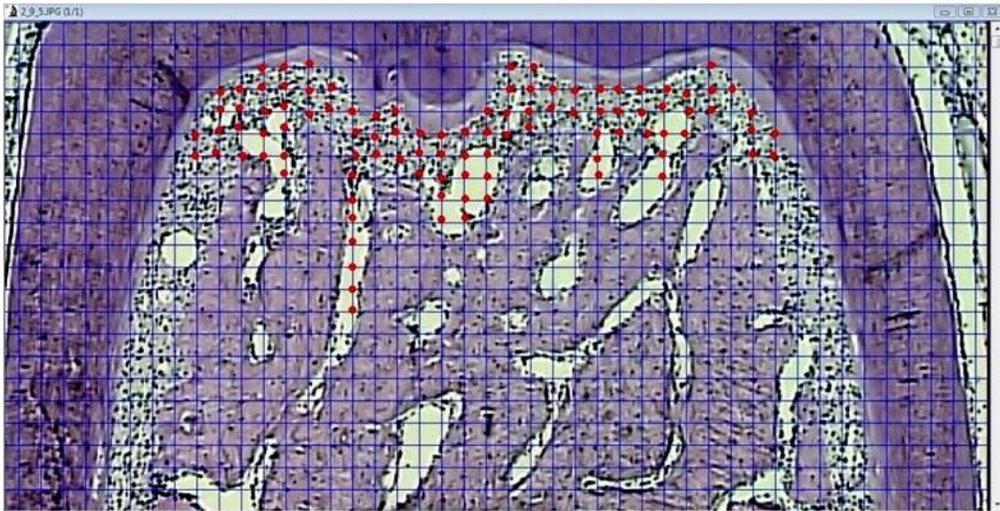


Figura 6 – Representação do retículo do programa Image Pro[®] utilizado para contagem dos pontos referente à análise da área de ligamento periodontal/ reabsorção óssea. Pontos vermelhos coincidem com as intersecções das linhas, representando tecido conjuntivo do ligamento periodontal ou de preenchimento em decorrência da reabsorção óssea alveolar.

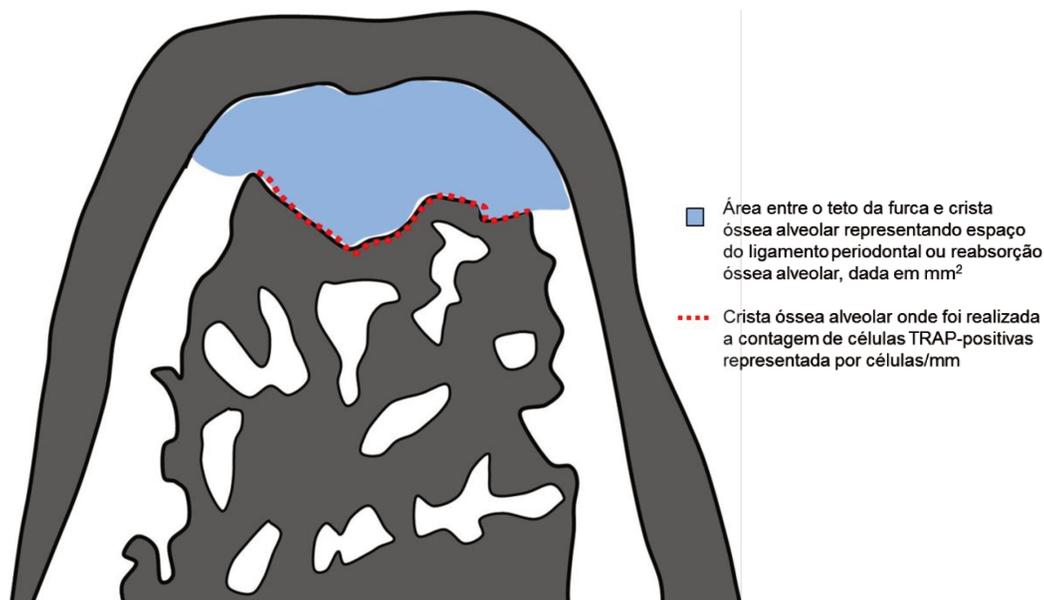


Figura 7 – Representação esquemática das regiões de leitura histométrica do ligamento periodontal/ reabsorção óssea e de contagem de células TRAP-positivas.

4.8 Coloração para Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato - TRAP

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é uma enzima que é expressa em elevados níveis por osteoclastos ativos, macrófagos e células dendríticas (Halleen *et al.*, 2006) e tem sido considerada como marcador sérico específico para se detectar atividade dos osteoclastos e, conseqüentemente, reabsorção óssea. Assim, uma análise histoquímica foi realizada para detecção de células TRAP-positivas.

Para tanto, seções méso-distais de 6µm de espessura foram desparafinizadas e, em seguida, incubadas a 37°C durante 15min com uma mistura de 4mg de naftol AS-BI fosfato (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), como substrato, e 24mg de sal violeta vermelho (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) diluído em 30mL de tampão de acetato (pH 5,2) contendo 0,3

tartarato mmol/L (Sigma), pH 5,0. Para lâminas relativas ao controle negativo da reação, o substrato foi omitido. As secções foram contrastadas com Fast Green (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). A análise quantitativa do número de células TRAP-positivas foi realizada na superfície linear da crista óssea, imediatamente abaixo do teto de furca dos primeiros molares usando um microscópio óptico (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Alemanha), com ampliação de 400X (objetiva de 40X e ocular 10X). Os resultados foram descritos como o número de células positivas para a TRAP/mm (Figura 6).

4.9 Calibração da Examinadora

Para avaliar a calibração da examinadora foi realizada, previamente às leituras finais, a correlação intra-classe das medidas de reabsorção e contagem de células TRAP-positivas. Dez cortes referentes à reabsorção e dez relativos ao TRAP foram aleatoriamente selecionados e suas medições foram feitas e repetidas três semanas após a primeira medição. O alto valor do coeficiente de correlação ($r=0,96$ para ambas medidas; intervalo de Confiança 95%) mostra consistência na reprodutibilidade da leitura, mostrando boa calibração da examinadora.

4.10 Avaliação dos dados

Os dados de reabsorção óssea alveolar e a contagem de células TRAP-positivas foram, inicialmente, avaliados quanto à homogeneidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em vista da heterogeneidade detectada, foram utilizados testes não-paramétricos de Friedman para a análise intragrupo e Kruskal-Wallis com posterior análise de comparações pelo método de Dunn

para a análise intergrupo. Foi selecionado um nível de significância de 5% para todas as análises.

Os dados da contagem de colônias bacterianas foram, também, avaliados quanto à homogeneidade. Em vista da homogeneidade detectada na distribuição de colônias intergrupo, foi utilizado o testes t-Student. Para a análise intragrupo, devido à heterogeneidade da amostra, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi selecionado, para tanto, um nível de significância de 5% para todas as análises.

5 RESULTADOS

Em todos os tempos do experimento (7, 14 e 21 dias), o grupo CN sempre apresentou médias de espessura do ligamento periodontal significativamente inferiores quando comparado aos grupos Controle ($P=0,0001$) e TFD ($p=0,0001$). Esse dado reflete a efetividade do modelo de periodontite induzida por ligadura aplicada neste estudo (Tabela 1, Figura 8A a 8I).

Não foram verificadas alterações das médias de reabsorção quando feita análise entre os grupos Controle e TFD em 7 dias ($p>0,05$) (Figura 8D e 8G), em 14 dias ($p>0,05$) (Figura 8E e 8H) e em 21 dias ($p>0,05$) (Figura 8F e 8I). Esses dados mostram que o protocolo aqui utilizado de TFD com curcumina 10% não foi capaz de alterar a progressão da periodontite (Tabela 1, Figura 9).

Do mesmo modo, quando feita avaliação intragrupo para verificar a influência do tempo e do tratamento no padrão de reabsorção óssea alveolar, não foram observadas diferenças em nenhum dos grupos. A extensão da reabsorção óssea causada pela ligadura aos 7 dias no grupo Controle (Figura 8D) foi semelhante àquela observada aos 14 (Figura 8E) e aos 21 dias (Figura 8F) ($p=0,3$). Da mesma forma, a TFD com curcumina 10% (Figura 8G a 8I) foi ineficaz na redução da reabsorção óssea no grupo TFD ($p=0,3$). O grupo CN (Figura 8A a 8C) não mostrou alteração das dimensões do ligamento periodontal, como esperado, pois não recebeu nem ligadura e nem aplicação de TFD ($p=0,9$). (Tabela 1; Figura 10).

Tabela 1 - Distribuição das médias, seguidas de desvio padrão, de reabsorção óssea ou espessura do ligamento periodontal em mm² segundo o tratamento e o período de indução da periodontite.

