

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE
AZUL DE METILENO NA TERAPIA FOTODINÂMICA
EM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcela Mozzaquatro Pasini

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE AZUL
DE METILENO NA TERAPIA FOTODINÂMICA EM DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**

por

Marcela Mozzaquatro Pasini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia, Ênfase em Patologia Bucal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Cademartori Danesi

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE AZUL DE
METILENO NA TERAPIA FOTODINÂMICA EM DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**

elaborada por
Marcela Mozzaquatro Pasini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristiane Cademartori Danesi, Prof^a. Dr^a. Adj.
(Presidente/Orientadora - UFSM)

Fabício Batistin Zanatta, Prof. Dr. Adj. (UFSM)

Márcia Rodrigues Payeras, Prof^a. Dr^a. (PUC-RS)

Santa Maria, 29 de Agosto de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Alfeu e Marta, por serem os meus maiores incentivadores na busca pela felicidade e realização profissional.

"Suba o primeiro degrau com fé. Você não tem que ver toda a escada. Você só precisa dar o primeiro passo."

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado sabedoria, força e coragem para seguir essa caminhada e chegar até aqui, iluminando e guiando meus passos.

Aos meus pais Alfeu e Marta, pelo amor incondicional, carinho, confiança e incentivo em todos os momentos da minha vida, simplesmente me aceitando e apoiando do jeito que sou. Vocês sempre estiveram presentes, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui e torceram por mim. Agradeço a Deus por ter a criação que vocês me proporcionaram. Sem vocês, eu jamais teria conseguido!

Aos meus irmãos Sarah e Thomaz, simplesmente por fazerem parte da minha vida, nas horas boas e ruins, dividindo alegrias e tristezas. Obrigada por todos os conselhos e amizade, mesmo muitas vezes distantes um do outro, vocês tem um cantinho especial no meu coração e sei que posso contar com vocês sempre!

À professora Cristiane Danesi, pela dedicação, disponibilidade e confiança depositada em mim ao longo desses dois anos. És um exemplo o qual me espelho, me fez entender a grandeza dessa escolha acadêmica e abriu caminhos para que meus sonhos possam ser realizados. Obrigada por todos os ensinamentos e crescimento no decorrer desta trajetória.

Às minhas amigas Fernanda Pillusky e Luisa Barin, por toda amizade sincera e parceria no decorrer dessa caminhada. Vocês foram um presente que o Mestrado me deu e quero levar essa amizade comigo para onde eu for. Com certeza esses anos se tornaram muito mais fáceis e agradáveis na companhia de vocês.

Às minhas amigas Alessandra Grellmann, Cibele Campagnolo, Emília Prochnow e Mariteli Martins, parceiras de muitas risadas, alegrias e por terem me acolhido na periodontia. Nossa amizade se fortificou ainda mais, vocês me ajudaram em todos os momentos desse trabalho, tanto na parte pessoal quanto profissional. Obrigada por terem cruzado meu caminho, quero leva-las comigo sempre.

À minha vó Thereza, por estar presente em todos os momentos, desde que eu era bem pequenininha. A senhora é minha segunda mãe e tem um papel fundamental na minha vida. Obrigada pela criação, bondade e amor!

À professora Karla Kantorski, pelas contribuições e ajuda durante a elaboração do projeto e realização da parte experimental.

Ao técnico de laboratório Sérgio Silveira, por ter me ensinado técnicas tão importantes e essenciais para confecção e coloração das lâminas.

Ao médico veterinário Roberto Maciel, por ter me ensinado as técnicas o manejo com os animais.

À Chaiana Piovesan, pela ajuda com a parte estatística deste trabalho.

Aos amigos Helena Goetz e Gustavo Paraginski, servidores da UFSM, que me receberam de braços abertos nos momentos de descanso e de intervalo, prontos para uma conversa e um bom chimarrão.

À todos os alunos de graduação, que de uma maneira ou outra se envolveram nesta pesquisa, seja com a parte mais “suja” do trabalho, seja com o apoio na execução do experimento, sempre dispostos em ajudar.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante este trabalho.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO NA TERAPIA FOTODINÂMICA EM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS

AUTORA: MARCELA MOZZAQUATRO PASINI

ORIENTADORA: CRISTIANE CADEMARTORI DANESI

Data e Local da Dissertação: Santa Maria, 29 de Agosto de 2014.

Este estudo objetivou avaliar histologicamente o efeito de diferentes formulações de Azul de Metileno (AM), na Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), como adjuvante ao tratamento periodontal convencional, sobre as fibras colágenas do tecido gengival no tratamento da doença periodontal induzida em ratos. Neste estudo, foram utilizados 120 ratos machos (*Rattus Novergicus*, linhagem *Wistar*). A periodontite foi induzida pela colocação de ligaduras no molar inferior direito em 105 ratos. Decorridos 7 dias, as ligaduras foram removidas e os animais foram randomizados em 5 grupos: CN - controle negativo; CP - controle positivo (sem tratamento); RAR - raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação da bolsa periodontal com solução salina; TFDa - RAR + TFDa (com AM a 0,01% dissolvido em água + laser); e TFDa/etanol - RAR + TFDa (com AM a 0,01% dissolvido em solventes contendo etanol a 20% + laser). Os animais do CN não foram submetidos à indução de doença ou tratamento. Cinco animais de CN e CP e dez animais de RAR, TFDa e TFDa/etanol foram eutanasiados em 7, 15 e 30 dias após os tratamentos. Amostras de tecido gengival foram coletadas para quantificação das fibras colágenas e análise descritiva da proporção e organização dos tipos I e III de colágeno. Dados foram analisados com ANOVA e análise multinível de Regressão de Poisson. Os animais de CN, CP, RAR, TFDa e TFDa/etanol mostraram percentual de área das fibras colágenas de 67,99%, 45,71%, 58,39%, 71,70% e 72,37%, respectivamente, porém nenhuma diferença estatística foi observada entre TFDa e TFDa/etanol; a área das fibras colágenas foi maior aos 30 dias (71,37%) do que aos 7 dias (60,25%) e aos 15 dias (63,12%) após o tratamento, apresentando diferença estatística somente aos 30 dias (ANOVA). Considerando a análise multivariada da Regressão de Poisson, TFDa e TFDa/etanol apresentaram uma taxa 6% maior de organização das fibras colágenas quando comparados ao CN ($p < 0,05$); tal organização aumentou 5% aos 15 dias após o tratamento e 19% aos 30 dias, quando comparados aos 7 dias ($p < 0,05$). A ação das diferentes formulações do AM foi semelhante no que diz respeito à quantidade e organização das fibras colágenas do tecido gengival, apresentando maior quantidade de colágeno tipo I, com alinhamento paralelo e denso aos 30 dias após o tratamento. De acordo com o modelo experimental utilizado neste estudo, a presença do etanol na formulação do AM não interfere na quantidade e na qualidade das fibras colágenas frente ao processo de cicatrização periodontal. Este estudo sugere que a TFDa pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da doença periodontal como adjuvante ao tratamento convencional.

Palavras-chave: periodontite; colágeno; cicatrização tecidual; laser de baixa potência; agentes fotossensibilizadores; fenotiazinas.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Post Graduate Program in Dental Science
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF DIFFERENT FORMULATIONS OF METHYLENE BLUE IN PHOTODYNAMIC THERAPY IN PERIODONTAL DISEASE INDUCED IN RATS

AUTHOR: MARCELA MOZZAQUATRO PASINI

SUPERVISOR: CRISTIANE CADEMARTORI DANESI

Date and Local of Defense: Santa Maria, August 29, 2014.

This study aimed to evaluate the histological effect of different formulations of Methylene Blue (MB) used in antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) as adjuvant to conventional treatment, on gingival collagen fibers in the treatment of periodontal disease induced in rats. In this study were used 120 male rats (*Rattus Novergicus*, *Wistar* lineage). The periodontitis was induced by placing a ligature on right mandibular first molar in 105 rats. After 7 days, they were removed and the animals were randomized in 5 groups: NC – negative control; PC – positive control (no treatment); SRP - scaling and root planning (SRP) and periodontal pocket irrigation with saline solution; aPDT – SRP + aPDT (with MB 0,01% dissolved in water + laser); aPDT/ethanol – SRP + aPDT (with MB 0,01% dissolved in solvents containing ethanol 20% + laser). The NC animals received neither periodontitis induction nor treatment. Five animals of NC and PC and ten animals of SRP, aPDT and aPDT/ethanol are euthanized 7, 15 and 30 days after treatment. Gingival samples were collected to the quantification of collagen fibers and descriptive analysis of collagen type I and III proportion and organization. Data were analyzed with ANOVA and multilevel Poisson regression analysis. The animals of NC, PC, SRP, aPDT and aPDT/ethanol showed percentage of collagen fibers area of 67,99%, 45,71%, 58,39%, 71,70% and 72,37%, respectively, but no statistical difference was seen in aPDT and aPDT/ethanol; the collagen fibers area was higher at 30 days (71,37%) than at 7 days (60,25%) and at 15 days (63,12%) after treatment, showing statistical difference only at 30 days (ANOVA). Considering multivariate Poisson regression analysis, aPDT and aPDT/ethanol showed 6% higher rate of collagen fibers organization when compared to NC ($p < 0,05$); this organization increased 5% at 15 days after treatment and 19% at 30 days when compared to 7 days ($p < 0,05$). The action of different formulations of MB was similar concerning the quantity and organization of gingival collagen fibers, presenting higher collagen type I quantity, parallel and dense alignment at 30 days after treatment. According to the experimental model used in this study, the ethanol presence in MB formulation doesn't interfere on collagen fibers quantity and quality of collagen fibers in periodontal wound healing. This study suggests the aPDT could be a promising alternative to periodontal disease treatment as adjuvant to conventional treatment.

Key Words: periodontitis; collagen; wound healing; low level laser therapy; photosensitizing agents; phenothiazines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Mecanismo de ação da TFDa (adaptado de Soukos & Goodson, 2011).....19

ARTIGO

FIGURA 1 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos controles, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) CN aos 7 dias; (B) CN aos 15 dias; (C) CN aos 30 dias; (D) CP aos 7 dias; (E) CP aos 15 dias; (F) CP aos 30 dias. (TM, magnificação original: x400).....43

FIGURA 2 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos de tratamento, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) RAR aos 7 dias; (B) RAR aos 15 dias; (C) RAR aos 30 dias; (D) TFDa aos 7 dias; (E) TFDa aos 15 dias; (F) TFDa aos 30 dias; (G) TFDa/etanol aos 7 dias; (H) TFDa/etanol aos 15 dias; (I) TFDa/etanol aos 30 dias. (TM, magnificação original: x400).....44

FIGURA 3 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos controles, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) CN aos 7 dias; (B) CN aos 15 dias; (C) CN aos 30 dias; (D) CP aos 7 dias; (E) CP aos 15 dias; (F) CP aos 30 dias. (PSR, magnificação original: x200).....45

FIGURA 4 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos de tratamento, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) RAR aos 7 dias; (B) RAR aos 15 dias; (C) RAR aos 30 dias; (D) TFDa aos 7 dias; (E) TFDa aos 15 dias; (F) TFDa aos 30 dias; (G) TFDa/etanol aos 7 dias; (H) TFDa/etanol aos 15 dias; (I) TFDa/etanol aos 30 dias. (PSR, magnificação original: x200).....46

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Características descritivas da amostra, baseadas na contagem de lâminas obtidas de cada animal em cada grupo e período de eutanásia, perfazendo um total de 325 lâminas..... | 47 |
| TABELA 2 – Percentual médio da organização das fibras colágenas segundo os grupos e períodos de eutanásia..... | 48 |
| TABELA 3 – Análise univariada. Comportamento da organização das fibras colágenas nos diferentes grupos e nos diferentes períodos da eutanásia..... | 49 |
| TABELA 4 – Modelo Final. Análise multivariada. Comportamento da organização das fibras colágenas nos diferentes grupos e nos diferentes períodos da eutanásia..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP – Doença Periodontal

RAR – Raspagem e Alisamento Radicular

TFDa – Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

Fs – Fotossensibilizador

Laser – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

AM – Azul de Metileno

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

ad libitum – À vontade

InGaAIP – Índio, Gálio, Alumínio e Fósforo

n^{os} – números

TM – Tricrômico de Masson

PSR – Picrosirius Red

CCI – Coeficiente de Correlação Intra Classe

ANOVA – Análise da Variância

IC – Intervalo de Confiança

RR – *rate ratio* (razão de taxas)

LISTA DE SÍMBOLOS

α – Alfa
% – Percentual
mm - milímetros
 μs – milissegundos
g – grama
mg/Kg – miligrama por kilo
mL – Mililitro
 λ – Comprimento de onda
 cm^2 – Centímetros quadrado
nm – Nanômetro
mW – Miliwatts
J/ponto – Joules por ponto
J – Joule
 J/cm^2 – Joule por centímetro quadrado
pH – potencial Hidrogeniônico
h – horas
 μm – micrômetros
x – vezes

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo A – Normas de publicação segundo o periódico <i>Lasers in Surgery and Medicine</i> | 60 |
| Anexo B – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)..... | 66 |
| Anexo C – Técnica do processamento histológico dos tecidos..... | 67 |
| Anexo D – Técnica histológica da Coloração Tricrômico de Masson..... | 68 |
| Anexo E – Técnica histológica da Coloração Picrosirius Red..... | 69 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 2. OBJETIVOS..... | 22 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 22 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 22 |
| 3. ARTIGO..... | 23 |
| Resumo..... | 24 |
| Introdução..... | 25 |
| Materiais e Métodos..... | 27 |
| Resultados..... | 32 |
| Discussão..... | 34 |
| Referências..... | 39 |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 51 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 53 |
| 6. ANEXOS..... | 60 |
| 6.1. Anexo A – Normas de publicação segundo o periódico <i>Lasers in Surgery and Medicine</i> | 60 |
| 6.2. Anexo B – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)..... | 66 |
| 6.3. Anexo C – Técnica do processamento histológico dos tecidos..... | 67 |
| 6.4. Anexo D – Técnica histológica da Coloração Tricrômico de Masson..... | 68 |
| 6.5. Anexo E – Técnica histológica da Coloração Picrosirius Red..... | 69 |

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A doença periodontal (DP) é a infecção oral mais comum do ser humano e representa um importante problema de saúde pública, com alta prevalência pelo mundo (PETERSEN & OGAWA, 2012). Afeta crianças e adultos em diferentes manifestações clínicas e estágios e tem sua severidade aumentada e modificada por fatores comportamentais e sistêmicos, como idade, fumo, diabetes, doenças cardiovasculares, entre outros (KASSEBAUM et al, 2014). É uma doença que, se não tratada, evolui para a perda dentária em adultos, podendo afetar a autoestima, as relações interpessoais e a qualidade de vida dos pacientes (REYNOLDS, 2014).