Grupos	7 dias	14 dias	21 dias	<i>p</i> (Friedman intra)
CN	0,6±0,2 Aa	0,60±0,2 Aa	0,6±0,2 Aa	0,9
Controle	1,6±0,5 Ba	1,4±0,4 Ba	1,2±0,1 Ba	0,2
TFD	1,7±0,6 Ba	1,7±0,5 Ba	1,5±0,7 Ba	0,3
<i>p</i> (K-Wallis inter)	0,0001	0,0001	0,0001	

CN= Controle negativo; TFD= terapia fotodinâmica. Intergrupos: Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na vertical diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com análise de comparações pelo método de Dunn. Intragrupo: Médias seguidas de letras minúsculas na horizontal diferem entre si pelo teste de Friedman.

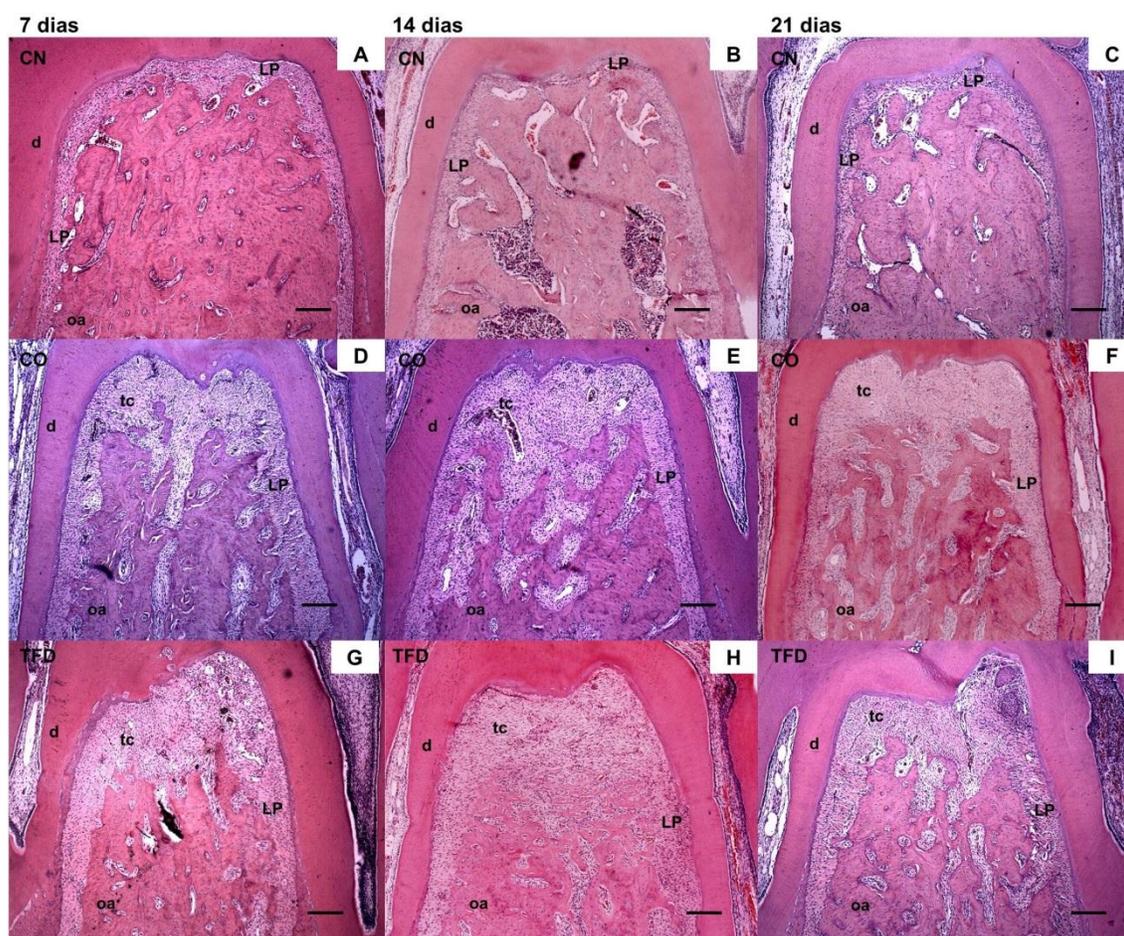


Figura 8 – Fotomicrografias ilustrando área do ligamento periodontal ou reabsorção óssea alveolar na região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 50x (5x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias. TFD= terapia fotodinâmica; CO= controle; CN= controle negativo; d= dentina; tc= tecido conjuntivo proveniente da reabsorção óssea; oa= osso alveolar da furca; LP= ligamento periodontal; Barra= 200µm.

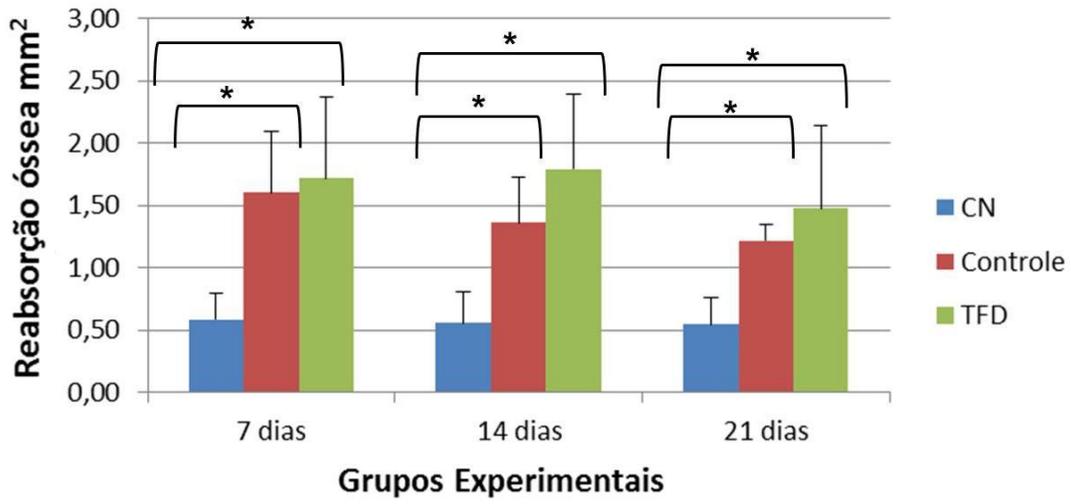


Figura 9 – Gráfico representativo da distribuição intergrupo de médias e desvio padrão de reabsorção óssea/mm². *p<0,05.

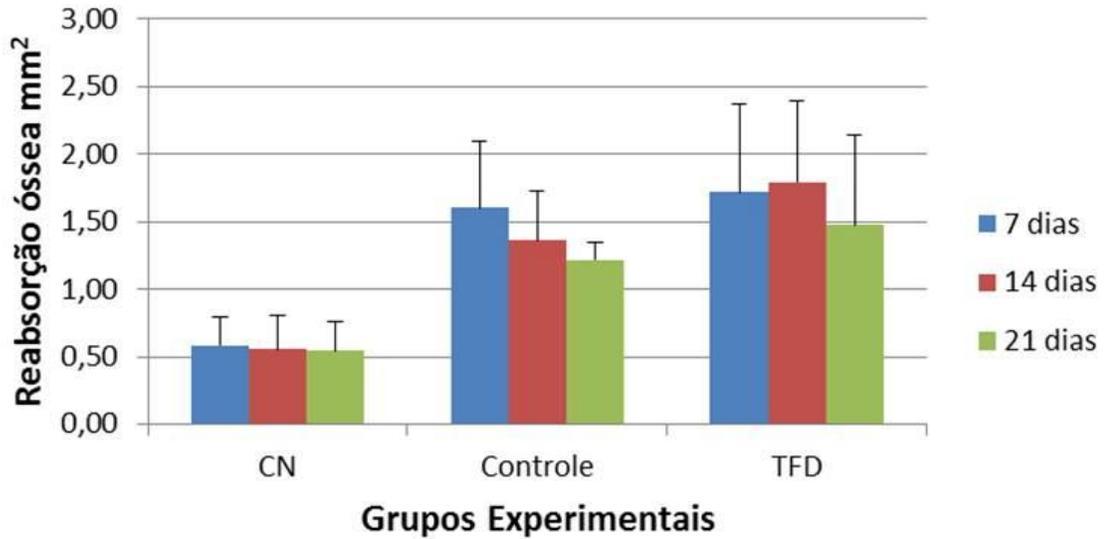


Figura 10 – Gráfico representativo da distribuição intragrupo de médias e desvio padrão de reabsorção óssea/mm².

A avaliação intragrupo mostrou que no grupo TFD houve redução do número de células TRAP-positivas ao longo do tempo (Figura 11A a 11I), sendo o número de células TRAP-positivas verificado aos 21 dias menor que o observado no *baseline* ($p=0,04$) (Tabela 2, Figura 11A, 11C, 11D, 11F, 11G, 11I). Nos grupos Controle (Figura 12A a 12I) e CN (Figura 13A a 13I) não houve influência do tempo na contagem de osteoclastos ($p=0,9$ e $p=0,27$, respectivamente) (Tabela 2, Figura 14).

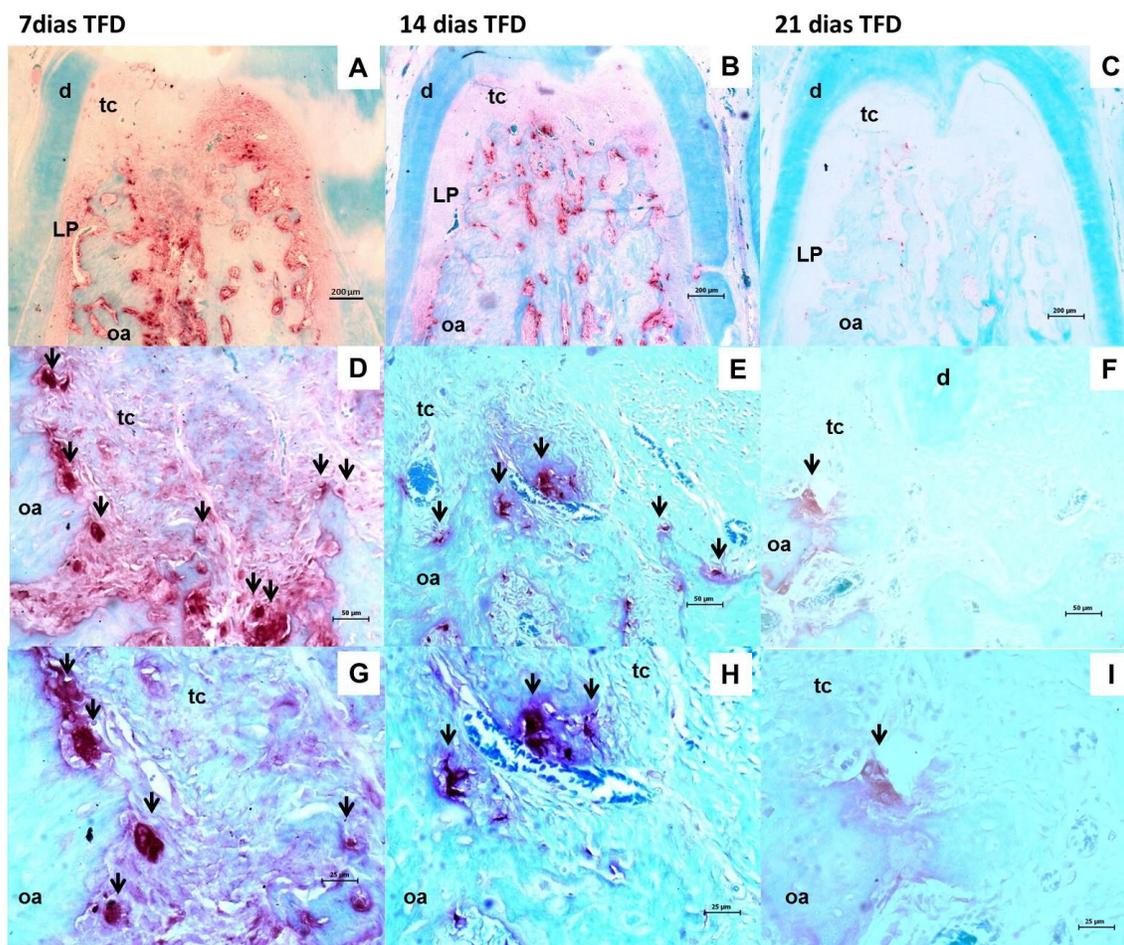


Figura 11 – Fotomicrografias ilustrando células TRAP-positivas no grupo terapia fotodinâmica. Imagens A-C representam a região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 50x (5x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 200 µm. Imagens D-F representam crista óssea da região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 200x (20x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 50 µm. Imagens G-I representam crista óssea da região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 400x (40x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 25 µm. Setas representam células TRAP-positivas = osteoclastos; d= dentina; tc= tecido conjuntivo proveniente da reabsorção óssea; ao= osso alveolar da furca; LP= ligamento periodontal.

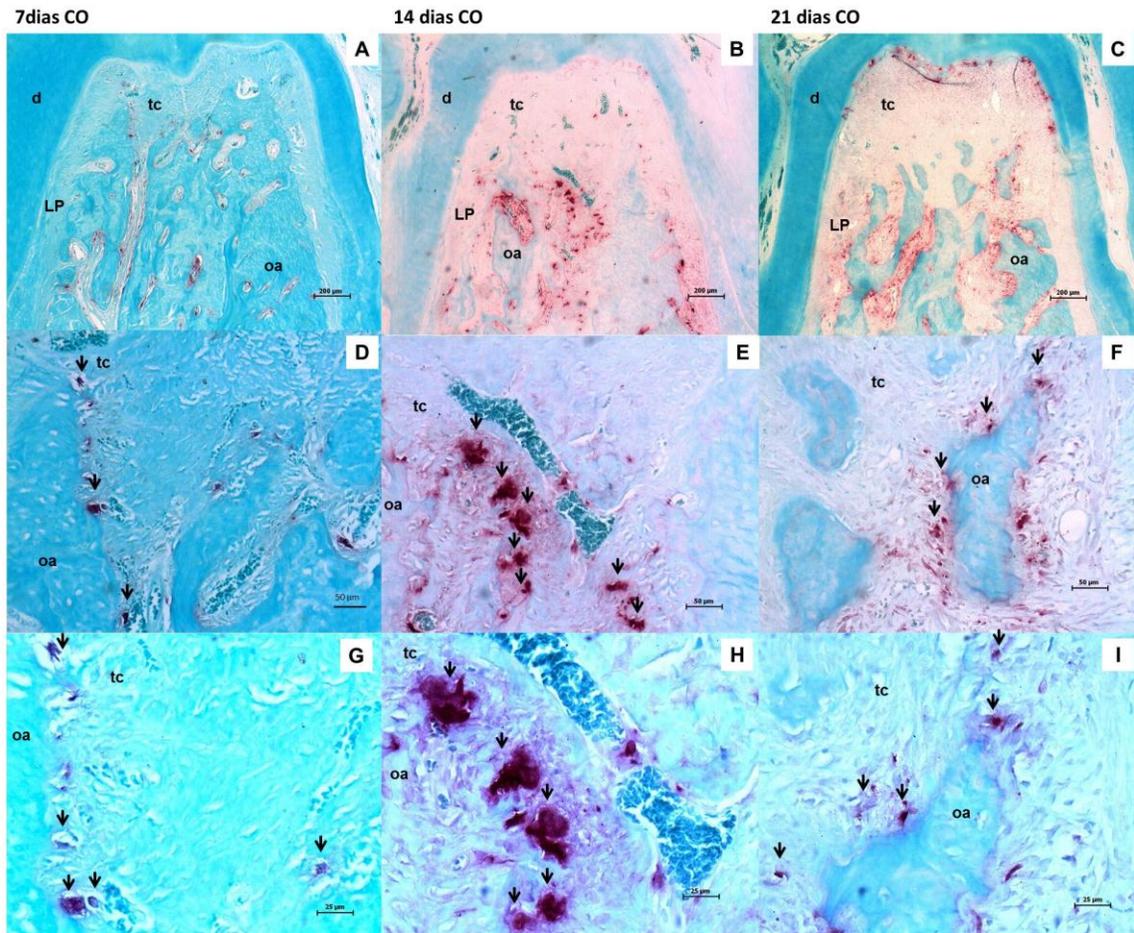


Figura 12 – Fotomicrografias ilustrando células TRAP-positivas no grupo Controle. Imagens A-C representam a região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 50x (5x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 200 µm. Imagens D-F representam crista óssea da região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 200x (20x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 50 µm. Imagens G-I representam crista óssea da região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 400x (40x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 25 µm. Setas representam células TRAP-positivas = osteoclastos; d= dentina; tc= tecido conjuntivo proveniente da reabsorção óssea; ao= osso alveolar da furca; LP= ligamento periodontal.