A DP é definida como uma alteração inflamatória crônica progressiva que acomete os tecidos de sustentação periodontal, como resultado de uma complexa interação entre o biofilme bacteriano e a resposta de defesa do hospedeiro, promovendo uma destruição do aparato de sustentação dentária (CHANG & LIM, 2012; ANDERSEN et al, 2007). Os tecidos periodontais incluem gengiva, osso alveolar, ligamento periodontal e cimento (EBERHARD et al, 2008).

De todos os tecidos periodontais, a gengiva recebe importante atenção clínica não somente devido ao seu papel na sustentação dentária, mas também à importante barreira protetora contra as agressões produzidas por microrganismos patogênicos, substâncias químicas e traumas ao qual a cavidade bucal está sujeita (MARIOTTI, 1993). Histologicamente, a gengiva é composta pelas estruturas epiteliais (epitélio juncional e epitélio sulcular) e o tecido conjuntivo adjacente, ambos responsáveis por orquestrar os eventos iniciais associados ao advento da DP (BARTOLD, WALSH, NARAYANAN, 2000). A matriz extracelular do tecido conjuntivo gengival funciona como um arcabouço físico para a ocorrência de importantes eventos celulares inerentes aos processos biológicos e sua manutenção tem sido importante para garantir o desenvolvimento e as funções normais do tecido (YUCCEL-LINBERG & BAGE; 2013). O colágeno constitui, quantitativamente, o principal componente do tecido conjuntivo e, dentre suas funções, destacam-se: providenciar força tensora, permitir a distensibilidade do tecido, limitar o movimento de outros componentes teciduais e induzir a agregação plaquetária para a formação do coágulo (MINOR, 1980; TABA JR et al, 2005).

O colágeno é uma macromolécula de glicoproteína, com alto grau de polimorfismo, que representa cerca de 30% de todas as proteínas do corpo humano. Estruturalmente, sua molécula é composta por três cadeias α polipeptídicas de aminoácidos, idênticas ou não, entrelaçadas umas com as outras em uma configuração helicoidal (UITTO & LARJAVA, 1991; ZAGRIS, 2000). À medida que as moléculas de colágeno se agrupam, sua composição passa a receber denominações diferentes, em ordem crescente: colágeno, procolágeno, tropocolágeno, microfibrilas, fibrilas e, por último, fibras colágenas. (GARTNER & HIATT, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

As fibras colágenas podem se apresentar em uma grande variedade de formas e tamanhos; padrão, este, que muda conforme seu comprimento, espessura, orientação, estrutura e posição das cadeias helicoidais. Baseados nessas características, na sua localização e na função do tecido, as fibras colágenas foram divididas e classificadas em diferentes tipos, recebendo sua denominação em algarismos romanos (OTTANI, RASPANTI, RUGGERI, 2001). Atualmente, a família de colágenos é composta por mais de 20 tipos conhecidos e distintos geneticamente, porém nem todos estão bem caracterizados ainda. A maioria dos tecidos do corpo humano, incluindo os tecidos periodontais, é composta basicamente de fibras colágenas tipo I e III (KESLER et al, 2000; EYDEN & TZAPHLIDOU, 2001).

O colágeno tipo I é o mais abundante e o mais amplamente distribuído, sendo o principal tipo. É formado por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$. Confere resistência tensora ao tecido e apresenta elasticidade limitada (KESLER et al, 2000). Sua estrutura é fibrilar, com fibras espessas e densas, normalmente mais curtas, altamente birrefringentes à luz polarizada, organizadas em paralelo umas com as outras (MONTES & JUNQUEIRA, 1991). É encontrado basicamente em todos os tecidos conjuntivos, principalmente na pele, ossos, tendões, parede dos vasos sanguíneos. No tecido gengival, corresponde de 90 a 95% entre os diferentes tipos. (BARTOLD, WALSH, NARAYANAN, 2000; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O colágeno tipo III é também denominado de fibrilas de reticulina e tende sempre a estar associado com o tipo I. Ao contrário do colágeno tipo I, ele tem pouca resistência à tensão, porém confere resistência para integridade e distensibilidade do arcabouço estrutural (USHIKI, 2002). É formado por três cadeias α idênticas. Também apresenta estrutura fibrilar, porém com fibras mais finas e

alongadas, com fraca birrefringência à luz polarizada, exibindo um padrão reticular e espalhado de maneira difusa pelo tecido (JUNQUEIRA, MONTES, SANCHEZ, 1982). Encontrado ao redor de nervos e vasos sanguíneos, músculo liso, trato gastrointestinal. No tecido gengival, este tipo corresponde de 5 a 10%, sendo o segundo principal tipo (SCHROEDER & LISTGARTEN, 1997; BARTOLD, WALSH, NARAYANAN, 2000).

Uma grande variedade de células reside no tecido gengival saudável e tão logo que o biofilme bacteriano se acumula nas suas adjacências, importantes eventos celulares iniciam as alterações teciduais que caracterizam o processo inflamatório. A patogênese da DP ocorre, inicialmente, por uma interação entre os produtos bacterianos, liberados pelas bactérias patogênicas presente no ambiente supra e subgengival, e as células do epitélio juncional longo. Essas células epiteliais produzem e liberam mediadores químicos pró-inflamatórios responsáveis por aumentar a permeabilidade vascular e ativar leucócitos polimorfonucleares, majoritariamente os neutrófilos, que migram para o sulco gengival e formam a primeira barreira de defesa contra os patógenos periodontais. Concomitantemente, há um extravasamento de leucócitos mononucleares para o tecido conjuntivo perivascular, principalmente os macrófagos, formando a segunda linha de defesa contra os patógenos periodontais. Os macrófagos, quando ativados, são responsáveis pela fagocitose dos restos bacterianos e teciduais; pela produção de mais mediadores pró-inflamatórios que auxiliarão no recrutamento de linfócitos e plasmócitos adicionais para o local; e pela produção de collagenases, enzimas degradantes de colágeno. Além disso, fibroblastos, queratinócitos, linfócitos e células endoteliais também respondem aos estímulos inflamatórios e induzem a produção dessas enzimas que, quando ativadas, têm um papel chave na exacerbação da resposta inflamatória e na degradação da matriz colagenosa do tecido conjuntivo (KORNMAN, PAGE, TONETTI, 1997; GRZESIK & NARAYANAN, 2002; TANAKIS & KUMAR, 2005; NANJI & BOSSHARDT, 2006; BARTOLD & MCCULLOCH, 2013).

A clivagem inicial do colágeno do tecido gengival é uma peça chave das lesões periodontais progressivas e ativas. Dentro de 3 a 4 dias após o acúmulo de bactérias patogênicas na margem e no sulco gengival, o processo inflamatório se torna suficientemente intenso para iniciar a destruição da matriz colagenosa do tecido conjuntivo (REYNOLDS & MEIKLE, 1997; BARTOLD & NARAYANAN, 2006).

A liberação de mediadores pró-inflamatórios é responsável por ativar e aumentar a atividade proteolítica de enzimas latentes, as collagenases, frente ao rápido avanço da inflamação. Um descompasso entre a ativação e inibição dessas enzimas acarreta uma destruição anormal dos componentes da matriz extracelular (VAN DER ZEE, EYERTS, BEERTSEN, 1997; LIMA et al, 2008).

O aumento da solubilidade da molécula de colágeno gera modificações quantitativas e qualitativas na matriz colagenosa do tecido periodontal. Durante os estágios iniciais na evolução da doença, a quantidade de colágeno é severamente diminuída e a degradação das fibras pode chegar a uma taxa de 70% (BARTOLD & NARAYANAN, 2006). Há acelerada perda da identidade e organização das fibras colágenas, com potencial diminuição da integridade e estabilidade estrutural do tecido gengival (HAVEMOSE-PULSEN et al, 1998). A não resolução da inflamação gera uma tentativa frustrada de reparo, em que o alterado remodelamento do colágeno modifica a proporção entre colágeno tipo I e tipo III, diminuindo a quantidade do tipo I e aumentando do tipo III. O resultado deste reparo patológico é a fibrose tecidual e a formação de cicatriz no foco da inflamação (NARANAYAN, PAGE, MEYERS, 1980; PAGE, NARAYANAN, SCHROEDER, 1980).

Embora as reações imuno-inflamatórias no tecido periodontal apresentem características semelhantes às observadas em outras partes do corpo, há diferenças significativas. Isto ocorre, em parte, porque os processos imuno-inflamatórios periodontais se desenvolvem em decorrência de um grande número de periodontopatógenos e seus subprodutos, que agem por um período prolongado de tempo (FENG & WEINBERG, 2006). O ambiente subgengival pode conter mais de 400 espécies bacterianas morfológicamente distintas, principalmente anaeróbicas gram-negativas, com diferentes potenciais de patogenicidade, os quais variam de sítio para sítio e de indivíduo para indivíduo (DZINK et al, 1985; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992; ETO, RASLAN, CORTELLI, 2003). Assim, a DP tem sido referida como uma infecção mista, assinalando que mais de uma espécie bacteriana está presente na instalação e progressão da doença.

O biofilme bacteriano desempenha um papel crucial na patogenia da DP e, em virtude disso, o emprego de uma estratégia antimicrobiana tem sido o método universalmente aceito capaz de impedir o avanço da doença. O tratamento convencional da DP é a raspagem e alisamento radicular (RAR), caracterizada pela remoção mecânica do biofilme em contato com as superfícies dentárias, cujo

objetivo primário é desorganizá-lo para restaurar a homeostasia tecidual (COBB, 1996). Com o controle da infecção bacteriana, as superfícies dentárias tornam-se biocompatíveis; há a liberação de moléculas que ativam caminhos diferentes daqueles ativados na inflamação, estimulando a proliferação celular e a formação do tecido de granulação (BARTOLD & VAN DYKE, 2013). O colágeno neoformado maduro, as fibras colágenas se reorganizam em paralelo e voltam a adquirir o aspecto denso e alinhado, ocorrendo a cicatrização tecidual (ANUSAKSATHIEN & GIANNOBILE, 2002; DRISKO, 2014).

A imensa quantidade e variedade de bactérias patogênicas aliadas a peculiaridades anatômicas dentárias podem comprometer a efetividade do tratamento convencional, impedindo a adequada descontaminação das superfícies radiculares. Por isso, diversos métodos alternativos têm sido propostos para contornar essa situação e, atualmente, o uso de antibióticos associados à RAR tem mostrado benefícios adicionais na redução de espécies bacterianas (BARTOLD & VAN DYKE, 2013). Além do efeito antibacteriano, alguns antibióticos têm potencial anti-inflamatório e imunomodulatório, causando a inibição de colagenases, de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão leucocitárias. (MATSUMURA et al, 2011; HIRSCH & LAOHACHAI, 2012).

Contudo, a rápida emergência da resistência bacteriana frente ao uso indiscriminado e prolongado de antibióticos tem se tornado um problema atual crescente (CASSELL & MEKALANOS, 2001). Tal fato é decorrente do grande volume de prescrições, muitas vezes inadequadas, e da falta de adesão dos pacientes em seguir integralmente o regime de tratamento. As bactérias que sofrem mutação na presença de antibióticos para favorecer sua sobrevivência podem tornar-se predominantes na população microbiana (GENCO, 1981; HEITZMAYFIELD, 2009; ARDILA, GRANADA, GUZMÁN, 2010).

O inevitável crescimento da resistência bacteriana tem gerado uma busca por alternativas terapêuticas antibacterianas na tentativa de impedir o desenvolvimento de patógenos multirresistentes. Tendo em vista esse contexto, a TFDa como terapia associada à RAR tem ganhado força na odontologia moderna, como uma alternativa para o uso de antibióticos, por não ser invasiva, ter um amplo espectro de ação, pouco potencial de desenvolver resistência bacteriana e não possuir dose-limite (DAI, HUANG, HAMBLIN, 2009; DE OLIVEIRA et al 2011; PRATES et al, 2011; BERAKDAR et al, 2012; GURSOY et al, 2013).

O mecanismo de ação da TFDa é baseado na tríade fotossensibilizador (Fs), luz visível e oxigênio. É uma reação fotoquímica oxigênio-dependente, em que um corante (o Fs) é ativado por uma luz visível ressonante ao agente Fs (laser de baixa potência), com comprimento de onda (λ) adequado, podendo perder energia por fluorescência ou calor e retornando ao seu estado fundamental, ou absorvendo-a e passando do seu estado fundamental para o estado tripleto excitado. Neste estado, o corante reage com biomoléculas e gera espécies reativas de oxigênio, produtos extremamente tóxicos e letais às células microbianas, causando dano ao DNA ou à membrana celular. A reação de foto-oxidação pode ocorrer de duas maneiras: tipo I, em que os ânions são removidos do Fs e transferidos para o oxigênio e outras moléculas, produzindo superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila; e tipo II, em que há transferência de energia para o oxigênio, tornando-o eletronicamente excitado e altamente reativo, produzindo principalmente oxigênio singleto (figura 1). Com a aplicação da luz, ambas as reações ocorrerão, porém a quantidade de cada uma dependerá basicamente da concentração do Fs e do oxigênio (HAMBLIN & HASAN, 2004; KONOPKA & GOSLINSKI, 2007; MAISCH, 2007; RAGHAVENDRA KOREGOL, BHOLA, 2009; MALIK, MANOCHA, SURESH, 2010).