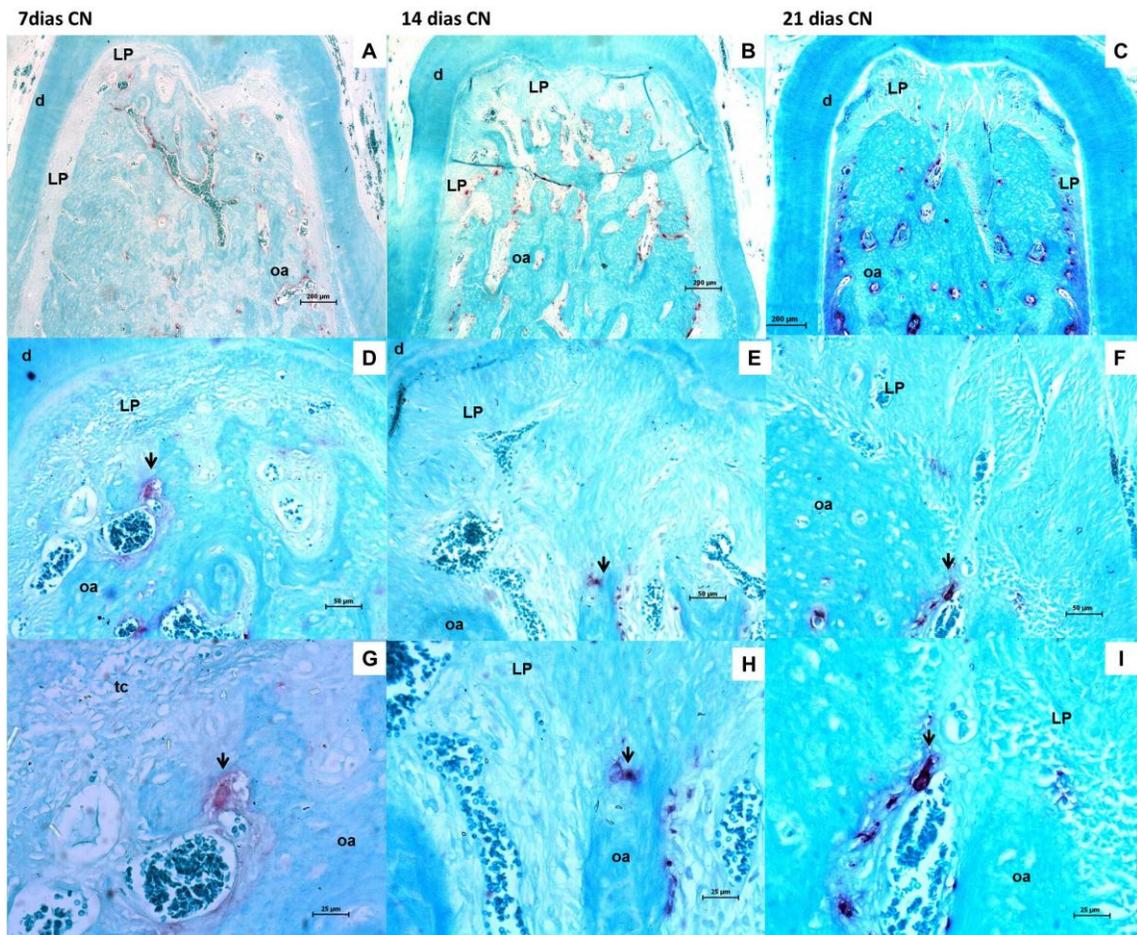


Figura 13 – Fotomicrografias ilustrando células TRAP-positivas no grupo Controle Negativo. Imagens A-C representam a região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 50x (5x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 200 µm. Imagens D-F representam crista óssea da região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 200x (20x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 50 µm. Imagens G-I representam crista óssea da região de furca dos 1^{os} molares em aumento de 400x (40x objetiva e 10x ocular) durante os períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias e Barra= 25 µm. Setas representam células TRAP-positivas = osteoclastos; d= dentina; tc= tecido conjuntivo proveniente da reabsorção óssea; ao= osso alveolar da furca; LP= ligamento periodontal.

Na avaliação intergrupos, o CN (Figura 13A, 13D e 13G) teve valor significativamente menor de células TRAP-positivas (osteoclastos) aos 7 dias quando comparados aos demais grupos ($p=0,01$) (Figura 11A, 11D e 11G; Figura 12A, 12D, 12G). Aos 14 dias não houve diferença entre grupos ($p>0,05$) (Figura 11B, 11E, 11H; Figura 12B, 12E, 12H; Figura 13B, 13E, 13H). Já aos 21

dias, o número de células TRAP-positivas (osteoclastos) observado no grupo Controle (Figura 12C, 12F, 12I) foi significativamente maior que o CN ($p=0,01$) (Figura 13C, 13F, 13I) e o número de células TRAP-positivas (osteoclastos) no grupo TFD (11C, 11F, 11I) não foi diferente do Controle ($P>0,05$) e nem do grupo CN ($P>0,05$) (Tabela 2, Figura 15).

Tabela 2 - Distribuição das médias, seguidas de desvio padrão, de células TRAP-positivas na crista óssea em células/mm segundo o tratamento e o período de indução.

Grupos	7 dias	14 dias	21 dias	p (Friedman intra)
CN	0,6±0,2 Ba	0,6±0,2 Aa	0,6±0,2 Ba	0,27
Controle	9,6±7,0 Aa	5,4±5,0 Aa	7,5±3,6 Aa	0,9
TFD	11,6±8,2 Aa	6,2±4,8 Aab	1,7±3,6 ABb	0,04
p (K-Wallis inter)	0,01	0,11	0,01	

CN= Controle negativo; TFD= terapia fotodinâmica. Intergrupos: Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na vertical diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com análise de comparações pelo método de Dunn. Intragrupo: Médias seguidas de letras minúsculas na horizontal diferem entre si pelo teste de Friedman.

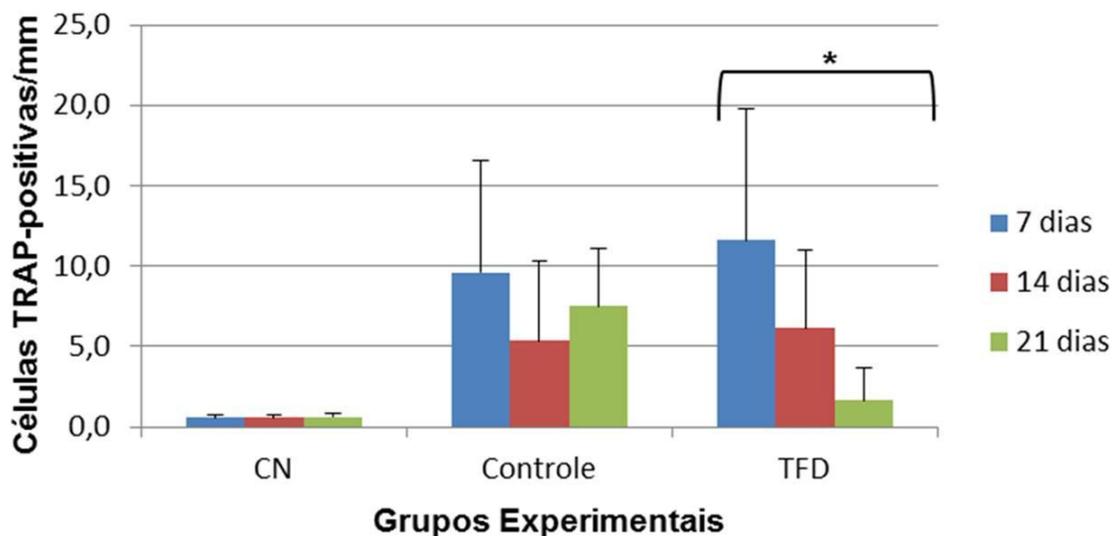


Figura 14 – Gráfico representativo da distribuição intragrupo de médias e desvio padrão de células TRAP-positivas/mm. * $p<0,05$.

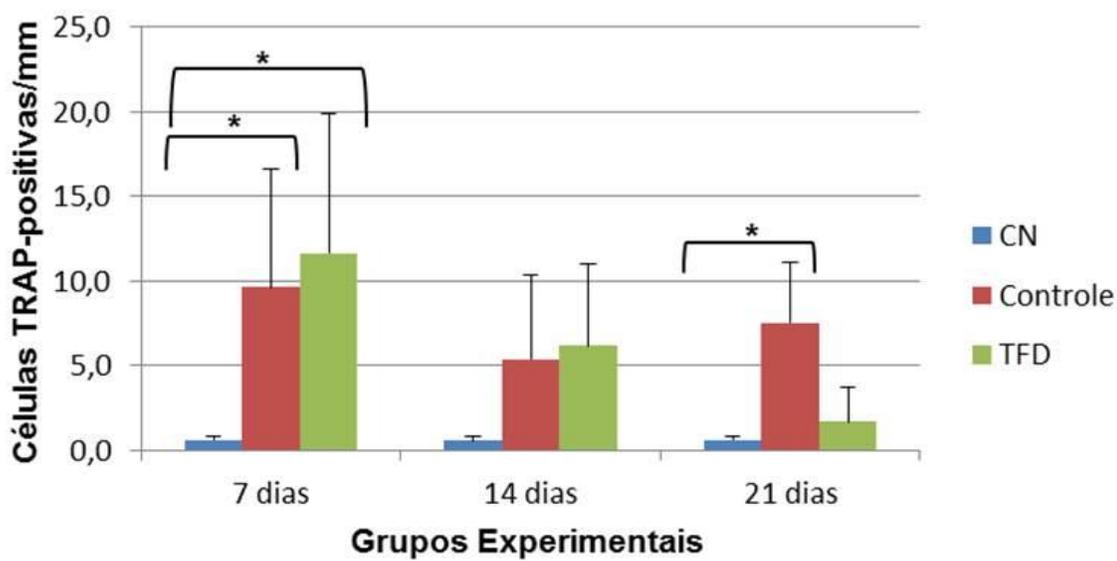


Figura 15 – Gráfico representativo da distribuição intergrupo de médias e desvio padrão de células TRAP-positivas/mm. * $p < 0,05$.

Quanto à contagem das colônias bacterianas, os resultados intergrupo mostraram que aos 7 dias, 100% dos dentes dos ratos expostos à TFD tiveram uma redução significativa no nível de infecção, representado pela redução no número de colônias bacterianas, de 10 a 55 vezes (redução de $1\log_{10}$ a $5,5\log_{10}$), com média de redução de 26x ($2,6\log_{10}$) ($p=0,0003$) (Figura 16A e 16B). Aos 14 dias, 60% dos ratos tratados mostraram uma redução significativa no nível de infecção, representada por uma redução de 9 a 59 vezes do número de colônias bacterianas ($0,9\log_{10}$ a $5,9\log_{10}$), com média de redução de 19x ($1,9\log_{10}$) ($p=0,01$) (Figura 17A e 17B). Aos 21 dias, 40% dos ratos tratados mostraram uma redução no nível de infecção de 10 a 37 vezes ($1\log_{10}$ a $3,7\log_{10}$) com média de redução de 4x ($0,4\log_{10}$), porém sem mostrar uma redução significativa do número de colônias ($p=0,27$) (Tabela 3, Figura 18A e 18B, Figura 19).

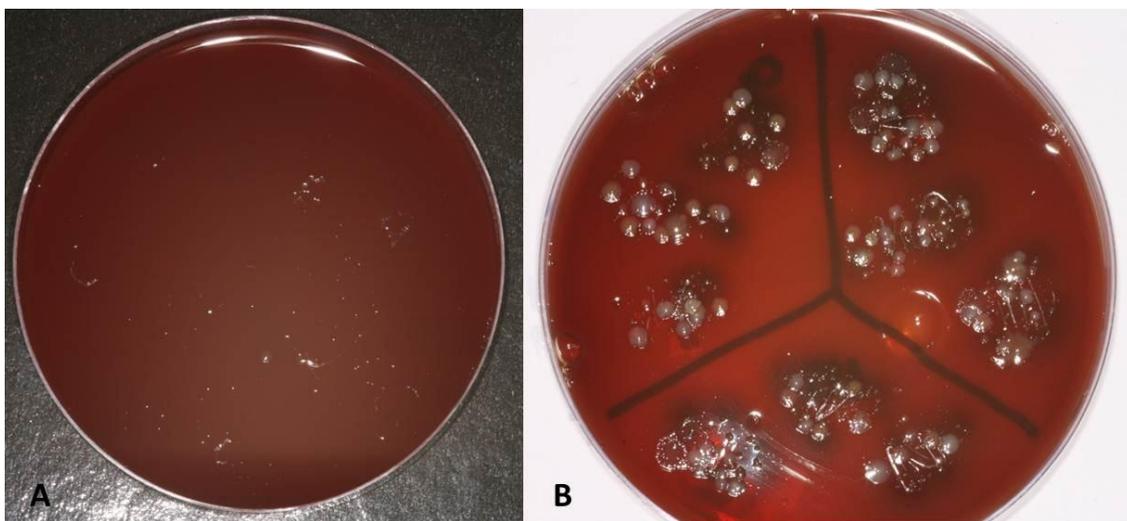


Figura 16 – Imagens representativas de culturas bacterianas dos grupos TFD (A) e Controle (B) aos 7 dias. Figura 16A representando diluições 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} . Figura 16B representando diluições 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} .

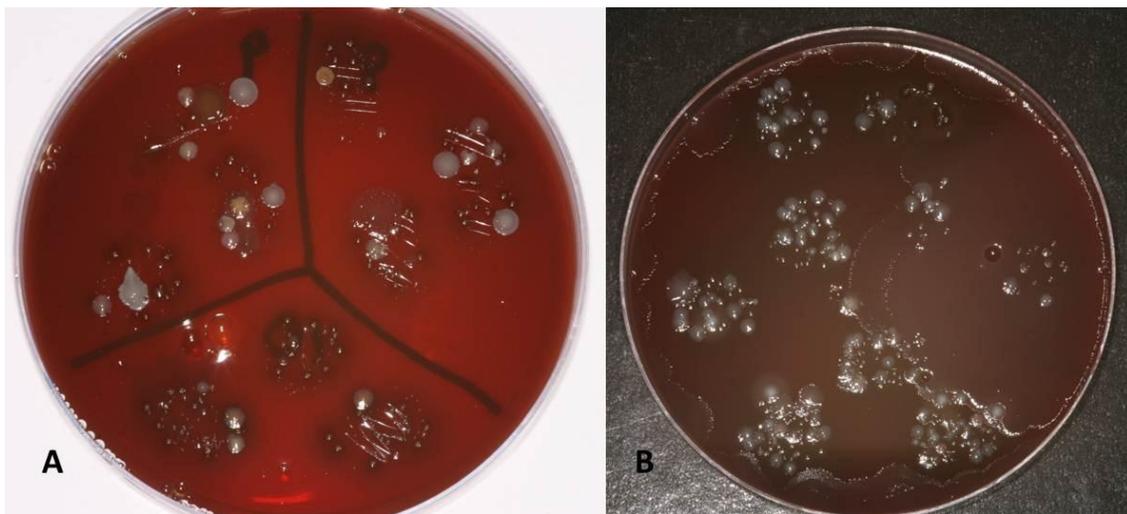


Figura 17 – Imagens representativas de culturas bacterianas dos grupos TFD (A) e Controle (B) aos 14 dias. Figura 17A representando diluições 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} . Figura 17B representando diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

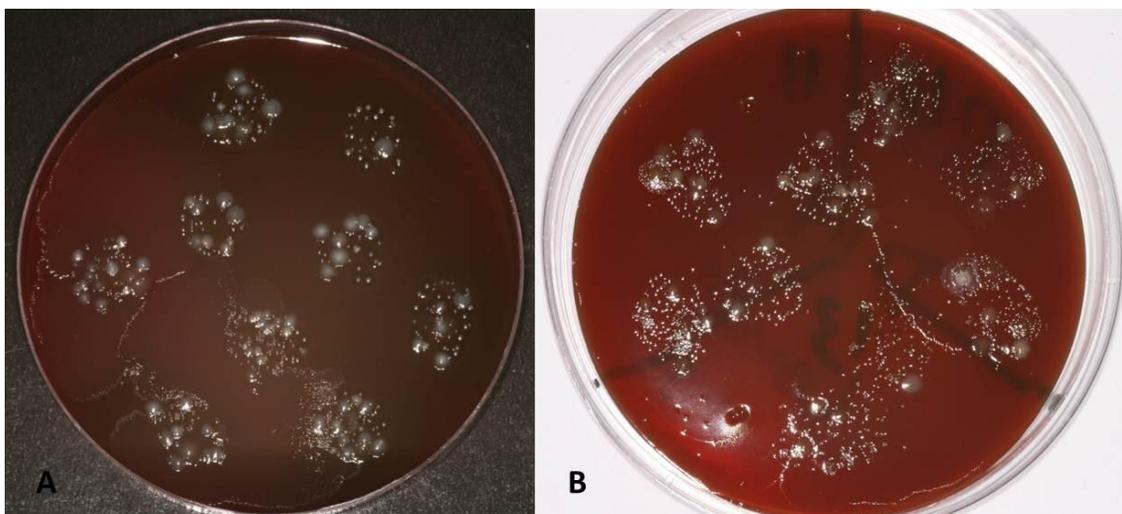


Figura 18 – Imagens representativas de culturas bacterianas dos grupos TFD (A) e Controle (B) aos 21 dias. Figura 18A representando diluições 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} . Figura 18B representando diluições 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} .

Tabela 3 - Distribuição das médias seguidas de desvio padrão da redução de colônias bacterianas devido à ação antimicrobiana da TFD usando curcumina 10%.

Grupos	Média de redução	Mín. redução	Máx. Redução	<i>p</i> (t-Student intra)	<i>p</i> (Kruskall-Wallis inter)
7 dias	26x±16x A	10x	55x	0,0003	Ns
14 dias	19x±22x A	0 (n=4)	59x	0,01	ns
21 dias	4x±21x B	0 (n=6)	37x	ns	0,02

Intragrupo: análise da redução entre grupo teste e controle pelo teste t-Student. Intergrupo: médias seguidas de letras maiúsculas distintas na vertical diferem pelo teste de Kruskal-Wallis com análise de comparações pelo método de Dunn. ns= não significativo.