Figura 1 – Mecanismo de ação da TFDa (adaptado de Soukos & Goodson, 2011).

Estudos recentes *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado o efeito benéfico da TFDa nos tecidos periodontais, tanto na redução de espécies bacterianas quanto a favor da resolução do processo inflamatório (BRAHAM et al, 2009; FERNANDES et al, 2009; CARVALHO et al, 2011). Estes estudos apontam que a TFDa pode inativar proteases bacterianas, consideradas fatores de virulências que atrasam o processo de reparo, e inibir certos mediadores pró-inflamatórios ligados aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ela é responsável também por aumentar e acelerar a formação do tecido de granulação, a síntese e deposição de colágeno e melhorar o comportamento e organização das fibras colágenas no tecido (JAYASREE et al, 2001; DE ALMEIDA et al, 2007;; DE OLIVEIRA et al, 2011).

Atualmente, existe uma grande variedade de corantes com propriedades fotossensibilizantes que vem sendo utilizados na TFDa, dentre eles, os compostos fenotiazínicos como o Azul de Toluidina O e o Azul de Metileno (AM) (WAINWRIGHT & CROSSLEY, 2004; KONOPKA & GOSLINSKI, 2007). O AM tem sido de escolha por muitos autores por apresentar alto potencial de formação de radicais livres, alta solubilidade em água, mínima coloração da mucosa, longa história de segurança no seu uso e baixíssima toxicidade. Devido ao seu baixo peso molecular, é capaz de penetrar rapidamente no biofilme dental e causar a morte das bactérias patogênicas (ANDERSEN, LOEBEL, HAMMOND, 2007; SILVA et al, 2012).

Em estudos realizados até o presente momento, a TFDa no tratamento das doenças periodontais tem utilizado Fs diluídos em água. Nessa diluição, o oxigênio singlete, principal agente químico produzido, possui baixo poder de difusão tecidual (<0,02mm) e meia-vida de curta duração (4 μ s) (DOUGHERTY, 1998; MEISEL & KOCHER, 2005). O uso do Fs dissolvido em solventes contendo etanol tem sido relatado na literatura, mostrando que há maior poder de penetração tecidual e aumento na meia-vida do oxigênio singlete (20 μ s) (GEORGE & KISHEN, 2007; GEORGE & KISHEN, 2008). Embora haja uma melhora nas propriedades físicas e químicas desse Fs, há carência na literatura de estudos em animais e/ou humanos com essa formulação e, por isso, seus efeitos teciduais sobre as fibras colágenas não estão claramente elucidados.

A hipótese conceitual deste estudo considera que a utilização do etanol potencialize a produção de oxigênio singlete, resultando em melhor efeito antimicrobiano e tecidual. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito de diferentes formulações de Azul de Metileno, utilizada na TFDa como adjuvante ao

tratamento periodontal convencional, através da análise das fibras colágenas gengivais no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito das diferentes formulações do AM, utilizada na TFDa como tratamento adjuvante ao tratamento periodontal convencional, na doença periodontal experimental induzida em ratos, através da avaliação das fibras colágenas do tecido conjuntivo gengival.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a área ocupada pelas fibras colágenas frente às diferentes formulações do AM em 7, 15 e 30 dias após o tratamento, por meio de avaliação histoquímica com Tricrômico de Masson (TM).
- Descrever a organização das fibras colágenas, analisando características como o predomínio do tipo de colágeno, alinhamento e agrupamento das fibras colágenas frente às diferentes formulações do AM em 7, 15 e 30 dias após o tratamento, por meio de avaliação histoquímica com Picrosirius Red (PSR).

3 ARTIGO

Influência de diferentes formulações de Azul de Metileno na Terapia Fotodinâmica através da avaliação das fibras colágenas da doença periodontal experimental em ratos

Marcela Mozzaquatro Pasini¹, Roberto Marinho Maciel², Karla Zanini Kantorski³,
Cristiane Cademartori Danesi⁴

¹Aluna de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

²Aluno de Pós-Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

³Professora adjunta, disciplina de Periodontia, Departamento de Estomatologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

⁴Professora adjunta, disciplina de Patologia bucal, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Autor correspondente:

Cristiane Cademartori Danesi

Av. Roraima, 1000, prédio 20 / Departamento de Patologia / Santa Maria, RS, Brasil.

CEP: 97105-900 / Fone: 55 3220 95 59

Email: cristianedanesi@gmail.com

O artigo foi formatado segundo as normas do periódico *Lasers in Surgery and Medicine* (Julho/14) (ANEXO A).

Resumo

Contextualização e objetivo: Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem sido como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento das periodontites. Ela envolve a utilização de um fotossensibilizador (Fs) e uma fonte de luz. Entretanto, a utilização de diferentes formulações do fotossensibilizador sobre a cicatrização tecidual tem sido pouco estudada. Este estudo objetivou avaliar histologicamente o efeito de diferentes formulações de Azul de Metileno (AM), na Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), como adjuvante ao tratamento periodontal convencional, sobre as fibras colágenas do tecido gengival no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

Metodologia: Neste estudo, foram utilizados 120 ratos machos (*Rattus Novergicus*, linhagem *Wistar*). A periodontite foi induzida pela colocação de ligaduras no molar inferior direito em 105 ratos. Decorridos 7 dias, as ligaduras foram removidas e os animais foram randomizados em 5 grupos: CN - controle negativo; CP - controle positivo (sem tratamento); RAR - raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação da bolsa periodontal com solução salina; TFDa - RAR + TFDa (com AM a 0,01% dissolvido em água + laser); e TFDa/etanol - RAR + TFDa (com AM a 0,01% dissolvido em solventes contendo etanol a 20% + laser). Os animais do CN não foram submetidos à indução de doença ou tratamento. Cinco animais de CN e CP e dez animais de RAR, TFDa e TFDa/etanol foram eutanasiados em 7, 15 e 30 dias após os tratamentos. Amostras de tecido gengival foram coletadas para quantificação das fibras colágenas e análise descritiva da proporção e organização dos tipos I e III de colágeno. Dados foram analisados com ANOVA e análise multinível de Regressão de Poisson.

Resultados: Os animais de CN, CP, RAR, TFDa e TFDa/etanol mostraram percentual de área das fibras colágenas de 67,99%, 45,71%, 58,39%, 71,70% e 72,37%, respectivamente, porém nenhuma diferença estatística foi observada entre TFDa e TFDa/etanol; a área das fibras colágenas foi maior aos 30 dias (71,37%) do que aos 7 dias (60,25%) e aos 15 dias (63,12%) após o tratamento, apresentando diferença estatística somente aos 30 dias (ANOVA). Considerando a análise multivariada da Regressão de Poisson, TFDa e TFDa/etanol apresentaram uma taxa 6% maior de organização das fibras colágenas quando comparados ao CN ($p < 0,05$); tal organização aumentou 5% aos 15 dias após o tratamento e 19% aos 30 dias, quando comparados aos 7 dias ($p < 0,05$). A ação das diferentes formulações do AM foi semelhante no que diz respeito à quantidade e organização das fibras colágenas do tecido gengival, apresentando maior quantidade de colágeno tipo I, alinhadas e densas aos 30 dias após o tratamento.

Conclusão: De acordo com o modelo experimental utilizado neste estudo, a presença do etanol na formulação do AM não interfere na quantidade e na qualidade das fibras colágenas frente ao processo de cicatrização periodontal. Este estudo sugere que a TFDa pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da doença periodontal como adjuvante ao tratamento convencional.

Palavras-chave: agentes fotossensibilizadores, cicatrização tecidual, colágeno, fenotiazinas, laser de baixa potência, periodontite

Introdução

A doença periodontal (DP) é a infecção oral mais comum do ser humano e tem sido a principal causa de perda dentária em adultos (1). É uma inflamação induzida por uma interação entre o biofilme bacteriano e a resposta do hospedeiro que acomete os tecidos de sustentação periodontal, resultando em uma resposta imuno-inflamatória capaz de provocar alterações deletérias neste tecido (2, 3). Dentro de 3 a 4 dias após o acúmulo de bactérias patogênicas na margem e no sulco gengival, o processo inflamatório se torna suficientemente intenso para iniciar a destruição da matriz colagenosa do tecido conjuntivo. O aumento da solubilidade da molécula de colágeno gera modificações quantitativas e qualitativas na matriz colagenosa do tecido periodontal, refletindo em uma destruição de até 70% e alteração na proporção entre colágeno tipo I e tipo III (4-6).

A terapia periodontal convencional consiste na remoção mecânica, por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR) do biofilme dental e de depósitos mineralizados aderidos às superfícies dentárias (7). Em algumas situações clínicas, como diferentes tipos de periodontites, doenças sistêmicas associadas e características anatômicas dos dentes podem comprometer o sucesso do tratamento convencional. Nestes casos, terapias adjuvantes ao tratamento mecânico podem ser empregadas, com antibioticoterapia. Todavia, a rápida emergência da resistência bacteriana frente ao uso prolongado de antibióticos tem se tornado um problema atual inevitável e crescente (8-10). Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem sido proposta por ser não invasiva, ter amplo espectro de ação, baixo risco de desenvolver resistência bacteriana, e não possuir dose-limite (11-13, 22, 23).

O mecanismo de ação da TFDa consiste em utilizar um corante fotossensibilizador (Fs) e ativá-lo por uma luz visível (laser de baixa potência), com comprimento de onda adequado, a fim de excitar suas moléculas (14, 15, 21). O Fs passa do seu estado fundamental para o estado tripleto, reage com biomoléculas e gera espécies reativas de oxigênio, que são produtos tóxicos às células microbianas, causando danos à membrana celular ou ao DNA (16, 17). A reação de foto-oxidação pode ocorrer de duas maneiras: tipo I, em que há transferência de elétrons para o substrato, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de

hidrogênio e radicais hidroxila; e tipo II, em que há transferência de energia para o oxigênio molecular, produzindo oxigênio singleto que é altamente citotóxico (18, 19).

Atualmente, existe uma grande variedade de corantes com propriedades fotossensibilizantes que vem sendo utilizados na TFDa e AM tem sido de escolha por muitos autores (9, 15). Em estudos realizados até o presente momento, a TFDa no tratamento das doenças periodontais tem utilizado Fs diluídos em água. Nessa diluição, o oxigênio singleto, principal agente químico produzido, possui baixo poder de difusão tecidual (<0,02mm) e meia-vida de curta duração (4 μ s). O uso do Fs dissolvido em solventes contendo etanol tem sido relatado na literatura, mostrando que há maior poder de penetração tecidual e aumento na meia-vida do oxigênio singleto (20 μ s) (20, 53). Embora haja uma melhora nas propriedades físicas e químicas desse Fs, há carência na literatura de estudos em animais e/ou humanos utilizando etanol na formulação do Fs e, por isso, o significado das alterações nas fibras colágenas não está completamente esclarecido.

A hipótese conceitual deste estudo considera que a utilização do etanol potencialize a produção de oxigênio singleto, resultando em melhor efeito antimicrobiano e tecidual. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito de diferentes formulações de Azul de Metileno (AM), utilizada na TFDa como adjuvante ao tratamento mecânico da periodontite induzida em ratos, através da análise das fibras colágenas gengivais.

Materiais e Métodos

1 Delineamento do estudo

Este estudo foi controlado, cego e randomizado em modelos experimentais animais.

2 Modelo Animal

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil, sob protocolo 027/2013 (ANEXO B).

A amostra foi constituída de 120 ratos machos da espécie *Rattus Novergicus*, da linhagem *Wistar*, com peso inicial médio de 150 a 200g, e 2 meses de idade, provenientes do biotério central da UFSM . Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (49x34x16cm), em estantes ventiladas (ambiente climatizado, com temperatura próxima a 23°C e umidade relativa do ar próxima a 30%, com controle de ruídos, de luminosidade e exaustão de ar), com água e ração *ad libitum*. Antes do início dos procedimentos, os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias.

3 Cálculo Amostral

Utilizando o *software* PS Power and Sample Size Calculations (v. 3.0.43), o tamanho da amostra foi calculado considerando uma diferença de 12% na média de degradação de fibras colágenas entre os grupos, desvio padrão de 8%, erro Tipo I (erro α) e Tipo II (erro β) de 5% e 20%, respectivamente (34). Deste modo, foi estimada a necessidade de, no mínimo, 8 animais por grupo em cada período experimental. Computando possíveis perdas, foi estimado 10 animais por grupo.

4 Protocolo Experimental

4.1 Grupos Experimentais

Inicialmente, os animais foram divididos em 5 grupos experimentais descritos a seguir: CN – ausência de doença periodontal e ausência tratamento (controle negativo) (n=15); CP – presença da doença periodontal e ausência de tratamento

(controle positivo) (n=15); RAR – RAR e irrigação da bolsa periodontal com solução salina (n=30); TFDa – RAR + TFDa, utilizando como Fs o AM dissolvido em água com concentração de 0,01% (n=30); TFDa/etanol - RAR + TFDa, utilizando como Fs o AM dissolvido em uma mistura de água, carboximetilcelulose e etanol na proporção de 77:3:20, com concentração de 0,01% (n=30). Os animais foram randomizados nos grupos de tratamento supracitados por uma sequência gerada em um programa de computador (Random Allocation Software, version 1.0, May 2004) e ocultada por intermédio de envelopes pardos. A randomização foi realizada por um pesquisador externo (DAMD).