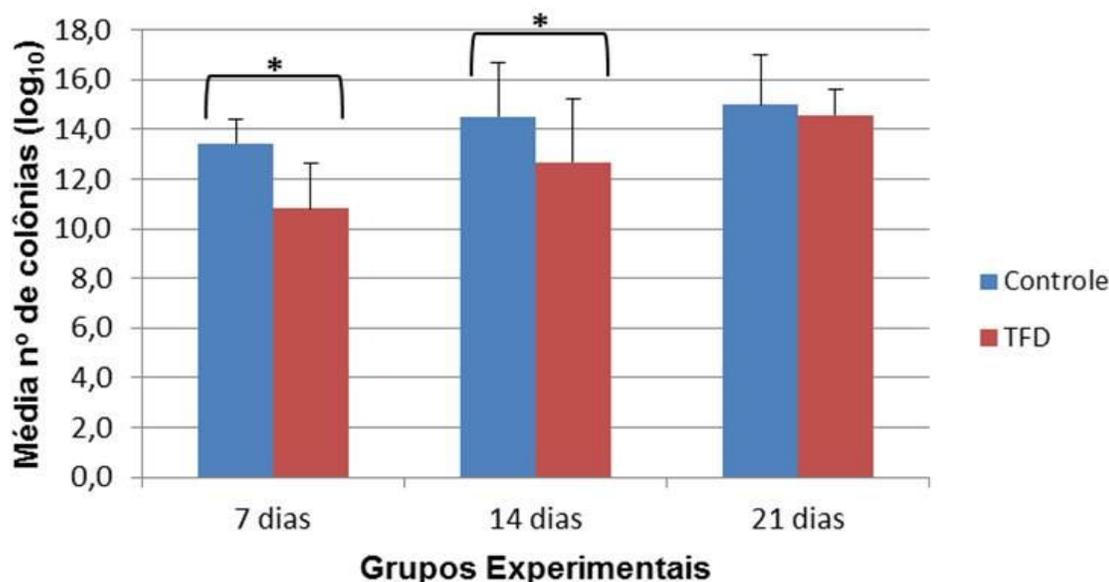


Figura 19 – Gráfico representativo da distribuição intergrupo de médias e desvio padrão de colônias bacterianas.*p<0,05.

Quando realizada avaliação intragrupo para observar a influência do tempo e da frequência de aplicação da TFD usando curcumina 10% no nível de infecção, representado pela redução do número de colônias bacterianas, notou-se que quanto aos aspectos microbiológicos, a TFD proporcionou resultados semelhantes quanto à redução da infecção entre 7 e 14 dias ($p > 0,05$). Porém, aos 21 dias, a TFD agiu de forma menos efetiva no controle de infecção quando comparada aos demais tempos, havendo menor redução do número de colônias bacterianas quando comparada ao 7º dia ($p = 0,02$) (Tabela 3, Figura 20).

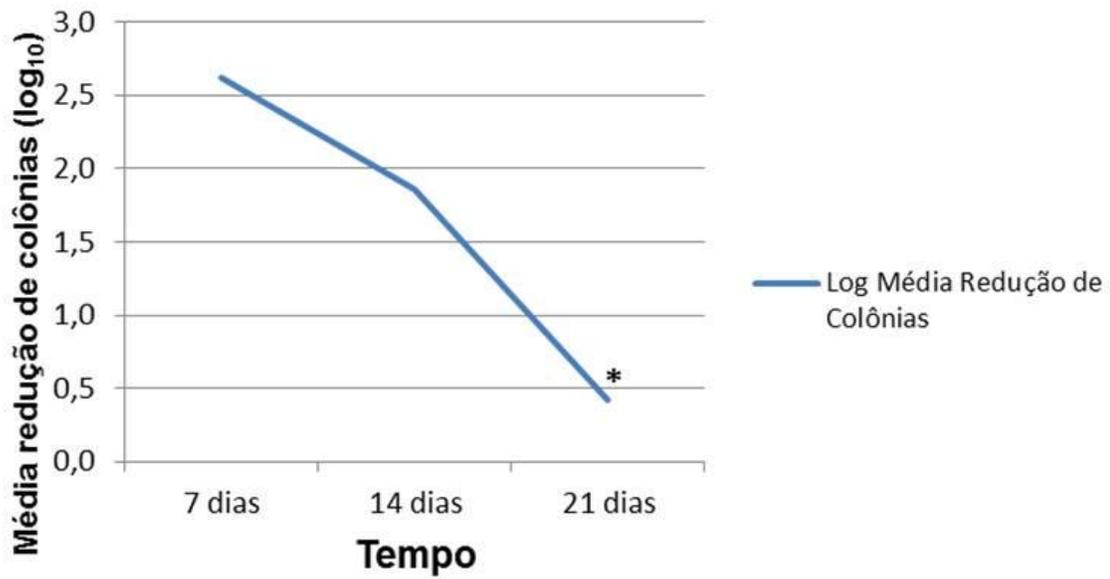


Figura 20 – Gráfico representativo da distribuição intragrupo de médias de redução de colônias bacterianas, mostrando a influência do tempo no controle da infecção. * $p < 0,05$ para redução do número de colônias bacterianas 21 dias x 7 dias.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, decidiu-se avaliar a efetividade de um sal curcuminóide contendo 10% de curcumina enquanto substância fotossensibilizadora, dentro da TFD, devido a sua capacidade de ser fotoativada na presença de comprimentos de onda baixos (Araújo *et al.*, 2005), possuir baixa toxicidade ao escuro (Dahl *et al.*, 1989; Meisel & Kocher, 2005) e ter ação antimicrobiana uma vez fotoativada (Dahl *et al.*, 1989; Martins *et al.*, 2009; Dovigo *et al.*, 2011).

Diferentemente de antibióticos que agem em células-alvo microbianas específicas, o mecanismo multifuncional da ação antimicrobiana da TFD ocorre a partir da síntese de tipos hiper-reativos de oxigênio, permitindo que sua ação possa causar danos a várias estruturas celulares e reduzindo, assim, a chance de desenvolvimento de resistência bacteriana. Porém, não existe atualmente em Periodontia um consenso que mostre o benefício da aplicação de um protocolo de TFD em detrimento do outro ou seu benefício real enquanto monoterapia ou terapia adjunta à RAR. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de um novo protocolo de TFD, usando-se curcumina 10% como fotossensibilizador, e suas implicações na evolução da periodontite experimental em ratos.

O presente estudo confirmou a efetividade do modelo de indução de periodontite por intermédio de ligaduras e a habilidade do operador em sua inserção, mostrando diferenças significativas ($p=0,0001$) quanto à reabsorção óssea do osso alveolar da região de furca de primeiros molares inferiores do grupo CN quando comparado aos grupos Controle e TFD.

Diferentemente de Almeida *et al.* (2008a) que mostraram a influência da TFD na evolução da reabsorção óssea alveolar da região de furca de primeiros molares com ligadura dentro do tempo experimental de 7, 15 e 30

dias, o presente estudo não observou diferenças significativas intragrupo da distribuição das médias de reabsorção óssea alveolar com relação ao tempo de 7, 14 e 21 dias ($p=0,3$), mostrando que a solução de curcumina 10% dentro do protocolo de TFD aqui aplicado não foi capaz de alterar o padrão de destruição óssea alveolar ao longo do tempo experimental aqui aplicado.

Os mesmos autores (de Almeida *et al.*, 2008a, de Almeida *et al.*, 2008b) observaram, também, menor reabsorção óssea no grupo tratado com o protocolo por eles aplicado de TFD em 7 e 15 dias tanto como monoterapia quanto como terapia coadjuvante. Isso mostra um benefício adicional da técnica por eles utilizada. Porém, os resultados intergrupo do presente estudo mostraram que o protocolo de TFD aqui utilizado com curcumina 10% e LED não trouxe benefícios adicionais quanto ao controle da reabsorção óssea alveolar quando comparado ao grupo Controle em qualquer um dos períodos experimentais (em 7 dias, $p=0.65$; 14 dias, $p=0.31$; 21 dias, $p=0.19$). Esse resultado poderia ser explicado, em parte, pela diferença de ação antimicrobiana dos fotossensibilizadores usados nos microrganismos e o efeito citotóxico nas células do hospedeiro. Dahl *et al.*(1989) e Dovigo *et al.* (2011) mostraram, respectivamente, que o processo de fotoativação da curcumina não produzia ou produzia baixas taxas de oxigênio singlete, respectivamente. Segundo esses autores, os produtos mais sintetizados na ação fotodinâmica da curcumina seriam ânions de superóxido e peróxido de hidrogênio. Isso, talvez alterasse o modo de interação desses radicais com os microrganismos Gram-negativos. Dessa forma, isso poderia alterar a ação antimicrobiana desse protocolo de TFD na redução da virulência do biofilme e, conseqüentemente, não exercer efeito na redução da reabsorção óssea alveolar frente a esse paradigma, e, portanto, não influenciou no desenvolvimento da periodontite.

Outra hipótese possível que pode ser levantada seria sobre o tempo de contato pré-irradiação da curcumina com o biofilme, ou seja, o tempo necessário de contato do fotossensibilizador com o biofilme para que haja

penetração suficiente da solução em sua matriz, mostrando ser de uma variável de grande importância para maximizar seu efeito antimicrobiano (Dovigo *et al.* 2011). No presente estudo, o tempo de contato da solução de curcumina 10% com o biofilme foi de um minuto prévio à irradiação, estando em concordância com o tempo padrão utilizado em outros protocolos de TFD (de Almeida *et al.*, 2008b; Fernandes *et al.*, 2009; Theodoro *et al.*, 2012; Cappuyens *et al.*, 2012). Porém, para essa concentração de curcumina, esse tempo de pré-irradiação de um minuto pode ter sido insuficiente para que a mesma penetrasse mais profundamente no biofilme e exercesse ação em microrganismos mais complexos, podendo assim alterar o desenvolvimento da periodontite. Porém, ainda são necessários estudos *in vivo* que avaliem o tempo de pré-irradiação necessário para que se obtenha ação inibitória mínima da curcumina no biofilme e que o protocolo seja viável para aplicação em Periodontia.

Os resultados da avaliação intragrupo deste estudo sugerem que o número de células TRAP-positivas foi significativamente influenciado pela frequência de aplicações no grupo TFD ($p < 0,05$), mostrando um menor número de osteoclastos aos 21 dias quando comparado aos 7 dias. Aos 14 dias vê-se uma redução numérica do número de osteoclastos quando comparado aos 7 dias, mas sem diferenças estatísticas significantes. Não foram detectadas diferenças significativas nos grupos Controle e CN, mostrando que o tempo não foi capaz de influenciar o aumento da reabsorção óssea nos dentes com ligaduras nos períodos de 7, 14 e 21 dias e nem alterar as dimensões do ligamento periodontal dos dentes que não receberam ligadura. A menor quantidade de osteoclastos notada aos 21 dias no grupo TFD poderia ser explicada por um possível efeito cumulativo do protocolo de TFD utilizando-se curcumina 10%, visto que aos 21 dias esse grupo completou a terceira aplicação. Comparações entre os resultados histométricos de reabsorção óssea aqui obtidos com o número de células TRAP-positivas não se fazem possíveis, pois os resultados obtidos com a histometria não traduzem o metabolismo celular. Porém, o protocolo de TFD utilizando curcumina 10% aqui adotado

poderia, por sua vez, estar biomodulando a resposta inflamatória frente à periodontite induzida, como mostrado ser possível por Jagetia & Aggarwal (2007), porém não houve verificação histométrica de sua efetividade quanto à reabsorção óssea alveolar.

Como mostrado por Carvalho *et al.* (2011), que avaliaram outro protocolo de TFD, a ação da ativação por uma fonte de luz do fotossensibilizador não é apenas sobre os microrganismos, mas também a sobre a imunomodulação da resposta inflamatória, constatada pelos autores na redução do número de neutrófilos e da expressão de TNF- α . Lima *et al.* (2004), por sua vez, verificaram a relação direta na produção de TNF- α e a reabsorção do osso alveolar de dentes de ratos com periodontite induzida. Talvez, a redução do número de osteoclastos aqui retratado tenha ocorrido pela redução da inflamação e da expressão de TNF- α . O aumento na frequência de aplicação desse protocolo de curcumina 10% na TFD talvez pudesse agir como imunomodulador do processo inflamatório e fosse capaz de reduzir o padrão de reabsorção óssea alveolar deste modelo de periodontite induzida em ratos, retardando, dessa forma, a evolução da periodontite.

A avaliação das unidades formadoras de colônia no presente estudo foi originada diretamente da dispersão do biofilme retido das ligaduras coletadas e reflete a sua complexidade em cada período de coleta. Os resultados deste estudo mostraram ação antimicrobiana efetiva significativa do protocolo de TFD usando curcumina 10% e LED sobre as amostras de biofilme, principalmente nos períodos iniciais de 7 e 14 dias ($p < 0,001$ e $p = 0,01$ respectivamente). Aos 21 dias, 40% dos ratos tratados tiveram redução no nível de infecção, porém sem haver diferença significativa entre os grupos TFD e Controle ($p > 0,05$).

O efeito antimicrobiano reduzido da TFD aos 21 dias poderia ser relacionado à maior dificuldade de penetração da curcumina no biofilme possivelmente pelo aumento de sua espessura relacionado ao seu

amadurecimento, necessitando, talvez, de um maior tempo contato do fotossensibilizador com o biofilme para que ocorresse melhor difusão do fotossensibilizador (Dovigo *et al.* 2011). Fontana *et al.* (2009) verificaram um maior efeito antimicrobiano da TFD sobre bactérias plantônicas quando comparadas ao efeito observado no em bactérias do biofilme e, possivelmente, o amadurecimento do biofilme observado aos 21 dias neste experimento pode ter permitido uma menor susceptibilidade à TFD devido ao desenvolvimento de fenótipos bacterianos protetores relacionados à resistência do mesmo (Davies *et al.*, 1998). A avaliação intragrupo revelou eficácia do protocolo de TFD utilizando-se curcumina 10%, mostrando reduções semelhantes quanto ao número de colônias bacterias observadas aos 7 e 14 dias ($p > 0,05$). Aos 21 dias, porém foi verificado uma redução da efetividade deste protocolo de TFD quanto à redução do número de colônias bacterianas, mostrando-se significativamente menos efetiva neste período ($p < 0,05$). Ribeiro *et al.* (2012) e Dahl *et al.* (1989) mostraram, respectivamente, que a ação antimicrobiana da curcumina fotoativada se dá de forma menos efetiva em cepas resistentes de bactérias e em bactérias Gram-negativas. O amadurecimento do biofilme observado aos 21 dias, e possivelmente o aumento do número de bactérias Gram-negativas e a seleção de fenótipos bacterianos protetores, pode ter se traduzido na redução da eficácia da TFD, constatando-se um aumento da contagem de colônias bacteriana nesse período.

Assim como neste estudo, diversos autores verificaram efeito antimicrobiano significativo na utilização de diversos protocolos de TFD como monoterapia ou terapia coadjuvante à RAR sobre várias espécies bacterianas (Sigusch *et al.*, 200; Novaes Jr *et al.*, 2011; Sgolastra *et al.*, 2011). Dentro das limitações de comparação deste estudo com os resultados de um estudo clínico, Theodoro *et al.* (2012) também notaram o efeito antimicrobiano de outro protocolo de TFD utilizado como coadjuvante da RAR sobre o biofilme de pacientes, porém sem constatar nenhuma melhora clínica adicional. De forma

semelhante, o presente estudo mostrou um efeito efetivo na redução de infecção, porém sem que fosse notada nenhuma melhora quanto à reabsorção óssea alveolar avaliada por histometria.

Por ser um novo protocolo de TFD proposto para utilização na periodontite, a utilização de uma solução de curcumina 10% como agente fotossensibilizador e um LED de 450nm de comprimento de onda como fonte de luz exige que diversos estudos metodológicos com finalidade de avaliar a concentração inibitória mínima da curcumina fotoativada sobre as bactérias do biofilme periodontal, o tempo de fotoativação necessário para máxima ação antimicrobiana da droga, assim como tempo necessário de pré-irradiação da droga sobre o biofilme para que haja sua máxima efetividade sejam desenvolvidos. Estudos para avaliar a importância da biomodulação causada pela curcumina nos tecidos periodontais e sua influência na evolução da periodontite, assim como estudos que utilizem esse protocolo como terapia coadjuvante também fazem-se necessários para que melhor se elucide seu efeito no controle de infecção e no controle da periodontite, permitindo, assim, ajustar o protocolo para futuras aplicações clínicas.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo pôde-se concluir que a curcumina, dentro do protocolo de TFD aqui avaliado:

1. Não foi capaz de alterar a reabsorção óssea alveolar da região de furca de 1^{os} molares de ratos com periodontite induzida por ligadura.
2. Reduziu o número de células TRAP-positivas em 1^{os} molares de ratos com periodontite induzida por ligadura.
3. Reduziu significativamente a quantidade de colônias bacterianas em 7, 14 dias, mas não em 21 dias, mostrando-se menos efetivo no controle de infecção em períodos mais longos de acúmulo de biofilme.