4.2 Indução da Doença Periodontal

Inicialmente, os animais receberam analgesia com injeção intramuscular de Tramadol (20mg/Kg) (Tramadol solução injetável, ampola de 2mL, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil). Após 15 minutos, anestesia geral foi administrada via intramuscular com a combinação de Cetamina a 10% (70mg/Kg) (Cetamin, Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina a 2% (6mg/Kg) (Xilazin, Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) (FMP e LMB). A doença periodontal foi induzida com a colocação de uma ligadura com fio de sutura estéril (Ethicon 4-0, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) na região cervical subgingival do primeiro molar inferior direito e o nó posicionado para a mesial, e mantida por um período de 7 dias (11, 32). A ligadura foi colocada por dois pesquisadores previamente treinados (MMP e MRM).

4.3 Tratamentos

4.3.1 *Tratamento com RAR*

Previamente aos tratamentos, todos os animais receberam analgesia e anestesia. Após 7 dias da remoção da ligadura, o tratamento periodontal foi realizado por meio de RAR, utilizando curetas Gracey Mini-Five 1-2 (Hu-Friedy, Chigaco, IL, EUA), em dez movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. A furca e a área interproximal foram instrumentadas por meio de movimentos de tração cérvico-oclusal (13). Esse procedimento foi realizado por um único operador cegado para os grupos experimentais (DAMD).

4.3.2 *Tratamento com TFDa*

Para realização da TFDa, o fotossensibilizador AM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi dissolvido em solução aquosa (água bidestilada a 0,01%) e em uma mistura de solventes orgânicos (água, carboximetilcelulose e etanol na proporção de 77:3:20) (20, 53), sendo lentamente aplicados com seringa (1 mL) e agulha de insulina (BD Ultrafine™, U-100, 0,5ml, 8mmX0.3mm) na bolsa periodontal. Após 1 minuto, foi utilizado um laser de baixa potência InGaAlP (TheraLase® – DMC Equipments, 0.0283 cm², São Carlos, SP, Brasil), $\lambda=660\text{nm}$, modo de emissão contínua, potência útil do emissor de 30mW, em três pontos equidistantes nas faces vestibular e lingual por 4 segundos (0.14J/ponto), onde cada ponto de aplicação recebeu uma energia de 0.84J e uma dose de 4.94 J/cm² (13, 32). Esse procedimento foi realizado por um único operador cegado para o tipo de fotossensibilizador utilizado (DAMD).

4.4 Períodos de Eutanásia e Obtenção das Amostras

Os animais foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após os tratamentos. Cinco animais de CN e CP e dez animais de RAR, TFDa e TFDa/etanol foram eutanasiados em cada um destes períodos, pelo aprofundamento anestésico com Isoflurano (Isothane, Baxter Healthcare of Puerto Rico, Guayama, Porto Rico, USA). Após, amostras de tecido gengival (aproximadamente 5mmx3mm) foram removidas da face vestibular do molar que recebeu ligadura, sob condições de iluminação e assepsia adequadas, com o auxílio de pinça clínica e lâminas de bisturi n^{os} 11 e 15 (MMP). Após a ressecção cirúrgica, foram fixadas em formol tamponado (pH 7,2) a 10% por um período de 24h.

5 Procedimentos Laboratoriais

Posteriormente, as amostras foram desidratadas, diafanizadas, clarificadas e parafinizadas no Processador de Tecidos (PT-05, Lupetec[®] tecnologia aplicada, Lupe Indústria Tecnológica de Equipamentos para Laboratório Ltda., São Carlos, SP, Brasil) e incluídas em parafina (ANEXO C). Todo o processamento e inclusão das amostras foram realizados no laboratório do Departamento de Bioquímica da UFSM. De cada espécime foram obtidos 6 cortes histológicos seriados e padronizados de 5 μm de espessura no sentido vestibulo-lingual.

6 Análises Histológicas

Dos 6 cortes histológicos obtidos de cada espécime, 3 foram corados com Tricrômico de Masson (TM) e 3 foram corados com Picrosirius Red (PSR). Todas as análises foram realizadas por um único examinador calibrado e cegado para os grupos experimentais (MMP). Para calibragem, dez campos microscópicos foram avaliados para o percentual (%) da área de fibras colágenas, medidos em dois dias diferentes pelo mesmo examinador, com um intervalo de 15 dias, a fim de reduzir a variação dos dados. No software (*FIJI para ImageJ[®], versão 1.47i*, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), foi calibrado um valor superior e inferior para a área correspondente às fibras colágenas, e esses valores foram padronizados para todas os campos microscópicos. A concordância e reprodutibilidade intra-examinador foi avaliada através do Coeficiente de Correlação Intra Classe (CCI = 0,99).

6.1 Coloração com TM

Essa coloração histoquímica confere cor azul às fibras colágenas do tecido conjuntivo e foi utilizada para quantificar a área ocupada pelas fibras. As lâminas foram confeccionadas conforme protocolo específico do fabricante do produto (Masson Trichrome with aniline blue, Easy Path[®], Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (ANEXO D). As imagens foram capturadas por câmera digital acoplada a microscópio de luz (Axiovision, Carl Zeiss MicroImagnig, Jena, Alemanha) e transferidas a um computador, no formato JPEG e com uma resolução de 2560x1920 pixels. Utilizando um sistema analisador de imagens (*FIJI para ImageJ[®], versão 1.47i*, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), foi feita a quantificação do percentual (%) de área ocupada por fibras colágenas, sob aumento de 400x, em 5 campos aleatórios subjacentes ao epitélio de cada lâmina, da esquerda para a direita, totalizando 15 campos. A área de colágeno de cada lâmina foi dada pela média das 5 determinações, e a área correspondente a cada animal foi dada pela média da área das 3 lâminas.

6.2 Coloração com PSR

Essa coloração permite uma análise das fibras colágenas através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados, diferenciando principalmente as fibras tipo I (colágeno maduro) e tipo III (colágeno

imaturu). As fibras colágenas tipo I se apresentam como fibras grossas, nas cores vermelho/laranja, enquanto que as fibras colágenas tipo III se apresentam em feixes finos, nas cores amarelo/verde, de acordo com sua birrefringência. A técnica de utilização foi feita conforme protocolo específico do fabricante do produto (Picrosirius Red Staining, Easy Path[®], Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (ANEXO E). A análise descritiva de cada lâmina foi realizada sob microscopia de campo escuro, utilizando polarização óptica em microscópio (Axiovision, Carl Zeiss MicroImagnig, Jena, Alemanha), sob aumento de 200x, em uma varredura completa de toda área subjacente ao epitélio. Características morfológicas quanto ao predomínio da cor, alinhamento e agrupamento foram avaliadas.

7 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada no programa Stata 12.0 (Stata Corp LP, College Station, USA). Análise descritiva dos dados foi realizada considerando o número total de lâminas por grupo experimental e o período da eutanásia. One-way ANOVA e post hoc *Tukey* foram utilizados para avaliar as diferenças entre as médias do percentual de área de fibras colágenas segundo o grupo experimental e o período de eutanásia. Os dados foram expressos em média e desvio-padrão.

Análise multinível de Regressão de Poisson foi realizada para verificar o comportamento da organização das fibras colágenas nos diferentes grupos e períodos de eutanásias, considerando cada animal individualmente. Inicialmente, foram realizadas as análises univariadas, calculados os valores de *rate ratio* (Razão de médias) com os respectivos intervalos de confiança a 95% (95% IC), e os valores de P calculados pelo teste de Wald. Após, análise multivariada para entrada no modelo final foi realizada. Todos os testes utilizaram um nível de significância de 5%.

Resultados

Análise quantitativa das fibras colágenas coradas com TM:

As figuras 1 e 2 demonstram as características das fibras colágenas do tecido gengival coradas por TM, entre os diferentes grupos experimentais e períodos de eutanásia.

A tabela 1 sumariza as características da amostra, considerando o número de lâminas, agrupadas de acordo com o grupo as quais pertenciam e ao período de eutanásia. Neste estudo, obteve-se um total de 325 lâminas, dos quais 12,31% pertenciam ao CN, 13,23% ao CP, 24,62% a RAR, 24% a TFDa e 25,85% a TFDa/etanol. Para os períodos de eutanásia, 34,15% foram obtidas dos animais aos 7 dias, 34,77% aos 15 dias e 31,08% aos 30 dias.

Na tabela 2, estão apresentados os percentuais médios, com seus respectivos desvios-padrão, dos grupos experimentais e dos períodos de eutanásias, mediante a análise estatística *one-way* ANOVA. Considerando cada lâmina individualmente, diferenças estatisticamente significativas puderam ser observadas no percentual de área de fibras colágenas entre os grupos, a exceção de TFDa e TFDa/etanol (71,70% e 72,37%, respectivamente) que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados entre si. Com relação aos períodos de eutanásias, diferenças estatisticamente significativas foram observadas no percentual de área de fibras colágenas somente aos 30 dias após o tratamento (71,37%), entretanto, aos 7 e 15 dias, o percentual de área de fibras colágenas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A análise univariada foi utilizada para verificar separadamente a organização das fibras colágenas em cada grupo e cada período de eutanásia (tabela 3). Verificou-se que os grupos TFDa e TFDa/etanol apresentaram taxas de organização das fibras colágenas 5% e 6% (IC 1,01 – 1,11) maior que CN ($p < 0,05$), respectivamente. A taxa de organização das fibras colágenas aumentou de 4% nos animais sacrificados aos 15 dias após os tratamentos para 18% nos animais sacrificados aos 30 dias, quando comparados aos animais sacrificados aos 7 dias ($p < 0,05$).

Quando as variáveis foram analisadas pelo modelo multivariado, resultados semelhantes foram observados (tabela 4). Nessa análise, a organização das fibras

colágenas foi computada para o grupo ao qual o animal pertencia, bem como o período em que foi sacrificado. Os animais de TFDa e TFDa/etanol apresentaram taxas maiores de organização das fibras colágenas ($p < 0,05$), tanto aos 15 dias quanto aos 30 dias após o tratamento, quando comparados aos animais de CN sacrificados aos 7 dias. Em ambos, a taxa de organização das fibras colágenas foi maior aos 30 dias do que aos 15 dias.

Análise descritiva das fibras colágenas coradas com PSR:

Os animais do CN apresentaram fibras predominantemente vermelhas, organizadas em paralelo umas com as outras, com aspecto denso e alinhado por toda a extensão tecidual, tanto aos 7 quanto aos 15 e aos 30 dias (figura 3A, B e C).

Aos 7 dias após a remoção da ligadura, os animais do CP mostraram fibras em tons mesclados de vermelho e verde, com rearranjo bastante prejudicado, com aparência entrelaçada (enovelada) e em filamentos finos. A organização das fibras colágenas foi recuperada lentamente, e aos 15 e 30 dias as fibras apresentaram leve paralelismo e agrupamento entre si, e variados graus de densidade foram observados por todo o tecido gengival (figura 3D, E, F).

Aos 7 dias após o tratamento, os animais do RAR apresentaram proporções iguais de fibras laranja avermelhadas e esverdeadas, ora alinhadas ora entrelaçadas, com aspecto denso/fino 7 dias após o tratamento. Este mesmo padrão foi observado aos 15 dias após o tratamento. Porém aos 30 dias, as fibras predominantes foram laranja avermelhadas, ainda com aparência alinhada/entrelaçada e poucas áreas com aspecto denso (figura 4A, B e C).

Os animais de ambas TFDa e TFDa/etanol apresentaram fibras colágenas muito semelhantes aos animais do CN, e pouca desorganização foi observada entre os três períodos de eutanásia. Aos 7 e 15 dias após os tratamentos, houve predomínio das fibras laranja avermelhadas, com poucas áreas organizadas ora em alinhadas e ora entrelaçadas, e com rearranjo denso. Aos 30 dias, a organização tecidual foi recuperada e as fibras apresentaram-se intensamente vermelhas, densas, e retornaram ao seu estado alinhado (figura 4D, E, F, G, H e I).

Discussão

No presente estudo, o efeito de diferentes formulações de AM, utilizadas na TFDa como adjuvante à RAR, sobre as fibras colágenas gengivais no tratamento da doença periodontal induzida em ratos foi investigado. O uso de modelos experimentais animais nas pesquisas odontológicas tem sido frequente nos últimos anos e nos permitem estudar mecanismos e novas abordagens terapêuticas para as doenças humanas. Destes, o rato é o mais utilizado para o estudo da doença periodontal, pois apresentam anatomia periodontal na região de molares bastante semelhante à de humanos. Embora estes animais sejam naturalmente resistentes à periodontite, ela pode ser facilmente induzida com a utilização de ligaduras posicionadas ao redor do molar, visando o acúmulo de placa nesta região (25, 55).

O tecido gengival saudável é composto principalmente por fibras colágenas tipo I, organizadas e alinhadas em paralelo umas com as outras, formando longos feixes densos, associadas a uma menor quantidade de fibras colágenas tipo III. Em um processo normal de reparo tecidual, os fibroblastos são estimulados a proliferar e produzir colágeno com o intuito de restaurar a integridade estrutural e funcional dos tecidos. A hiperliberação de mediadores pró-inflamatórios característico da doença periodontal acarreta alta destruição das fibras colágenas gengivais e baixa reestruturação tecidual decorrente de uma tentativa frustrada de reparo (26, 27).

No processo de reparo tecidual, a compreensão do comportamento das fibras colágenas faz-se essencial. Dentre as colorações histológicas específicas para identificação das fibras colágenas do tecido conjuntivo, optamos por utilizar o TM e o PSR. Ambos possuem corantes aniônicos que reagem com grupos básicos das moléculas de colágeno. O TM permite uma clara diferenciação entre as fibras colágenas e os demais componentes dos tecidos, como células, queratina, fibras elásticas e musculares; adicionalmente, o PSR permite visualização detalhada das características intrínsecas das fibras colágenas, como proporção entre os tipos I e III de colágeno, alinhamento e densidade, e mudanças na sua estrutura e orientação podem ser melhor analisadas com essa coloração (28-30). Controversamente, alguns estudos têm optado por utilizar somente uma delas: o TM para descrever as características das fibras colágenas e o PSR para quantificá-las (11, 13, 31-37). Neste estudo foi utilizada a associação dessas duas colorações, porém TM para

quantificação das fibras colágenas e PSR para descrição das suas características morfológicas.

Neste estudo, houve uma diminuição no percentual de área de fibras colágenas do tecido gengival nos animais com doença periodontal e sem tratamento aos 7 dias. Embora este tenha sido realizado em ratos, a doença periodontal foi induzida com sucesso e resultados similares foram observados em estudos prévios (36, 38-40). Com o advento do processo inflamatório periodontal, o aumento na solubilidade das moléculas de colágeno altera o remodelamento tecidual e modifica a proporção de fibras colágenas tipo I e III. Nestes animais também foram observadas quantidades semelhantes de fibras colágenas tipo I e III e intensamente destruídas aos 7 dias, em concordância com o estudo de Liu e colaboradores (39). Tais alterações na quantidade e qualidade podem contribuir para a progressão da doença periodontal, uma vez que as fibras colágenas do tecido gengival perdem sua função protetora e facilitam a entrada de microrganismos patogênicos. Com o passar do tempo, o colágeno matura e ganha nova conformação, o tecido se reorganiza, aumenta a quantidade do tipo I e diminui o tipo III, conforme pode ser observado nos períodos subsequentes do nosso estudo (40, 41).

Para análise das taxas de organização das fibras colágenas em cada grupo experimental correlacionado com cada período de eutanásia, o modelo multinível de Regressão de Poisson foi utilizado. Este modelo permite o ajuste das variáveis considerando a variabilidade entre os indivíduos e tem sido de escolha em estudos epidemiológicos com grandes amostras (56), porém para estudos experimentais em animais, como neste caso, tem sido pioneira. Esta escolha justifica-se, pois assim como os humanos, os animais também possuem características individuais inerentes de fatores ambientais e/ou genéticos.

Nos animais que receberam somente tratamento convencional da doença periodontal (RAR), uma menor taxa de organização das fibras colágenas foi observada, quando comparados aos animais sem doença periodontal. Neste grupo, as fibras colágenas perderam sua conformação normal e só voltaram a adquiri-la aos 30 dias após o tratamento. Além do biofilme bacteriano e do cimento contaminado, o epitélio juncional e parte do tecido de granulação danificados são removidos durante o procedimento de RAR, o que favorece a ação dos fatores de virulência, que não são removidos pelo método mecânico e permanecem no ambiente subgengival. Frente a esses agentes agressores, o processo inflamatório

persiste, dificultando a produção e organização das fibras colágenas e consequentemente retardando o reparo tecidual.

A doença periodontal resulta de uma interação entre bactérias patogênicas e o hospedeiro e, por isso, torna-se válido apostar em terapêuticas que interfiram também na resposta inflamatória (6, 14). A TFDa tem se mostrado efetiva como terapia adjunta à RAR no tratamento da doença periodontal, tanto em estudos com animais (11, 24, 42) quanto em humanos (8, 35, 43, 55), principalmente em áreas de difícil acesso, como região de furca e bolsas profundas (11). Em contrapartida, uma recente metanálise (49) demonstrou que, apesar das diferenças estatisticamente significativas a favor da TFDa associada a RAR na redução de profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, estes resultados apresentaram relevância clínica de pequena magnitude.

No presente estudo, os animais submetidos aos tratamentos com TFDa demonstraram taxas maiores de produção e organização das fibras colágenas, comparadas aos animais sem doença periodontal. As fibras colágenas apresentaram um rearranjo pouco desorganizado aos 7 e 15 dias, o qual reorganizou-se em feixes paralelos e densos aos 30 dias. Prates e colaboradores (24) também encontraram melhor organização das fibras colágenas do tecido periodontal nos animais submetidos a TFDa adjuvante quando comparados aos que receberam somente a RAR. No estudo de Garcia e colaboradores (32), as fibras colágenas do ligamento periodontal de ratos se tornaram mais organizadas e alinhadas nos animais submetidos à TFDa aos 30 dias após o tratamento, resultados concordantes com nosso estudo. Esta melhora deve-se ao uso do laser, que tem a capacidade de promover a bioestimulação tecidual, controlando eventos proliferativos necessários para o reparo e controle dos processos inflamatórios, a saber, redução na expressão dos mediadores pró-inflamatórios, angiogênese e proliferação celular. A molécula de colágeno, quando aquecida pelo laser, sofre desnaturação reversível, processo essencial para síntese de novas moléculas e remodelamento do tecido. É sabido também que a TFDa é capaz de inativar os fatores de virulência presentes no tecido periodontal, contribuindo para o processo de reparo do tecido lesado (44-46). Além disso, quando o laser é associado a Fs, há um aumento na difusão tecidual do oxigênio, molécula essencial para a produção de colágeno pelos fibroblastos (47, 48).

Alguns estudos tem sido publicados com resultados divergentes em relação à eficácia da TFDa na doença periodontal (12, 49-51). Isto se deve, primariamente, à considerável variabilidade metodológica destes estudos em relação à fonte de luz, tempo de aplicação, dosagem, diferentes Fs; todavia, padronizar esses parâmetros tem se sido um verdadeiro desafio. O efeito fotodinâmico dos Fs é baseado em reações oxidativas que alteram a bioquímica e a morfologia das células microbianas. Alguns estudos tem avaliado o efeito antimicrobiano de diferentes Fs utilizados na TFDa (11, 44), e o mais utilizado tem sido o AM. Sua banda de absorção da luz irradiada pelo laser é mais eficiente próxima a 660nm, comprimento de onda o qual foi utilizado neste estudo.

Com relação às diferentes formulações utilizadas neste estudo, benefícios semelhantes puderam ser observados na quantidade e qualidade das fibras colágenas nos animais submetidos à TFDa com formulação de AM contendo etanol e com formulação de AM contendo água. George & Kishen, em seus estudos *in vitro* (20, 52), utilizaram a formulação de AM contendo etanol em canais radiculares de dentes humanos extraídos e em culturas bacterianas, encontrando eficácia máxima na morte bacteriana, concluindo que essa formulação possui melhor potencial foto-oxidativo que a formulação padrão (água) quando irradiado pelo laser. Dutra e colaboradores (53) demonstraram que a produção de espécies reativas de oxigênio oriundas da foto-ativação do AM foi maior na formulação contendo etanol em comparação a água somente, atribuindo uma maior produção de oxigênio singleto, aumento da sua meia vida (20 μ s) e menor agregação molecular do AM na presença do etanol. A inclusão do etanol na diluição minimiza a dimerização do AM, mantendo-o na sua forma monomérica e resultando em alta transferência de energia para o oxigênio molecular e maior produção de oxigênio singleto (54). Entretanto, esses resultados parecem ser mais eficazes em estudos *in vitro* e, embora haja uma melhora nas propriedades físicas e químicas, há escassez de estudos que utilizem etanol na formulação do AM e, por esse motivo, seu potencial efeito *in vivo* permanece vagamente esclarecido.

Em suma, este estudo é original, apresenta um potencial inovador e promissor com a inclusão do etanol na formulação do AM para este tipo de modelo. De acordo com o modelo experimental utilizado neste estudo, nossos achados sugerem que a TFDa pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da doença periodontal como adjuvante ao tratamento convencional, uma vez que

ambas as formulações de AM apresentaram boa efetividade. As diferentes formulações do AM demonstraram resultados semelhantes em relação à quantidade de fibras colágenas e qualidade das mesmas no tecido gengival. Como sugestão para pesquisas futuras, repetidas aplicações da TFDa, alteração na concentração e no tipo de fotossensibilizador utilizado, assim como nos parâmetros de aplicação do laser de baixa potência podem ser úteis para maximizar os efeitos da formulação contendo etanol. Do ponto de vista morfológico, pode-se acrescentar outros elementos teciduais de estudo, como a imuno-histoquímica, que poderá ser de grande valia para a elucidação dos mecanismos que fazem parte do processo reparacional da doença periodontal.

Agradecimentos

Nós gostaríamos de agradecer ao Sérgio Oliveira Silveira, técnico em histologia do Departamento de Bioquímica da UFSM, por todo conhecimento e suporte no preparo das amostras biológicas. Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol* 2004; 75(7):1033-1041
2. Martin JA, Page RC, Loeb CF, Levi Jr PA. Tooth loss in 776 treated periodontal patients. *J periodontol* 2010; 81(2):244-250
3. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 1997; 14:216-248
4. Narayanan AS, Page RC, Meyers DF. Characterization of collagens of diseased human gingiva. *Biochem* 1980; 19:5037-5043
5. Havemose-Poulsen A, Holmstrup P, Stoltze K, Birkedal-Hansen H. Dissolution of type I collagen fibrils by gingival fibroblasts isolated from patients of various periodontitis categories. *J Periodontal Res* 1998; 33(5):280-291
6. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000 2006; 40:29-49
7. Cobb CM. Non-Surgical Pocket Therapy: Mechanical. *Ann Periodontol* 1996; 1:443-490
8. Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Roß A, Willershausen, B. Comparison Between Scaling-Root-Planing (SRP) And SRP/Photodynamic Therapy: Six-Month Study. *Head Face Medic* 2012, 8(12)
9. Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections - State of the art. *Photodiag Photodyn Ther* 2009; 6:170-188
10. de Oliveira RR, Novaes Jr AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba Jr M, Sato S, de Souza SLS, Palioto BD, Grisi, MFM, Feres M. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers Med Sci* 2011; 26:359-67
11. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M. Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodont* 2008; 79(6):1081-1088
12. Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini M. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol* 2009; 80:1568-1573
13. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Jr EC.; Santos, Santinoni CS, Bosco AF, Nagata MJH, Theodoro LH. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2013; 28:143–150
14. Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos Jr J, Silva-Filho VJ, Thedei Jr G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg* 2011; 29(11):735-40
15. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3:436-450
16. Malik R, Manocha A, Suresh DK. Photodynamic therapy – a strategic review. *Indian J Dent Res* 2010; 21(2):285-291

17. Gursoy H, Ozcakir-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig* 2013; 17(4):1113-1125
18. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009; 24:259-268
19. Raghavendra M, Koregol A, Bholra S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aus Dent J* 2009; 54(suppl 1):S102-109
20. George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of enterococcus faecalis. *Photochem photobiol* 2008; 84(3):734-740
21. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model *JPeriodontol* 2005; 76(7):1100-1105
22. Komerik N, Nakanishi H, Mac Robert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas Gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization In an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(3): 932-940
23. 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 Periodont Res* 2008; 43(2):162–167
24. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CF, Cai S, Mayer MPA, Ribeiro AC, Ribeiro MS. Histomorphometric and microbiological short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Las Surg* 2011; 29(12):835-844
25. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J* 2010; 4:37-47
26. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal Protection. *Period* 2000 1997; 13:91-120
27. Suvik A, Effendy AWM. The use of modified masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malay J Veter Res* 2012; 3(1):39-47
28. Noorlander ML, Melis P, Jonker A, Van Noorden CJF. A quantitative method to determine the orientation of collagen fibers in the dermis. *Histochem Cytochem* 2002; 50(11):1469-1474
29. Rich L, Whittaker P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J morphol Sci* 2005; 22(2):97-104
30. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picosirius-Polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1991; 86:1-11
31. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009; 36(3):219-228
32. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, Nagata MJH, Cirelli JA, Theodoro LH. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamictherapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol* 2011; 38(12):1106–1114
33. Silva JC, Lacava ZGM, Kuckelhaus S, Silva LP, Monteiro Neto LF, Sauro EE, Tedesco AC. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. *Lasers Surg Med* 2004; 34(5):451–457

34. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J. Periodontol* 2003; 74(2):196–201
35. Séguier S, Souza SLS, Sverzut ACV, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, Corrêa VMA, Coulomb B, Tedesco AC. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photob B: Biology* 2010; 110(3):348–354
36. Séguier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol* 2001; 72(10):1398–1406.
37. Séguier S, Godeau G, Brousse N. Collagen fibres and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *J Periodontol* 2000; 71(6):1079–1085
38. Younes R, Ghorrac C, Khalifed S, Igondjo-Tchen-Changotadeb S, Yousfib M, Willig C, Sennib K, Godeaub G, Naamane N. Pertinent cell population to characterize periodontal disease. *Tissue and Cell* 2009; 41(2):141–150
39. Liu L, Li C, Cai X, Xiang J, Cao Z, Dong W. The temporal expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periodontitis in an animal model. *J Periodont Res* 2010; 45(4):541–549.
40. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17(4):307-313
41. Lorencini M, Silva JAF, Almeida CA, Bruni-Cardoso A, Carvalho HF, Stach-Machado DR. A new paradigm in the periodontal disease progression: Gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening. *Tissue and Cell* 2009; 41(1):43–50
42. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, GARCIA VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007; 78(3):566-75
43. Peplow PV, Chung T-Y, Baxter GD. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 2012; 30(3):118–148
44. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol* 2009, 80(11):1790-1798.
45. Melo VA, dos Anjos DCS, Albuquerque Jr R, Melo DB, Carvalho FUR. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras* 2011; 26(2):2011–129
46. Kesler G, Koren R, Kesler A, Kristt D, Gal R. Differences in histochemical characteristics of gingival collagen after ER:YAG laser periodontal plastic surgery. *J Clin Las Med Surg* 2000; 18(4):203-207
47. Silva LAB, Novaes Jr AB, Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria Jr M, Silva RAB. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 2012; 38(3):360-366
48. Bottura PE, Milanezi J, Fernandes LA, Caldas HC, Abbud-Filho M, Garcia VG, Baptista MASF. Nonsurgical Periodontal Therapy Combined with Laser and

- Photodynamic Therapies for Periodontal Disease in Immunosuppressed Rats. *Transplant Proc* 2011; 43(5):2009–2016
49. 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* 2013; 28(2):669-682
 50. Balata ML, Ribeiro EP, Bittencourt S, Tunes UR. Photodynamic therapy adjuvant to non-surgical periodontal treatment. *R Periodont* 2010; 20(2):22-32
 51. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2010; 81(1):4-14
 52. George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt* 2007; 12(3):29-34
 53. Dutra DAM. Avaliação do fotossensibilizador azul de metileno em diferentes formulações para uso em terapia fotodinâmica antimicrobiana [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Maria, 2013.
 54. Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem Photob* 2004; 79(3): 227-232
 55. Andersen CCP, Flyvbjerg A, Buschard K, Holmstrup P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. *J periodontol* 2007; 78(7):1264-1275
 56. Machry RV, Tuchtenhagen S, Agostini BA, Teixeira CRS, Piovesan C, Mendes FM, Ardenghi TM. Socioeconomic and psychosocial predictors of dental healthcare use among Brazilian preschool children. *BMC O Health* 2013; 13(60)

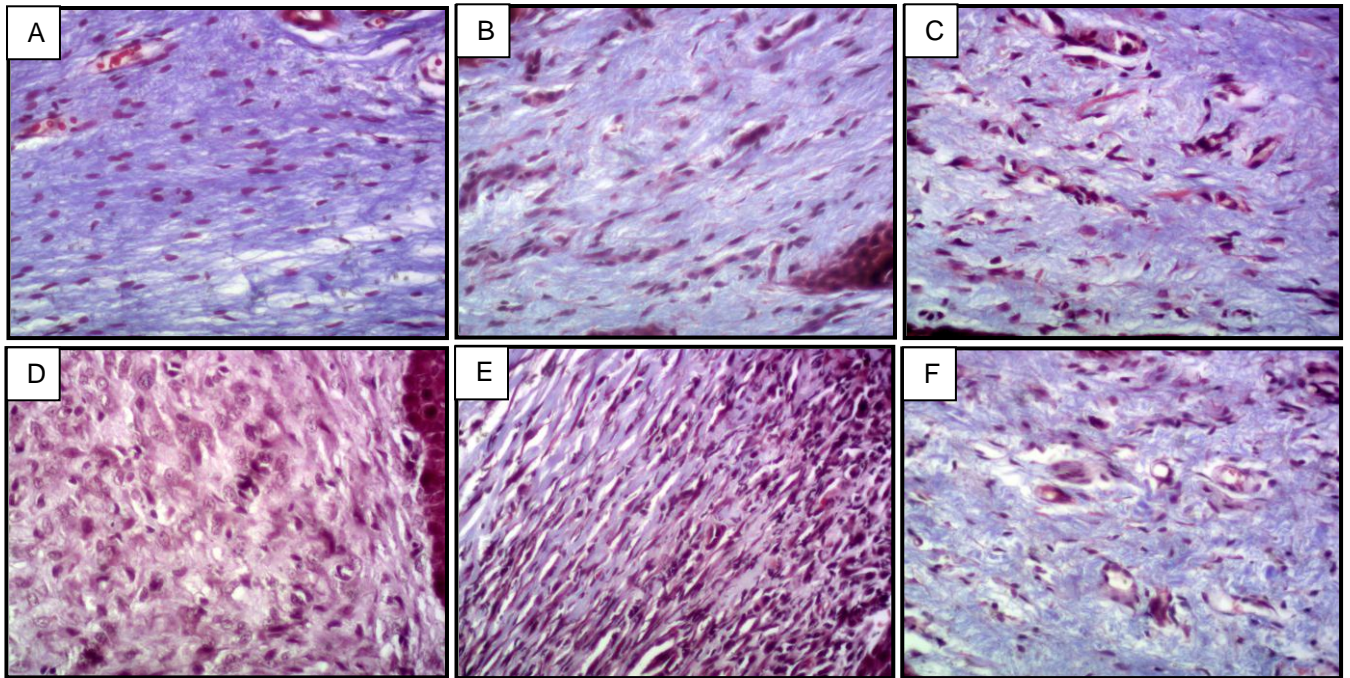


Figura 1 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos controles, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) CN aos 7 dias; (B) CN aos 15 dias; (C) CN aos 30 dias; (D) CP aos 7 dias; (E) CP aos 15 dias; (F) CP aos 30 dias. (TM, magnificação original: x400).

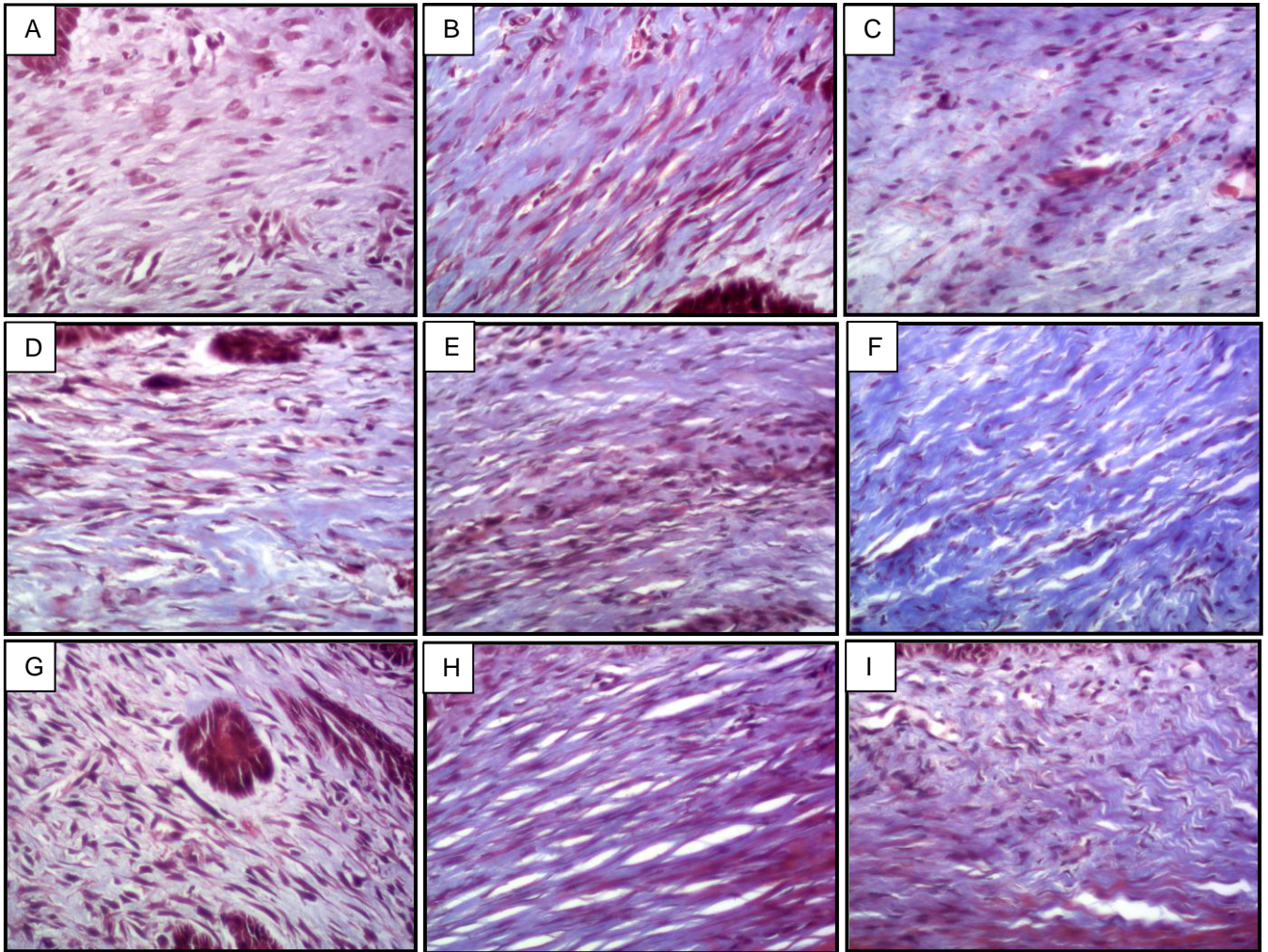


Figura 2 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos de tratamento, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) RAR aos 7 dias; (B) RAR aos 15 dias; (C) RAR aos 30 dias; (D) TFDa aos 7 dias; (E) TFDa aos 15 dias; (F) TFDa aos 30 dias; (G) TFDa/etanol aos 7 dias; (H) TFDa/etanol aos 15 dias; (I) TFDa/etanol aos 30 dias. (TM, magnificação original: x400).

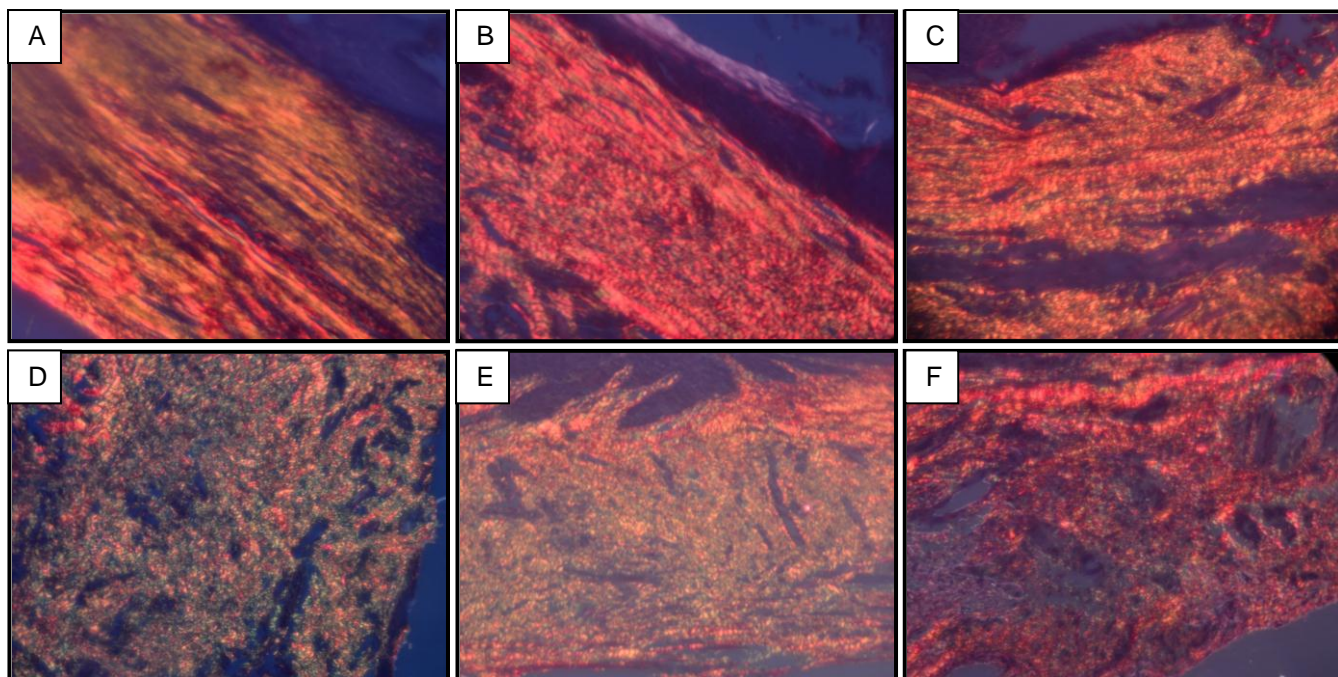


Figura 3 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos controles, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) CN aos 7 dias; (B) CN aos 15 dias; (C) CN aos 30 dias; (D) CP aos 7 dias; (E) CP aos 15 dias; (F) CP aos 30 dias. (PSR, magnificação original: x200).

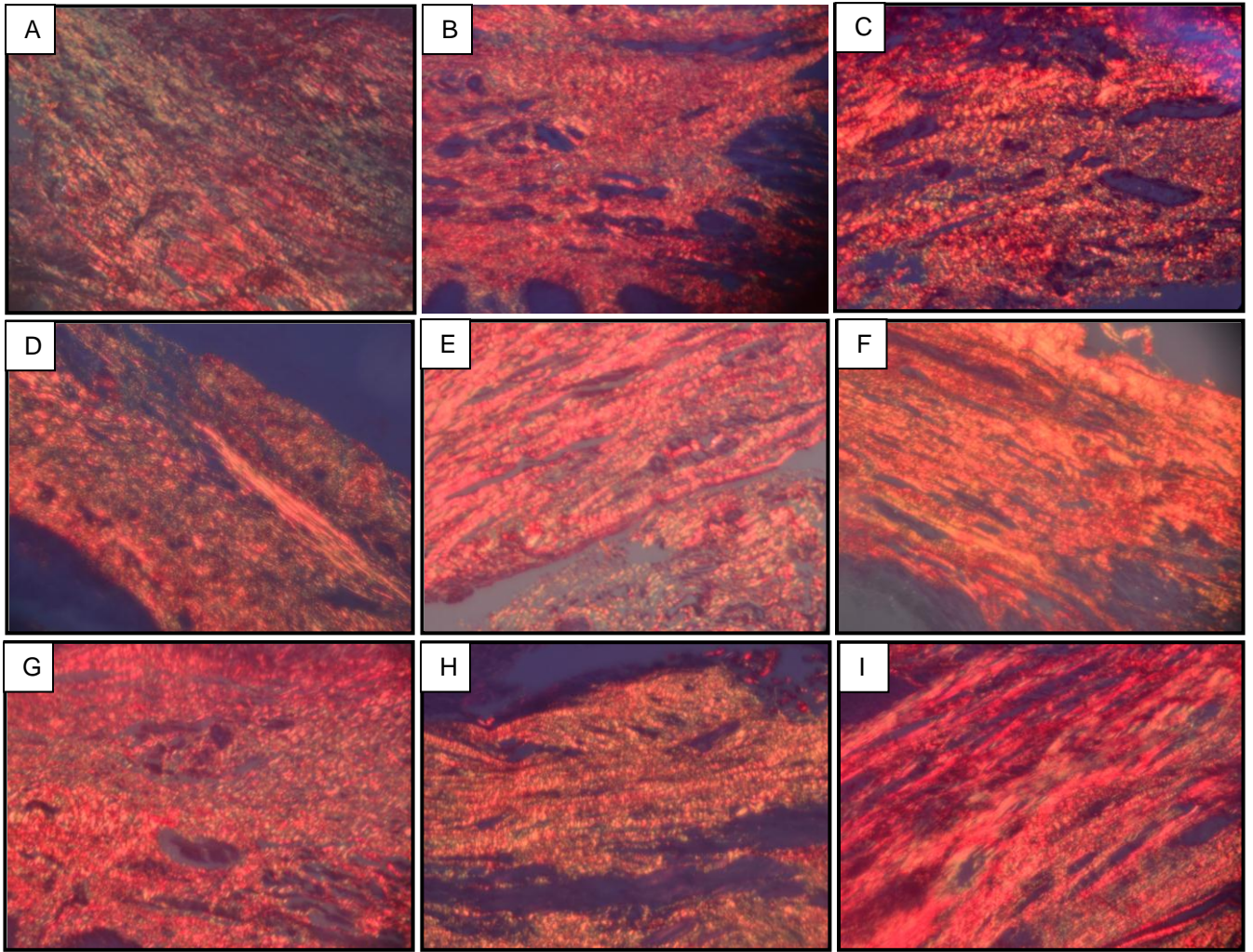


Figura 4 – Fotomicrografia ilustrando a área ocupada por fibras colágenas do tecido gengival removido da região vestibular do primeiro molar inferior direito dos grupos de tratamento, de acordo com os períodos de eutanásia. (A) RAR aos 7 dias; (B) RAR aos 15 dias; (C) RAR aos 30 dias; (D) TFDa aos 7 dias; (E) TFDa aos 15 dias; (F) TFDa aos 30 dias; (G) TFDa/etanol aos 7 dias; (H) TFDa/etanol aos 15 dias; (I) TFDa/etanol aos 30 dias. (PSR, magnificação original: x200).

Tabela 1 – Características descritivas da amostra, baseadas na contagem de lâminas obtidas de cada animal em cada grupo experimental e período de eutanásia, perfazendo um total de 325 lâminas.

| | n | % |
|-------------------------------------|----------|----------|
| <i>Grupos experimentais</i> | | |
| CN | 40 | 12,31 |
| CP | 43 | 13,23 |
| RAR | 80 | 24,62 |
| TFDa | 78 | 24,00 |
| TFDa/etanol | 84 | 25,85 |
| <i>Períodos da Eutanásia</i> | | |
| 7 dias | 111 | 34,15 |
| 15 dias | 113 | 34,77 |
| 30 dias | 101 | 31,08 |

Tabela 2 – Percentual médio da área de fibras colágenas segundo os grupos experimentais e os períodos de eutanásia.

| | % Média (Desvio Padrão) | n |
|------------------------------|--------------------------------|----------|
| Grupos experimentais | | |
| CN | 67,99 (3,97) ^a | 40 |
| CP | 45,71 (8,00) ^b | 43 |
| RAR | 58,39 (7,45) ^c | 80 |
| TFDa | 71,70 (6,17) ^d | 78 |
| TFDa/etanol | 72,37 (5,24) ^d | 84 |
| Períodos da Eutanásia | | |
| 7 dias | 60,25 (11,78) ^a | 111 |
| 15 dias | 63,12 (9,36) ^a | 113 |
| 30 dias | 71,37(9,34) ^b | 101 |

* Letras diferentes significam diferença estatística. (Anova)

Tabela 3 – Análise univariada. Comportamento da organização das fibras colágenas nos diferentes grupos experimentais e nos diferentes períodos da eutanásia.

| | RR (IC 95%)* | Valor do p** |
|------------------------------|--------------------|--------------|
| Grupos experimentais | | |
| CN | 1,00 | |
| CP | 0,67 (0,63 – 0,71) | 0,000 |
| RAR | 0,86 (0,81 – 0,89) | 0,000 |
| TFDa | 1,05 (1,00 – 1,10) | 0,028 |
| TFDa/etanol | 1,06 (1,01 – 1,11) | 0,008 |
| Períodos da Eutanásia | | |
| 7 dias | 1,00 | |
| 15 dias | 1,04 (1,01 – 1,08) | 0,006 |
| 30 dias | 1,18 (1,14 – 1,22) | 0,000 |

*RR = rate ratio (razão de taxas).

**Análise multinível de Regressão de Poisson.

Tabela 4 – Modelo Final. Análise multivariada. Comportamento da organização das fibras colágenas nos diferentes grupos experimentais e nos diferentes períodos da eutanásia.

| | RR (IC 95%)* | Valor do p** |
|------------------------------|--------------------|--------------|
| Grupos experimentais | | |
| CN | 1,00 | |
| CP | 0,67 (0,63 – 0,71) | 0,000 |
| RAR | 0,85 (0,81 – 0,90) | 0,000 |
| TFDa | 1,06 (1,01 – 1,10) | 0,015 |
| TFDa/etanol | 1,06 (1,01 – 1,11) | 0,007 |
| Períodos da Eutanásia | | |
| 7 dias | 1,00 | |
| 15 dias | 1,05 (1,02 – 1,09) | 0,001 |
| 30 dias | 1,19 (1,15 – 1,23) | 0,000 |

* RR = rate ratio (razão de taxas).

**Análise multinível de Regressão de Poisson, considerando o ajuste das variáveis.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a proposta de investigar a ação tecidual de diferentes formulações de AM utilizadas na TFDa no comportamento das fibras colágenas, esta dissertação, em particular, contribuiu para a melhor compreensão da organização das fibras colágenas entre os diferentes grupos experimentais e os períodos de eutanásia. Assim, pudemos concluir que a TFDa adjuvante ao tratamento periodontal convencional contribuiu em maior quantidade e melhor qualidade das fibras colágenas no tecido gengival de ratos, modificando de forma gradativa e crescente seu rearranjo, alinhamento e agrupamento à medida que o processo de reparo se instaura. Os dados morfométricos foram semelhantes em ambas as formulações utilizadas, demonstrando que a diluição ao qual o AM foi sujeito não influenciou no padrão de organização das fibras colágenas, e todos os animais apresentaram melhor comportamento das fibras aos 30 dias após os tratamentos.

Este estudo foi conduzido em animais sob condições experimentais de indução da doença periodontal e todos os procedimentos e etapas foram cuidadosamente planejados e executados. Esforços foram feitos para controlar ao máximo possíveis vieses que pudessem comprometer a validade interna deste estudo. Nossos achados devem ser extrapolados com cautela e devem ser inferidos para populações com as mesmas características, mediante as mesmas condições de tratamento da doença periodontal, a fim de evitar conclusões errôneas que possam comprometer a validade externa.

Neste estudo, as fibras colágenas foram coradas por métodos histoquímicos com Tricrômico de Masson e Picrosirius Red, que são colorações específicas para tecido conjuntivo dentro das suas particularidades. O processo de reparo tecidual compreende uma série de mecanismos e interações complexas entre elementos celulares e não celulares e as análises imuno-histoquímicas têm se mostrado mais sensíveis na detecção histológica desses elementos. Como implicação para pesquisas futuras, sugerimos estudos imuno-histoquímicos do efeito do etanol na formulação de AM para análise de diferentes elementos que participam deste processo de reparo, como por exemplo, avaliação de mediadores pró-inflamatórios, metaloproteinases, fatores de crescimento vascular e angiogênese, marcadores de

células proliferativas, entre outros. Assim, cada elemento pode acrescentar conhecimentos na fisiopatologia da doença periodontal e contribuir na busca por alternativas terapêuticas que otimizem seu processo cicatricial.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, R.; LOEBEL, N.; HAMMOND, D. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **Journal of Clinical Dentistry**. V. 18, n. 2, p. 34-8. 2007.

ANUSAKSATHIEN, O.; GIANNOBILE, W. V. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 3, n. 2, p. 129-39. 2002.

ARDILA, C. M.; GRANADA, M. I.; GUZMÁN, I. C. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. **Journal of Periodontal Research**. V. 45, n. 4, p. 557–63. 2010.

BARTOLD, P. M.; MCCULLOCH, C. A. Information generation and processing systems that regulate periodontal structure and function. **Periodontology 2000**. V. 63, n. 1, p. 7-13. 2013.

BARTOLD, P. M.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. **Periodontology 2000**. V. 40, n. 68, p. 29-49. 2006.

BARTOLD, P. M.; VAN DYKE, T. E. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontology 2000**. V. 62, n. 1, p. 203–17. 2013.

BARTOLD, P. M.; WALSH, L. J.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of the gingiva. **Periodontology 2000**. V. 24, p. 28-55. 2000.

BERAKDAR, M. et al. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. **Head and Face Medicine**. V. 8, n. 12. 2012.

BRAHAM, P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. **Journal of Periodontology**. V. 80, n. 11, p. 1790-8. 2009.

CARVALHO, A. S. et al. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **Photomedicine and Laser Surgery**. V. 29, n. 11, p. 735-40. 2011.

CASSELL, G. H.; MEKALANOS, J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. **The Journal of the American Medical Association**. V. 285, n. 5, p. 601-5, Feb. 2001.

CHANG, P-C.; LIM, L. P. Interrelationships of periodontitis and diabetes: A review of the current literature. **Journal of Dental Science**. V. 7, n. 3, p. 272-82. 2012.

COBB, C. M. Non-surgical pocket therapy: mechanical. **Annals of Periodontology**. V. 1, n. 1, p. 443-90. 1996.

DAI, T.; HUANG, Y-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections - State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. V. 6, n. 3-4, p. 170-88. 2009.

DE ALMEIDA, J. M. et al. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**. V. 78, n. 3, p. 566-75. 2007.

DE OLIVEIRA, R. R. et al. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. **Lasers in Medical Science**. V. 26, n. 3, p. 359-67. 2011.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. V. 90, n. 12, p. 889-905. 1998.

DRISKO, C. L. Periodontal debridement: still the treatment of choice. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**. V. 14, suppl 1, p. 33-41. 2014.

DZINK, J. L. et al. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. **Journal of Clinical Periodontology**. V. 12, n. 12, p. 648-59. 1985.

EBERHARD, J. et al. Full-mouth treatment concepts for chronic periodontitis: a systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**. V. 35, n. 7, p. 591-604. 2008.

ETO, F. S.; RASLAN, S. A.; CORTELLI, J. R. Características microbianas na saúde e doença periodontal. **Revista Biociências de Taubaté**. V. 9, n.2, p.45-51, Abr/Jun 2003.

EYDEN, B.; TZAPHLIDOU, M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. **Micron**. V. 32, n. 3, p. 287-300. Abr 2001.

FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontology 2000**. V. 40, p. 50–76. 2006.

FERNANDES, L. A. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **Journal of Clinical Periodontology**. V. 36, n. 3, p. 219-28. 2009.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Matriz Extracelular e Tecido conjuntivo. In: **Tratado de histologia em cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 4, p. 60-4. cap. 6, p. 91.

GENCO, R. J. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. **Journal of Periodontology**. V. 52, n. 9, p. 545-58, Sep. 1981.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Influence of Photosensitizer Solvent on the Mechanisms of Photoactivated Killing of *Enterococcus faecalis*. **Photochemistry and Photobiology**. V. 84, n. 3, p. 734-40. 2008.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **Journal of Biomedical Optics**. V. 12, n. 3, p. 29-34. 2007.

GRZESIK, W. J.; NARAYANAN, A. S. Cementum and Periodontal Wound Healing and Regeneration. **Critical Reviews in Oral Biology Medicine**. V. 13, n. 6, p. 474-84. 2002.

GURSOY, H. et al. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. **Clinical Oral Investigations**. V. 17, n. 4, May. 2013.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Science**. V. 3, n. 5, p. 436-50. 2004.

HAVEMOSE-POULSEN, A. et al. Dissolution of type I collagen fibrils by gingival fibroblasts isolated from patients of various periodontitis categories. **Journal of Periodontal Research**. V. 33, n. 5, p. 280-91, Jul 1998.

HEITZ-MAYFIELD, L. J. A. Systemic antibiotics in periodontal therapy. **Australian Dental Journal**. V. 54, Suppl 1, p. S96–101. 2009.

HIRSCH, R.; DENG, H.; LAOHACHAI, M. N. Azithromycin in periodontal treatment: more than an antibiotic. **Journal of Periodontal Research**. V. 47, n. 2, p. 137–48. 2012.

JAYASREE, R. S. et al. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. **Journal of Biomaterials Applications**. V. 15, n. 3, p. 176-86, Jan. 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In: **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 5, p. 103-12.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**. V. 74, p. 153-6. 1982.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global burden of severe tooth loss: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Dental Research**. V. 93, suppl 7, p. 20S-28S. 2014.

KESLER, G. et al. Differences in histochemical characteristics of gingival collagen after ER:YAG laser periodontal plastic surgery. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. V. 18, n. 4, p. 203-7. 2000.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**. V. 86, n. 8, p. 694-707. 2007.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. O. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology 2000**. V. 14, p. 33-53. 1997.

LIMA, V. et al. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – papel de moduladores farmacológicos. **Revista Periodontia**. V. 18, n. 3, p. 7-19, Set. 2008.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**. V. 22, n. 2, p. 83-91. 2007.

MALIK, R.; MANOCHA, A.; SURESH, D. K. Photodynamic therapy – A strategic review. **Indian Journal of Dental Research**. V. 21, n. 2, p. 285-91. 2010.

MARIOTTI, A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. **Periodontology 2000**. V. 3, p. 39-63, Oct. 1993.

MATSUMURA, Y. et al. Azithromycin may inhibit interleukin-8 through suppression of rac1 and a nuclear Factor-Kappa B Pathway in KB cells stimulated with lipopolysaccharide. **Journal of Periodontology**. V. 82, n. 11, p. 1623-31. 2011.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. B, Biol. V. 79, n. 2, p. 159-70, 2005.

MINOR, R. R. Collagen Metabolism: A Comparison of Diseases of Collagen and Diseases Affecting Collagen. **American Journal of Pathology**. V. 98, n. 1, p. 228-280, Jan. 1980.

MONTES, G.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 86, p. 1-11. 1991.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**. V. 40, p. 11–28. 2006.

NARAYANAN, A. S.; PAGE, R. C.; MEYERS, D. F. Characterization of collagens of diseased human gingiva. **Biochemistry**. V. 19, n. 22, p. 5037-43. 1980.

OTTANI, V.; RASPANTI, M.; RUGGERI, A. Collagen structure and functional implications. **Micron**. V. 32, n. 3, p. 251-60. 2001.

PAGE, R. C.; NARAYANAN, A. S.; SCHROEDER, H. E. Connective tissue composition and collagen synthesis in diseased and normal gingiva of adult dogs with spontaneous periodontitis. **Archives of Oral Biology**. V. 25, n. 11-12, p. 727-36. 1980.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontology 2000**. V. 60, p. 15–39. 2012.

PRATES, R. A. et al. Histomorphometric and Microbiological Short-Term Evaluation of Inflammatory Periodontal conditions and Bacterial Reduction in a Rat Model. **Photomedicine and Laser Surgery**. V. 29, n. 12, p. 835-44. 2011.

RAGHAVENDRA, M.; KOREGOL, A.; BHOLA, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Australian Dental Journal**. V. 54, suppl 1, p. S102-9. 2009.

REYNOLDS, J. J.; MEIKLE, M. C. Mechanisms tissue matrix of connective destruction in periodontitis. **Periodontology 2000**. V. 14, p. 144-57. 1997.

REYNOLDS, M. A. Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. **Periodontology 2000**. V. 64, p. 7-19. 2014.

SCHROEDER, H. E.; LISTGARTEN, M. A. The gingival tissues: the architecture of periodontal Protection. **Periodontology 2000**. V. 13, p. 91-120. 1997.

SILVA, L. A. B. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **Journal of Endodontics**. V. 38, n. 3, p. 360-6, Mar. 2012.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **Journal of Periodontology**. V. 63, suppl 4, p. 322-331. 1992.

SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**. V. 55, n. 1, p. 143-66, Feb 2011.

TABA JR, M. et al. Current concepts in periodontal bioengineering. **Orthodontics and Craniofacial Research**. V. 8, n. 4, p. 292–302. 2005.

TATAKIS, D. N.; KUMAR, P. S. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**. V. 49, n. 3, p. 491-516. 2005.

USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. a comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives of Histology Cytology**. V. 65, n. 2, p. 109-26. 2002.

VAN DER ZEE, E.; EYERTS, V.; BEERTSEN, W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. **Journal of Clinical Periodontology**. V. 24, p. 297-305. 1997.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Photosensitizing agents-circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**. V. 53, n. 2, p. 119-26. 2004.

YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. V. 15, n. e7, Aug. 2013.

ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. **Micron**. V. 32, n. 4, p. 427-38. 2001.

6 ANEXOS

6.1 Anexo A – Normas do periódico *Lasers in Surgery and Medicine*.

Author Guidelines

Online Submission and Peer Review

The following areas are required to be answered prior to being able to make your final submission.

- A. All submissions with photos of human faces where eyes are not blacked out must have patient release to use photo permission (form above) in addition to the normal patient consent forms
- B. All submissions where human subjects are involved must have Institutional Review Board approval (IRB)
- C. All submissions where animal subjects are involved must have Institutional Animal Care and Use Committee approval (IACUC) where applicable by country
- D. All submissions with National Institute of Health (NIH) funding must be stated and made clear on the title page. (see above)

Format

Lasers in Surgery and Medicine is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/lsm>. Please refer to the Specific Instructions below.

Articles

Articles describe new findings of major importance.

Reviews

Lasers in Surgery and Medicine will publish reviews which provide an overview of therapeutic techniques and/or research in areas of interest in laser medicine and biology. Most of these reviews will be solicited, but unsolicited submissions are welcome. Authors should contact the editors prior to preparing a review article.

Letters

Letters may express an opinion about material previously published in *Lasers in Surgery and Medicine*, or express views on any issue related to lasers in medicine and biology.

Case reports

Case reports are not published unless they represent very original information. Authors of case reports that don't meet these requirements are encouraged to submit to Wiley's open access journal *Clinical Case Reports* (www.clinicalcasesjournal.com), which aims to directly improve health outcomes by identifying and disseminating examples of best clinical practice.

Specific Instructions for Authors

Note: Please read these instructions carefully--technical deficiencies must be corrected before manuscripts can be reviewed.

Submission of Manuscripts

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/lsm> . Check for an existing user account. If you are submitting for the first time, and you do not find an existing account, create a new account. Follow all instructions.

Submit manuscript as word doc. file and figures as tiff files only.

Do not embed tables and figures into your main document..

PLEASE UPLOAD ONLY Word DOC OR .RTF FILE FOR MAIN DOCUMENT AND TABLE FILES AND IMAGES SHOULD BE .EPS OR .TIF FILE FORMAT ONLY

Upload as many files as needed for your manuscript in groups of three or fewer. These files will be combined into a single .PDF document for the peer review process. If you are submitting a revision, please only include the latest set of files.

For revisions, please delete the original versions of all text. DOC files, table and figure files and upload the revised files as directed above.

To designate the order in which your files appear, use the dropdowns in the "Order" column below.

View your uploaded files by clicking on PDF. When you are finished, click "Save and Continue."

File Designation Instructions: [File Designation Instructions.pdf](#)

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been

received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at support@scholarone.com.

Manuscripts should contain the following components:

Title Page.

The title page should include the complete article title; the first name, middle initial and last name of all authors, with their highest academic degree; institution(s) with which each author is affiliated, with city, state and zip code; with authors' initials in parentheses at their respective institution(s); acknowledgments of grant or other research funding; and the name, complete mailing address, telephone number, and facsimile number, cable address, or Telex number for all correspondence.

Key Words.

Key words used for indexing the article should appear in alphabetical order and should not repeat terms already in the title.

Abstract.

Provide a structured abstract in which the following sections are delineated: Background and Objective: Gives brief overview of the topic and in this context states the main objective of the study; Study Design/Materials and Methods: Describes the basic design, subjects, and scientific methods (for case reports, section title is Study Design/Patients and Methods); Results: Gives main results of the study including confidence intervals and exact level of statistical significance, whenever appropriate; Conclusion: States only those conclusions supported by the data obtained, and, whenever appropriate, the direct clinical application of the findings (avoid speculation). Include the headings Background and Objective, Study Design/Materials and Methods, Results, and Conclusions in the text of the abstract.

Introduction.

The introduction should not be an extensive review of the literature, but only of that portion which is pertinent to the purpose of the study and its relationship to work in the same field.

Materials and Methods.

Materials and methods should be written clearly and in such detail that the work can be duplicated by others. Particular care should be taken in specifying laser wavelength, pulsewidth or exposure duration, focal spot, and treatment energy, power, irradiance, or fluence.

Results.

Results must be described concisely. Text, tables and figures must be consistent and not repetitious.

Discussion.

Discussion should be concise, explaining the significance of the experimental findings and their relation to previous investigations.

References.

List references in consecutive numerical order (not alphabetically). Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by arabic numerals (in parentheses). Once a reference is cited, all subsequent citations should use the original reference number.

Authors are responsible for bibliographic accuracy and must check every reference in the manuscript and proofread each reference in the page proofs. Abbreviations of journal titles should follow those used in *Index Medicus*. Do not use periods after abbreviations of journal titles. References must contain names of all authors, complete titles, and first and last page numbers. Unpublished observations and personal communications should be cited parenthetically in the text and not be included in the References.

Examples:

Journal Article:

Tan OT, Stafford TJ, Murray S, Kurban AK. Histologic comparison of the pulsed dye laser and copper vapor laser effects on pig skin. *Lasers Surg Med* 1990; 10:551-558.

Chapter in a Book:

Golenhofen K, Finger K, Foster B, Mandrek K, Noack T. Light-induced relaxation of smooth muscle after treatment with BAY K 8644 is related to release of nitric oxide.

In: Sperelakis N, Wood J, eds. *Frontiers in Smooth Muscle Research*. New York: Wiley-Liss, Inc. 1990:595-604.

Legends.

Legends must be typed double-spaced, beginning on a separate sheet of paper. The legend should allow the illustration to be fully understandable without recourse to the text. Use arrows, letters, etc., for enhanced understanding of features being illustrated.

Tables.

Tables must be typed on separate pages, be numbered in order of appearance with sequential arabic numerals, have a title, and be cited in the text.

Acknowledgments.

Illustrations from other publications must be acknowledged. Include the following when applicable: author(s), title of article, title of journal or book, volume number, page(s), month and year. The publisher's and author's permission to reprint must accompany the manuscript.

Primary Data Retention.

Primary data used in the preparation of articles published in *Lasers in Surgery and Medicine* should be retained in readily accessible and interpretable form.

Authorship Standards.

Each author of a manuscript submitted to *Lasers in Surgery and Medicine* must have made a significant contribution to the research and must assume responsibility for the content of the article. (See Huth EJ: Guidelines on authorship of medical papers. *Ann Intern Med* 1986; 104:269-274.)

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying

with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

6.2 Anexo B – Parecer do Comitê de Ética no Uso de animais da UFSM.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Influência do solvente fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de periodontite experimental em ratos diabéticos e não diabéticos"

Número do Parecer: 027/2013

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Cristiane Cadernatori Danesi

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 05/09/2013

Santa Maria, 05 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM

6.3 Anexo C – Técnica do processamento histológico dos tecidos.

1. Processador de tecidos Lupetec® PT-05

1.1. *Fixação:* (além do período de 24h)

- Formol tamponado a 10% por 30 minutos.

1.2. *Desidratação:* (5 banhos)

- Álcool 60% por 30 minutos.
- Álcool 70% por 30 minutos.
- Álcool 80% por 30 minutos.
- Álcool 90% por 30 minutos.
- Álcool 100% por 30 minutos.

1.3. *Diafanização:* (2 banhos)

- Xilol por 30 minutos.
- Xilol por 30 minutos.

1.4. *Infiltração:* (2 banhos)

- Imersão em parafina líquida a 62°C por 30 minutos.
- Imersão em parafina líquida a 62°C por 30 minutos.

2. Inclusão em blocos de parafina.

6.4 Anexo D – Técnica histológica da Coloração Tricrômico de Masson.

Masson Trichrome (with aniline blue), Easy Path[®]

Reagentes:

- Hematoxilina férrica de Weigert, solução A – reagente A
- Hematoxilina férrica de Weigert, solução B – reagente B
- Fucsina – reagente C
- Ácido fosfomolibdico – reagente D
- Azul de anilina – reagente E

Procedimento:

1. Desparafinizar as lâminas em xilol por 5 minutos.
2. Hidratar as lâminas em álcool 99%, 95% e 70% e lavar em água corrente.
3. Levar as seções de tecido em água destilada e após secar as lâminas.
4. Em um Becker pequeno, fazer a junção dos reagentes **A + B** na seguinte proporção: 10 gotas do reagente **A** + 10 gotas do reagente **B**. Cobrir o tecido com a solução obtida com esta junção. Deixar agir por 10 minutos.
5. Lavar as lâminas em água corrente e depois secar.
6. Colocar na seção de tecidos 10 gotas do reagente **C**. Deixar agir por 4 minutos.
7. Lavar as lâminas em água corrente e colocar na seção de tecido 10 gotas (ou o suficiente apenas para cobrir o corte) do reagente **D**. Deixar agir por 5 minutos.
8. Secar as lâminas sem lavá-las e colocar na seção de tecido 10 gotas (ou o suficiente apenas para cobrir o corte) do reagente **E**. Deixar agir por 5 minutos.
9. Lavar em água destilada e desidratar rapidamente em série de álcool ascendente até o xilol e montar as lâminas.

6.5 Anexo E - Técnica histológica da Coloração Picrosirius Red.

Picrosirius Red Staining, Easy Path[®]

Reagentes:

- Picrosirius (30ml) – reagente A
- Hematoxilina de Carazzi (30ml) – reagente B

Procedimento:

1. Desparafinizar as lâminas em xilol por 5 minutos.
2. Hidratar as lâminas em álcool 99°, 95°, 70° e lavar em água corrente.
3. Colocar na seção de tecido 10 gotas do reagente **A** (ou o suficiente apenas para cobrir o tecido), e deixar agir por 1 hora.
4. Lavar as lâminas em água corrente por 3 minutos.
5. Secar as lâminas e colocar na seção de tecido 10 gotas do reagente **B** (ou o suficiente apenas para cobrir o tecido), e deixar agir por 4 minutos.
6. Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos. Após secar as lâminas.
7. Desidratar em série de álcool ascendente até o xilol e montar as lâminas.