REFERÊNCIAS¹

Abdel Aziz MT, El-Asmar MF, El-Ibrashy IN, Rezaq AM, Al-Malki AL, Wassef MA, Fouad HH, Ahmed HH, Taha FM, Hassouna AA, Morsi HM. Effect of novel water soluble curcumin derivative on experimental type- 1 diabetes mellitus (short term study). *Diabetol Metab Syndr*. 2012 Jul 4; 4(1): 30.

Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol* 2000. 2004; 36: 121–45.

Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan; 41(1): 40-59.

Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan; 41(1): 40-59.

Ahn JC, Biswas R, Chung PS. Combination with genistein enhances the efficacy of photodynamic therapy against human anaplastic thyroid cancer cells. *Lasers Surg Med*. 2012 Nov 9. [Ahead of print].

Araújo NC, Fontana CR, Gerbi ME, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg*. 2012 Feb; 30(2): 96-101.

Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010 Jan; 81(1): 4-14.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Bassir SH, Moslemi N, Jamali R, Mashmouly S, Fekrazad R, Chiniforush N *et al.* Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2012 Sep 27. [Ahead of print].

Bhawana, Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *J Agric Food Chem.* 2011 Mar 9; 59(5): 2056-61.

Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009 Nov; 80(11): 1790-8.

Brugnera Jr A, Pinheiro ALB. *Lasers na odontologia moderna.* São Paulo: Pancast, 1998. 356p.

Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, Casarin RC, Cirano FR, Saraceni CH *et al.* The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012 Jul 20.

Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou C, Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode *laser*, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012 Sep; 27(5): 979-86.

Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou C, Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode *laser*, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012 Sep; 27(5): 979-86.

Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos J, Silva-Filho VJ, Thedei G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory

response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg.* 2011 Nov; 29(11): 735-40.

Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos J, Silva-Filho VJ, Thedei G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg.* 2011 Nov; 29(11): 735-40.

Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Oct;49(10):4288-95.

Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol.* 1994 Mar;59(3):295-302.

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 Sep; 24(5): 681-8.

Cobb, CM. Microbes, inflammation, scalling and root planning, and the periodontal condition. *J Dent Hyg.* 2008 Oct; 82 Suppl 3: 4-9.

Conselho Regional de Enfermagem. Boas práticas: cálculo seguro volume II. Cálculo e diluição de medicamentos. São Paulo: CORENSP, 2011.

Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol.* 1989;151(2):183-5.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997 Jun; 14: 12-32.

Darveau RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol.* 2009 Aug; 28(8): 389-95.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998 Apr 10; 280(5361): 295-8.

de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol*. 2008a Jun; 79(6): 1081-8.

de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008b Nov; 79(11): 2156-65.

De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A, Nair GB *et al*. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Apr; 53(4): 1592-7.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP *et al*. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011 Jul-Aug; 87(4): 895-903.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol*. 2002 Aug; 29(8): 724-35.

Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM *et al*. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*. 2009 Mar; 36(3): 219-28.

Fernández-Guarino M, Harto A, Sánchez-Ronco M, García-Morales I, Jaén P. Pulsed dye *laser* vs. photodynamic therapy in the treatment of refractory nail psoriasis: a comparative pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Aug; 23(8): 891-5.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC *et al.* The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009 Dec; 44(6): 751-9.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol.* 2001 Apr;28(4):283-95.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: Introduction. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 9-12.

Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab.* 2006;52(9-10):499-509.

Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol.* 2002 Jan; 75(1): 51-7.

Hamblin MR, Zahra T, Contag CH, McManus AT, Hasan T. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J Infect Dis.* 2003 Jun 1; 187(11): 1717-25.

Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: studies on curcumin and curcuminoides XLII. *J Pharm Sci.* 2011 Jan; 100(1): 174-85.

Hong JS, Jung JY, Yoon JY, Suh DH. Acne treatment by methyl aminolevulinate photodynamic therapy with red light vs. intense pulsed light. *Int J Dermatol.* 2012 Oct 9. [Ahead of print].

Hsi RA, Rosenthal DI, Glatstein E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs.* 1999 May; 57(5): 725-34.

Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an *in vitro* study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med*. 2012 Aug; 44(6): 490-9.

Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol*. 2007 Jan; 27(1): 19-35.

Kaminaga Y, Nagatsu A, Akiyama T, Sugimoto N, Yamazaki T, Maitani T, Mizukami H. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett*. 2003 Dec 4; 555(2): 311-6.

Kato T, Kusakari H, Hoshino E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide *laser* against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. *Lasers Surg Med*. 1998; 23(5): 299-309.

Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002 Mar; 66(2): 89-106.

Lee YK, Lee WS, Hwang JT, Kwon DY, Surh YJ, Park OJ. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK α -PPAR- γ in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK α -COX-2 in cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2009 Jan 14; 57(1): 305-10.

Lima V, Vidal FD, Rocha FA, Brito GA, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol*. 2004 Jan; 75(1): 162-8.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965 May-Jun;36:177-87.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. Study design and baseline data. *J Periodontal Res.* 1978 Nov;13(6):550-62.

Lulic M, Leiggener Görög 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 Aug; 36(8): 661-6.

Malik Z, Ladan H, Nitzan Y, Ehrenberg B. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B.* 1990 Aug; 6(4): 419-30.

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8:263–271; Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000.* 2011 Feb; 55(1): 36-47.

Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV *et al.* Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Feb; 63(2): 337-9.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005 May 13; 79(2): 159-70.

Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991 Apr; 53(4): 549-53.

Moan J, Peng Q. An outline of the history of PDT. In: Patrice T, editor. *Photodynamic therapy.* Cambridge: United Kingdom; 2003a. p. 3-13.

Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003b Sep-Oct; 23 (5A): 3591-600.

Mongardini C, Di Tanna GL, Pilloni A. Light-activated disinfection using a light-emitting diode lamp in the red spectrum: clinical and microbiological short-term findings on periodontitis patients in maintenance. A randomized controlled split-mouth clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2012 Nov 9. [Ahead of print].

Nanashima A, Abo T, Nonaka T, Nonaka Y, Morisaki T, Uehara R, *et al*. Photodynamic therapy using talaporfin sodium (*laserphyrin(r)*) for bile duct carcinoma: a preliminary clinical trial. *Anticancer Res*. 2012 Nov; 32(11): 4931-8.

Novaes AB Jr, Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci*. 2012 Mar; 27(2): 389-95.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:9-11.

Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res*. 2009 Dec; 88(12): 1065-76.

Pizzo P, Scapin C, Vitadello M, Florean C, Gorza L. Grp94 acts as a mediator of curcumin-induced antioxidant defence in myogenic cells. *J Cell Mol Med*. 2010 Apr; 14(4): 970-81.

Profio AE, Doiron DR. Transport of light in tissue in photodynamic therapy, *Photochem Photobiol*. 1987 Nov; 46(5): 591-9.

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.

Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE *et al*. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2012 Feb 23. [Ahead of print].

Salah M, Samy N, Fadel M. Methylene blue mediated photodynamic therapy for resistant plaque psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2009 Jan; 8(1): 42-9.

Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2011 Oct 16. [Ahead of print].

Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc*. 1990 Oct;121(4):532-6.

Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010 Jul; 81(7): 975-81.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb; 25(2): 134-44.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011 Feb; 55(1): 143-66.

Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol*. 1972 Oct; 24(4): 638-44.

Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY *et al*. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol 2000*. 2009; 51: 109-40.

Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP *et al*. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci*. 2012 Jul; 27(4): 687-93.

Tønnesen HH, de Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological

activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci.* 1987. May;76(5):371-3.

Tønnesen HH, Mátsson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm.* 2002 Sep 5; 244(1-2): 127-35.

Tschen EH, Wong DS, Pariser DM, Dunlap FE, Houlihan A, Ferdon MB; Phase IV ALA-PDT Actinic Keratosis Study Group. Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. *Br J Dermatol.* 2006 Dec; 155(6): 1262-9.

Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000.* 2004; 36: 98–120.

Walsh LJ. The current status of low level *laser* therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J.* 1997 Oct; 42(5): 302-6.

Wang HW, Lv T, Zhang LL, Guo MX, Stepp H, Yang K *et al.* Prospective study of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of moderate to severe acne vulgaris in Chinese patients. *J Cutan Med Surg.* 2012 Sep-Oct; 16(5): 324-33.

Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power *laser* light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995; 78(5): 569-74.

Anexo 1: Protocolo de Aprovação do CEUA/UNICAMP



UNICAMP



CEUA/Unicamp

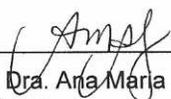
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

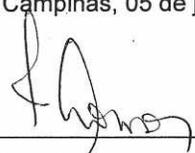
Certificamos que o projeto "Avaliação periodontal do efeito da terapia fotodinâmica em animais" (protocolo nº 2727-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum / Mirella Lindoso Gomes Campos, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 05 de junho de 2012.

Campinas, 05 de junho de 2012.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva