

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

**ESTUDO COMPARATIVO DA INFLUÊNCIA DA TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA E REMOÇÃO MECÂNICA DE
BIOFILME NO PROCESSO INFLAMATÓRIO PERIODONTAL
INDUZIDO EM HAMSTERS**

TATIANA CARGNELUTTI

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre Profissional em Lasers em
Odontologia.**

Orientadora:

Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-Orientadora:

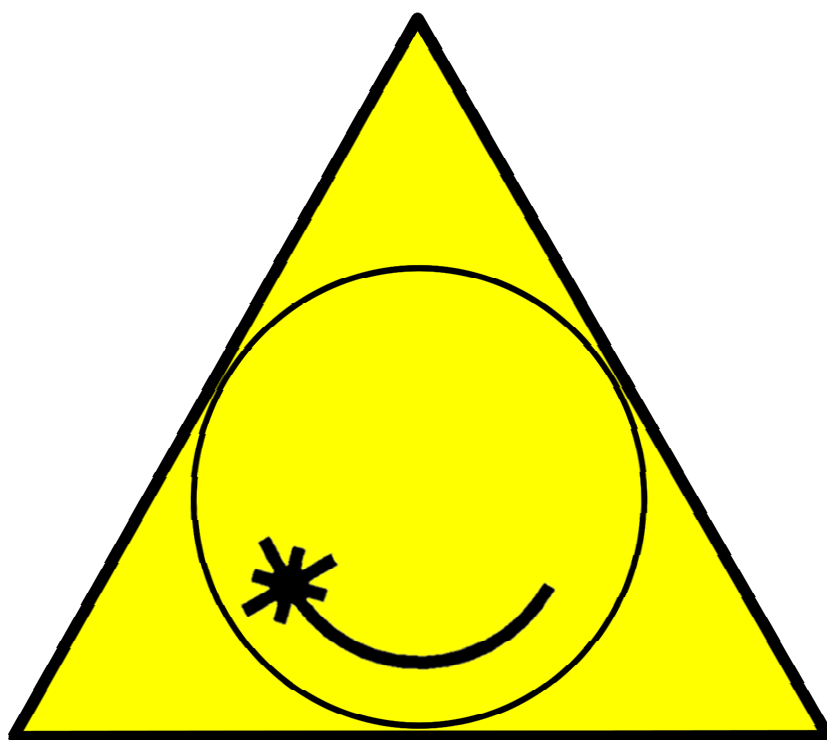
Prof. Dra. Ilíria Salomão Feist

São Paulo

2007

MESTRADO PROFISSIONALIZANTE

LASERS EM ODONTOLOGIA



DEDICATÓRIA

A DEUS, que me ofereceu a oportunidade desta vida e está sempre presente em todos os momentos, dando-me forças e coragem para seguir adiante e por permitir a presença de tantas pessoas queridas em meu caminho.

Aos meus pais, **Dante e Regina**, por seu amor incondicional, pela amizade, pelo apoio e por acreditarem sempre em mim. Amo vocês com todo o coração. Dedico este trabalho à vocês. Obrigada, Obrigada e Obrigada!

À minha irmã, **Thaís**, que tanto amo e admiro. Agradeço a Deus por estarmos juntas nesta vida! Que você continue a iluminar as nossas vidas com a sua meiguice e alegria. Ti amo!

Aos meus avós, **Luís e Carlos** (*in memoriam*), que mesmo distantes, permaneceram presentes em inspiração e coragem. Este amor é eterno. Meu abraço carinhoso a vocês!

À minha avó **Adelina** que tanto amo e agradeço. Os seus ensinamentos são tesouros em minha vida! Espero persistir sempre nesta caminhada como você!

À minha avó **Elma** que tanto amo. Seu carinho é uma lembrança permanente em minha vida.

Aos meus **tios e primos** (**Luciana, Abelardo, Ivone e Benedito, Cíntia e Olberes, Guilherme e Daise, Maurício e Gisele, Adriana e Sey, Sola e Moacir**) que com carinho e orações me ajudaram no momento mais difícil. Sou grata pela alegria que trazem para a minha vida! Obrigada família! Amo vocês!

Ao **Maurício**, por me incentivar a ser melhor, a crescer. Obrigada pela paciência e por todos os abraços que deixamos de dar e pelo tempo que ficamos distantes. Obrigada pela alegria que você trouxe para a minha vida. Você estará sempre no meu coração!

À **Maria Rosa, Paulo Finotti e família**. Obrigada pelo carinho que vocês sempre tiveram comigo nesses anos todos. Vocês estarão sempre no meu coração.

“A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família.” (Leon Tolstói)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**, pela amizade, ensinamentos, paciência que foram estímulo constante no transcorrer deste trabalho. Eu agradeço a Deus a possibilidade de estar ao seu lado e de aprender com você. Você é especial em minha vida e levarei para sempre o seu exemplo de dignidade, ética, alegria e humanidade. Foi um privilégio estar ao seu lado! Amo muito você !!!

Muito, muito... obrigada !!!

*“O grande homem é aquele que não
perde o coração de criança.”
(Mêncio)*

AGRADECIMENTOS

São tantos os amigos e pessoas queridas que eu gostaria de agradecer e dizer obrigada ... Espero que vocês recebam o meu abraço carinhoso e a minha amizade sincera em seus corações! Valeu!!!

À **Prof. Dra. Iliria Salomão Feist**, pela co-orientação e pela amizade demonstrada ao longo deste trabalho contribuindo assim para a sua realização .

À **Prof. Dra. Cristiane Miranda França**, pela participação e riqueza de conhecimentos demonstrados na avaliação do resultado final deste trabalho. Muito Obrigada!

À **equipe do Biotério- IPEN**, em especial, à **Neide**, pela dedicação e cuidado com os animais e presença constante neste trabalho. Muito obrigada!

À **Prof. Dra. Sônia Lícia Baldochi** por gentilmente permitir o acesso aos equipamentos do Laboratório de Crescimento de Cristais – IPEN para análise dos resultados.

A todos os **Professores** do curso de Mestrado Profissional em Laser em Odontologia pelos ensinamentos transmitidos.

Aos amigos e pesquisadores, **Renato e Ilka**, pela paciência e amizade, pelo aconchego e força. A presença de vocês foi decisiva e é uma alegria tê-los como amigos. Meu agradecimento é eterno.

À **Silvia Nuñez**, que com sua alegria e capacidade intelectual me inspiraram a seguir por este caminho. Obrigada pelos conselhos, orientações e amizade, pois sem você este trabalho não seria o mesmo.

Aos amigos **Melissa, China, Aécio, Aginaldo e Alessandro** meu abraço forte e carinhoso por torcerem por este trabalho e pelo meu crescimento. Obrigada pelos bons momentos de Ipen!

Aos **amigos e amigas** de mestrado (**Laura, Michele, Rita, Paula, Lílian, Flávia, Fernando, Rafael, Ricardo, Larissa, Agnes, Carol, Eva e Daniel**) pelo agradável convívio, amizade e conhecimentos compartilhados. Todos estão em meu coração. Foi muito bom conhecê-los!

Às secretárias **Andréa e Elza (IPEN), Cida (LELO)** e a todos os funcionários **do IPEN e LELO** pela eficiência, carinho e atenção dispensados no transcorrer de todo o curso.

À minha grande amiga **Marta Vezzali**, que esteve presente com seu carinho em todos os momentos dessa trajetória preenchendo com muita alegria este dias. Obrigada por sua amizade e pelo aconchego, pelas conversas e conselhos. Te amo amiga!

Às amigas e amigos de Campinas, **Patrícia, Darlana e Leandro, Fabiana e Sapia, Renata e Léo, Clarissa e família, Cristiane Stein, Simone e Naoshi, Larissa, Raquel, Cristina, Renata e Luciana (andarilho), Janaína e Joaquin, Ézio, Paulo e Adriana, Carlos e Liciane, Fernando e Adriana, Alessandra (Pira), Leila, Tony e família e amigos da Meimei**, pela torcida e amizade. Todo o carinho que compartilhamos permanecerá sempre em meu coração! Amo todos vocês!!!

Ao **Prof. Dr. Harbans Arora e sua família** por estarem presentes e por me acolherem nos momentos difíceis. Levo a alegria e a honra de tê-los conhecido. Muito Obrigada!

Aos amigos cearenses, **Nádia, Josiane e família, Marcélia, Carol e Fábio, Roberta e Cristiano, Kátia e Franzé, Paulo e Gracêmia Picanço e equipe, Joênio e equipe, Wiron e Dani, Aninha, Carol Medeiros, Claudinha (sobral), Murilo e amigos da SEF** que participaram da minha vida e que mesmo distantes estaremos sempre perto: no pensamento e no coração. Obrigada pela amizade e carinho sincero.

À MMOptics por emprestar o laser e pelo fornecimento do fotossensibilizador utilizados nesta pesquisa.

“É apenas com o coração que se pode ver direito, o essencial é invisível aos olhos.” (Antoine de Saint-Exupéry)

ESTUDO COMPARATIVO DA INFLUÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA E REMOÇÃO MECÂNICA DE BIOFILME NO PROCESSO INFLAMATÓRIO PERIODONTAL INDUZIDO EM HAMSTERS

TATIANA CARGNELUTTI

RESUMO

As doenças periodontais estão diretamente relacionadas à presença do biofilme dental determinando assim uma resposta inflamatória do hospedeiro. A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) tem se mostrado promissora na redução *in vitro* de periodontopatógenos e na redução do processo inflamatório associado à infecção *in vivo*. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica no processo inflamatório periodontal induzido em hamsters comparando-o à remoção mecânica do biofilme. Foram utilizados 29 hamsters, fêmeas e dois animais foram sacrificados previamente ao experimento para a observação das características histológicas iniciais. A indução foi realizada através de uma dieta rica em carboidratos durante 60 dias. No dia 30, três animais foram sacrificados para a observação das características histológicas após a indução. Vinte e quatro animais foram então divididos em 3 grupos com 8 animais cada: PDT, Controle e Remoção Mecânica (RM). Nos grupos PDT e RM, a terapêutica foi realizada na região de 1º. e 2º molares inferiores esquerdo e direito. Para o grupo PDT, foi utilizado o fotossensibilizador azul de metileno 0,01% e laser de GaAlAs ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $P=40\text{mW}$) com um tempo de pré-irradiação de 1 minuto e tempo de irradiação de 2 minutos com $D=24,5 \text{ J/cm}^2$. Os animais do grupo RM receberam escovação com escova bitufo com 10 movimentos vibratórios 45º do dente. Não foi realizado nenhum tratamento no grupo controle. Foram sacrificados dois animais por grupo nos dias 31, 38, 45 e 60 dias após o tratamento para a avaliação histológica. Um dia após o tratamento, o grupo PDT apresentou o melhor resultado na redução do processo inflamatório comparado aos outros grupos. Em relação à redução da atividade osteoclástica, o grupo controle manteve presença de osteoclastos durante todo o período experimental enquanto que o grupo PDT e RM apresentaram redução da atividade osteoclástica. Trinta dias após o tratamento, não se observou diferença entre os grupos. Os resultados sugerem que a PDT reduz o processo inflamatório 24 h após o tratamento e que ambas as terapias inibem a atividade osteoclástica 30 dias após o tratamento.

**COMPARATIVE STUDY ABOUT THE INFLUENCE OF THE ANTIMICROBIAL
PHOTODYNAMIC THERAPY AND BIOFILM MECHANICAL REMOVE ON
PERIODONTAL INFLAMMATORY PROCESS INDUCED IN HAMSTER**

TATIANA CARGNELUTTI

ABSTRACT

Periodontal diseases are directly related to the presence of dental biofilm determinant to inflammatory process on these tissues. Photodynamic therapy has been shown a promising approach on *in vitro* reduction of periodontopathogenics reducing the inflammatory process *in vivo*. The purpose of this study was to evaluate the influence of PDT antimicrobial effect on the periodontal inflammatory process in hamsters. Twenty nine hamsters, females, were used in this study. Two animals were sacrificed before the induction of the disease to observe the normal histological characteristics of the periodontal and twenty seven were fed with high sucrose diet. On the 30th day, two animals were killed before intervention to observe the inflammatory characteristics of the periodontal and twenty four were divided into three groups of eight animals each: PDT, control and Mechanical Remove (RM). In the groups PDT and RM therapy was carried out on the first and second mandibular molars. PDT group received the association of the photosensitizer Methylene Blue (0,01%) and a GaAlAs laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $P=40\text{mW}$) with 1 minute of pre irradiation time and 1 minute of irradiation with $D=24,5 \text{ J/cm}^2$. In group RM, mechanical remove was done with a toothbrush by 10 movements on 45° to the teeth. Control group received no treatment. Diet was given for all groups until day 60. For histological analysis, two animals per group were killed on days 31, 38, 45 and 60 after the treatment. A score system was used to evaluate the periodontal inflammatory process histologically. After 24 h of the treatment, the PDT group showed the best results on the inflammatory process reduction compared to the others groups. The control group maintained the level of osteoclastic activity for all the experimental period while the PDT and RM group showed a reduction in the levels of osteoclasts. After 30 days, there was no difference between the groups. These results suggest that PDT reduces the inflammatory process 24 h following treatment. Moreover, both therapies inhibit osteoclastic activity 30 days after treatment.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	02
2 OBJETIVOS	06
3 REVISÃO DA LITERATURA	07
3.1 Doença Inflamatória Periodontal	07
3.2 Aspectos fisiológicos dos tecidos Periodontais.....	08
3.3 Tratamento Convencional das Doenças Periodontais.....	10
3.4 Doença Periodontal Inflamatória Experimental.....	12
3.2 Terapia Fotodinâmica.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Modelo Experimental Animal.....	22
5 RESULTADOS	27
6 DISCUSSAO	34
CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GaAlAs	Arseneto de gálio e alumínio (laser de diodo de emissão de 660nm).
Laser	Light amplification stimulated emission of radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LILT	Low intensity Laser Therapy (terapia com laser em baixa intensidade)
He-Ne	Hélio- neônio
P	Potência
λ	Comprimento de onda
Ufc/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro.
TPI	Tempo de pré-irradiação
PDT	Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica)
AAP	American Academy of periodontology
TE	Tecido epitelial
TC	Tecido conjuntivo
COA	Crista Óssea Alveolar
D	Densidade de energia

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma resposta inflamatória desencadeada pelo biofilme dental e pode ser observada microscópica e clinicamente no periodonto afetado e representa a reação do hospedeiro à microbiota do biofilme e seus produtos. Este processo inflamatório decorrente da invasão microbiana é o mecanismo pelo qual o hospedeiro responde a esta agressão e que determina as alterações patológicas resultantes nos tecidos periodontais.

O processo inflamatório age nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano e tem como objetivo impedir que este se dissemine ou invada os tecidos. Em alguns casos, esta reação de defesa do hospedeiro pode ser prejudicial porque também é passível de danificar as células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo envolvendo inclusive o tecido ósseo. Assim, tal processo defensivo pode, paradoxalmente, responder pela maior parte da lesão tecidual observada no tecido periodontal.

As doenças periodontais incluem diversas alterações inflamatórias tanto nos tecidos de proteção (gengivite induzida por placa) quanto de sustentação dos dentes (periodontite). A primeira é caracterizada pelo processo inflamatório do tecido gengival (edema, sangramento e vermelhidão) que não resulta em perda óssea alveolar. A periodontite crônica tem como característica em sua fase mais avançada, a destruição do ligamento periodontal, perda da crista óssea alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsas periodontais^[1-3].

A etiologia primária da doença periodontal é determinada pela placa bacteriana, composta por bactérias colonizadoras das superfícies orais, inicialmente formada por cocos gram-positivos dispostos sob a forma de biofilme microbiano. Bastonetes gram-positivos, antes em pequeno número, aumentam e eventualmente superam a quantidade de cocos. Receptores presentes na membrana desses cocos e bastonetes permitem a adesão subsequente de microrganismos gram-negativos, que possuem pouca ou nenhuma capacidade de aderir diretamente ao dente. Com a multiplicação dessas bactérias e conseqüente espessamento do biofilme, ocorre a formação de um baixo gradiente de oxigênio nas camadas mais internas do biofilme, que propicia a multiplicação de microrganismos anaeróbicos estritos. O local aonde essa adsorção ocorre classifica o biofilme em supra ou subgengival^[4-7].

Os biofilmes supragengivais formam-se acima da margem gengival e são constituídos principalmente por bactérias gram-positivas, aeróbicas e sacarolíticas. Em contraste, o biofilme subgengival se deposita abaixo da margem gengival, e é formado por bactérias gram-negativas, anaeróbicas e proteolíticas. O biofilme supragengival está associado à gengivite e o subgengival à periodontite^[8].

O processo inflamatório da doença periodontal é, portanto, o resultado de uma interface complexa entre infecção bacteriana e resposta do hospedeiro, sempre modificada por fatores ambientais.

Em indivíduos que mantêm uma adequada higiene oral e fazem uso comedido da sacarose, a microbiota predominante pode ser menos patogênica, podendo o indivíduo possuir placa, e ainda assim ter saúde. Todavia, quando a remoção mecânica da placa é deficiente e a utilização da sacarose é freqüente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e a placa se torna mais virulenta, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro (cáries) quanto de tecido mole (doenças periodontais). Logo, a chave principal para a prevenção das doenças periodontais é o controle do biofilme oral que pode ser mecânico, químico ou a associação de ambos. Este controle é procedimento básico para a prática odontológica, e sem ele a saúde bucal não pode ser alcançada e nem preservada, e os resultados terapêuticos não podem ser assegurados^[9].

Todavia, devemos lembrar das dificuldades em se conseguir que os pacientes mantenham um adequado controle mecânico da placa. Por conseguinte, substâncias antimicrobianas poderiam tentar compensar a desmotivação para uma boa limpeza dos dentes^[10].

Experimentos realizados em animais confirmam a etiologia infecciosa das lesões gengivais. Estudos em roedores e cães têm demonstrado o estabelecimento da inflamação gengival apenas em animais que acumularam biofilme dental. O hamster sírio dourado, por exemplo, é especialmente utilizado para o estudo da doença periodontal experimental em um modelo animal. Para esses animais, uma dieta rica em carboidratos promove o aumento do peso e, após aproximadamente 100 dias, resulta em acúmulo do biofilme dental e destruição periodontal. Esta dieta proposta para roedores está de acordo com as observações encontradas em humanos, já que dietas ricas em carboidratos são capazes de desenvolver a doença em ambas as espécies^[11-26].

Outras vantagens deste modelo experimental são: o porte pequeno do animal,

baixo custo e fácil manipulação e manutenção, pois necessitam de pequenos espaços. O período de gestação é de 15 dias, sendo este, menor que o de outros animais de laboratório, gerando um total de cinco a seis filhotes por ninhada. A sua cavidade oral apresenta três molares em cada quadrante dos maxilares similares aos dentes humanos ^[20], o que permite um modelo de estudo da doença periodontal e das terapêuticas associadas à sua prevenção e ao seu tratamento.

Alguns estudos têm demonstrado que diversas espécies de microorganismos que habitam a cavidade oral podem ser destruídas por um laser em baixa intensidade na presença de um agente fotossensibilizador. Esta modalidade terapêutica é denominada de terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic therapy*) onde um agente fotossensibilizador, o qual a banda de absorção deve ser ressonante com o comprimento de onda da luz a ser utilizada, absorve a energia luminosa e é levado a um estado excitado, produzindo espécies de oxigênio altamente reativas, resultando em injúria e morte celular^[27].

Uma grande vantagem da terapia fotodinâmica é sua ação local e restrita no tratamento, assegurando a manutenção na ecologia sistêmica e na microflora oral que, normalmente, é muito afetada pelos antibióticos. Esta terapia constitui um benefício significativo por não agir indiscriminadamente nos complexos sistemas bacterianos no organismo do hospedeiro^[28].

Diversos estudos científicos demonstram o sucesso da PDT na eliminação de microorganismos na Odontologia^[29-34]. Estes trabalhos sugerem a possibilidade da PDT tornar-se uma terapia alternativa para infecções microbianas localizadas.

Estudos “*in vitro*” ^[28, 35, 36] avaliaram a ação bactericida da terapia fotodinâmica, onde bactérias periodontopatogênicas foram expostas a diversas associações entre diferentes comprimentos de onda e fotossensibilizadores, resultando em uma ação antimicrobiana eficiente. Os autores concluíram que a PDT poderá ser um coadjuvante importante às técnicas convencionais no controle bacteriano das doenças periodontais e que estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para confirmar a eficácia deste procedimento^[37].

Recentemente, alguns autores avaliaram a ação da terapia fotodinâmica na indução de infecções orais em modelo experimental em animais ^[38-40]. Foi observada a redução de patógenos do biofilme dental e peri-implantar concluindo-se, portanto, que a terapia fotodinâmica é um tratamento não invasivo e que poderá ser utilizada complementando o tratamento convencional.

Especificamente na indução de doença periodontal em roedores, KOMERIK *et al.*^[41] e ALMEIDA ET AL^[42] avaliaram a influência da terapia fotodinâmica no tratamento precoce da periodontite induzida em molares de ratos. Em ambos os estudos, é sugerido que esta terapia pode ser uma alternativa para a prevenção e tratamento da periodontite, reduzindo a destruição óssea alveolar.

A terapia fotodinâmica é uma alternativa promissora para prevenção e o tratamento da doença periodontal induzida em roedores, já que foi observada a redução da inflamação tecidual e reabsorção óssea nos animais tratados.^[41, 42] Entretanto, estes estudos foram direcionados à redução de uma única espécie bacteriana, associada ou não, à indução experimental através de ligadura em ratos. Deste modo, neste estudo investigou-se o efeito da terapia fotodinâmica em doença periodontal experimental induzida em hamsters, através de dieta rica em carboidratos, comparando-a ao tratamento convencional de remoção mecânica de placa.

2. OBJETIVOS

- 1 Investigar os efeitos da terapia fotodinâmica, através de aplicação única, no processo inflamatório induzido em tecidos periodontais de hamsters;
- 2 Comparar a terapia fotodinâmica com o tratamento usual de remoção mecânica de biofilme;
- 3 Observar a evolução da doença periodontal após o tratamento, em momentos específicos, até 60 dias após indução da doença.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Patogênese e etiologia do Processo inflamatório Periodontal

A inflamação consiste em um mecanismo básico de reparação tecidual após uma injúria e consiste em uma cascata de reações celulares e vasculares que servem para remover o dano e gerar novo tecido. Esta cascata inclui em uma alteração microvascular caracterizada por uma vaso constrição e vaso dilatação seguida do aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo, migração de células inflamatórias para a região agredida, liberação de mediadores químicos, apoptose e necrose celular, liberação de fatores de crescimento, regeneração e crescimento tecidual^[43].

As doenças periodontais incluem diversas alterações inflamatórias e são tradicionalmente divididas em duas categorias principais: as doenças que acometem o tecido de proteção, doenças gengivais, e as doenças que envolvem as estruturas de suporte do dente. A classificação para doenças periodontais foi apresentada em 1999, durante o workshop internacional onde foi proposta a seguinte sistemática para diagnosticar e classificar os processos patológicos que afetam o periodonto. A Academia Americana de Periodontologia (APP) postulou a seguinte classificação^[44]:

I – Doenças Gengivais

- A – Doenças gengivais induzidas por placa dental
- B – Doenças gengivais não induzidas por placa dental

II – Periodontites crônicas

- A – Localizadas
- B – Generalizadas

III – Periodontites Agressivas

- A – Localizadas
- B – Generalizadas

A gengiva clinicamente saudável é caracterizada por um infiltrado de células inflamatórias com predominância de neutrófilos associado ao epitélio juncional e linfócitos no tecido conjuntivo subjacente (page and Schoreder 1976). Alguns fatores

de defesa permitem que a gengiva clinicamente saudável não evolua para doença como, por exemplo, a barreira epitelial intacta, fluxo positivo do fluido gengival, efeito antimicrobiano dos anticorpos e função fagocitária dos neutrófilos e macrófagos^[45]. A evolução da doença gengival ocorre se houver acúmulo de biofilme patogênico suficiente para iniciar uma resposta inflamatória substantiva.

Desde o clássico trabalho “Gengivite experimental em Humanos”^[46], o biofilme dental está bem estabelecido como o fator etiológico primário da doença periodontal.

O biofilme dental é formado por uma comunidade bacteriana – instalada em uma matriz constituída por polímeros extracelulares, aderidas entre si ou a uma superfície sólida como, por exemplo, em superfícies mineralizadas do dente, esmalte, dentina e também à restaurações dentais, próteses e implantes. Os biofilmes são denominados supragengivais quando se formam acima da margem gengival e são constituídos principalmente por bactérias gram-positivas, aeróbicas e sacarolíticas. Em contraste, o biofilme subgengival se deposita abaixo da margem gengival, e é formado por bactérias gram-negativas, anaeróbicas e proteolíticas. O biofilme supragengival está associado à gengivite e o subgengival à periodontite^[8].

Não existem evidências de que a gengivite não tratada sempre progrida para uma periodontite. Porém, quando se desenvolve periodontite ela é freqüentemente precedida pela gengivite. Isto implica que a maioria das doenças periodontais são relacionadas à desordens associadas ao biofilme que se iniciam com o processo inflamatório da gengiva. Se não tratado, em indivíduos susceptíveis, a inflamação deverá evoluir para sítios mais profundos do periodonto.^[1]

Logo, o processo inflamatório da doença periodontal é o resultado de uma interface complexa entre infecção bacteriana e resposta do hospedeiro, sempre modificada por fatores ambientais.

3.2 Aspectos fisiológicos dos tecidos periodontais

O periodonto (peri = em redor de, odontos = dente) compreende os tecidos que estão ao redor dos dentes. A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral. O periodonto, também chamado de "aparelho de inserção" ou "tecido de suporte de dentes", forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que sofre determinadas alterações com a idade e, além disso, está sujeito a alterações relacionadas com modificações no meio ambiente^[47].

O periodonto pode ser classificado em periodonto de proteção e de sustentação. O periodonto de proteção é formado pela gengiva que é subclassificada em gengiva marginal livre e gengiva inserida. Esta forma um colar ao redor do colo dentário, isolando a porção exposta do dente de suas estruturas de sustentação. É de grande importância a relação mantida entre o dente e a gengiva porque esta união gengivo-dentária tem o papel de manter hígido o aparelho de suporte dos dentes, durante a sua fisiologia, não permitindo que o mesmo entre em contato direto com o meio séptico bucal. Em outras palavras, a gengiva tem a função física de proteger a articulação alveolodentária do trauma mastigatório e da invasão microbiana^[48].

O periodonto de sustentação compreende o cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. Este promove a inserção dos dentes em seus ossos maxilares por meio de uma articulação fibrosa (pertencente ao grupo das sinartroses) formando assim um aparelho de sustentação elástico, capaz de resistir às forças de tração e pressão próprias da sua função. O cemento é um tecido mineralizado que recobre a raiz dentária em forma de camadas, e se constitui em sua porção mais externa. Tem as funções de ancorar o dente ao alvéolo através das fibras do ligamento, compensar o desgaste oclusal através do seu crescimento e contribuir com a erupção ocluso-medial do dente. O ligamento periodontal é o tecido conjuntivo que circunda as raízes dentárias ligando-as ao osso alveolar. O ligamento periodontal contém terminações nervosas proprioceptivas que são sensíveis à pressão. As funções do ligamento periodontal são: física, formativa, sensorial e nutricional^[49].

A gengiva é formada por um epitélio estratificado queratinizado denominado de epitélio gengival que sofre uma contínua renovação da população celular. A divisão celular se efetua na camada basal e nas porções mais internas da camada espinhosa. A medida que as células superficiais vão se perdendo por atrito ou descamação, as células basais vão avançando para a superfície do epitélio tomando o lugar destas perdidas^[50].

O epitélio juncional é desprovido de camada córnea, devido à alta velocidade e renovação celular, apresentando uma relativa permeabilidade. O grau de queratinização está intimamente relacionado com a função, ou seja, quanto maior a função, maior o grau de queratinização. Os estímulos mecânicos como a escovação, aumentam a queratinização. Diminuem a queratinização fatores como: índice de mitose, inflamação, idade e menopausa. Quanto maior a inflamação, menor o grau de queratinização, porque na inflamação a renovação celular é muito rápida não havendo tempo das células se maturarem e formarem a camada córnea^[51].

O tecido conjuntivo subjacente ao epitélio é formado por células, fibras e matriz

extracelular. O conteúdo celular é formado por fibroblastos, células formadoras de fibras colágenas, células inflamatórias, além de ser um tecido altamente vascularizado e enervado. O suprimento vascular é responsável pela nutrição do tecido conjuntivo e tecido epitelial. O tecido conjuntivo ósseo é formado pela crista óssea alveolar e processo alveolar, composto de uma parte orgânica (35%) formada de fibras colágenas e proteínas e uma parte inorgânica (65%) composta principalmente de hidroxiapatita (uma forma de fosfato de cálcio) As células predominantes são osteoprogenitoras (mesenquimais), osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sendo este último, responsável pela remodelação óssea fisiológica e patológica^[52].

3.3 Tratamento Convencional das Doenças periodontais

O fundamento da prevenção primária e secundária da doença periodontal é principalmente o controle mecânico e químico da placa supragengival, onde o processo inflamatório desenvolvido no tecido agredido é inibido através de medidas preventivas de higiene oral, revertendo completamente os quadros iniciais da doença^[53].

O tratamento da gengivite e da periodontite é baseado na redução do fator etiológico e consiste em orientação e motivação em técnica de escovação e uso do fio dental e limpeza profissional que atua na prevenção do início e da recidiva do processo inflamatório periodontal^[54]. A periodontite, por apresentar-se como um processo inflamatório avançado, necessita ainda tratamentos específicos para a prevenção da evolução da doença e tratamentos regeneradores com o objetivo reconstituir os tecidos periodontais de suporte destruídos pela doença. Os tratamentos para a periodontite constituem em técnicas de raspagem e alisamento radicular, cirurgias periodontais ressectivas e cirurgias periodontais regenerativas.

A eficiência da remoção mecânica de biofilme dental em doenças inflamatórias periodontais está bem estabelecida na literatura científica^[55]. Entretanto os métodos mecânicos para remoção de placa requerem tempo, motivação e destreza manual. Mesmo os pacientes que são adequadamente instruídos e motivados para manterem sua higiene oral satisfatória na ausência de um constante reforço os níveis de cooperação diminuem bastante^[56].

A dificuldade para realizar a higiene oral aumenta em pacientes idosos, em uso de aparelhos ortodônticos, pacientes com limitações físicas ou mentais e pacientes hospitalizados. Além do que, certas condições locais e/ou sistêmicas determinam um

comprometimento momentâneo ou definitivo da habilidade do paciente na realização do controle mecânico de placa supragengival. Esta dificuldade determina um maior acúmulo de biofilme dental e assim um maior índice de doença periodontal nesses pacientes^[57-60].

Os métodos mecânicos, quando realizados de forma eficiente, conseguem promover a prevenção da doença periodontal^[10], porém dependendo das características do paciente, alguns autores consideram pertinente a realização do controle químico da placa como coadjuvante ao controle mecânico, podendo até mesmo substituí-lo por curtos períodos de tempo se necessário^[9].

Outro fator que deve ser levado em consideração é a relação entre os hábitos de higiene oral e hábitos alimentares. Em indivíduos que mantêm uma adequada higiene oral e fazem uso comedido da sacarose, a microbiota predominante pode ser menos patogênica, podendo o indivíduo possuir placa, e ainda assim ter saúde. Todavia, quando a remoção mecânica da placa é deficiente e a utilização da sacarose é freqüente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e a placa se torna mais virulenta, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro (cáries) quanto de tecido mole (doenças periodontais).

A literatura especializada nacional e internacional relata que a quantidade de placa bacteriana são maiores nos pacientes especiais que na média da população: Makowiecky (1985), Riscart et al. (1989), Matheus (1992), Nunn (1993), Gupta et al. (1993), Whyman et al. (1995), Martins et al. (1995) e Schmidt (1995).

Esta realidade atinge cerca de 10% da população brasileira, hoje representada por cerca de 15 milhões de deficientes, em sua maioria assistidos esporadicamente, em caráter de benemerência. Tomitaa et al (1999) realizaram estudo com pacientes especiais e obtiveram observaram que somente 40,0% das crianças escovam os dentes sem o auxílio de outros; já em 40,0% dos casos, a escovação é feita pela mãe, pai ou responsável; e, em 20,0%, é feita pelas professoras. Estes dados revelam a dificuldade da higiene oral entre esses pacientes e a necessidade do monitoramento constante da higienização bucal. Outra conclusão é a importância do controle da dieta para uma melhora no quadro de saúde bucal de crianças especiais^[61].

Pacientes portadores de doenças sistêmicas, paralisia cerebral, pacientes hospitalizados apresentam situações específicas que determinam a necessidade de complementação dos métodos tradicionais de escovação mecânica de placa. Durante o encontro Europeu internacional de periodontia em 1994 concluiu que o uso de agentes químicos para o controle do biofilme dental é necessário particularmente

quando os métodos mecânicos de limpeza dos dentes não são possíveis ou são inadequados e insuficientes^[6].

Logo, a chave principal para a prevenção das doenças periodontais, principalmente nestes pacientes, é o controle do biofilme oral que pode ser mecânico, químico ou a associação de ambos. Este controle é procedimento básico para a prática odontológica, e sem ele a saúde bucal não pode ser alcançada e nem preservada, e os resultados terapêuticos não podem ser assegurados^[9].

3.4 Doença Periodontal Inflamatória Experimental

O objetivo fundamental de qualquer pesquisa científica na área de saúde médica é promover caminhos e informações para prevenir e curar as doenças humanas. Para cumprir estes objetivos os pesquisadores devem selecionar e adaptar modelos e metodologias relevantes capazes de fornecer conhecimentos e problemas específicos que confrontem os fatos. Existem três categorias de modelos de pesquisa biológicos: sistemas laboratoriais, experimentos animais e estudos humanos. Cada um destes métodos é indispensável para o processo da pesquisa científica. Os experimentos iniciais são usualmente laboratoriais. Hipóteses são formuladas para depois serem testadas em animais. Apesar de estes estudos promoverem informações valiosas para serem extrapoladas para os estudos no homem, a sua relevância para a situação real humana é muitas vezes incerta. Logo, antes da indicação de aplicação clínica, o conhecimento adquirido nos modelos animais devem ser repetidos e verificados para depois serem averiguados em experimentos controlados no homem^[62].

Modelos animais têm sido utilizados para avaliar a patogênese da doença periodontal e diversas modalidades de tratamento. É importante escolher um modelo animal laboratorial que tenha características semelhantes com a anatomia e a doença em humanos. Essas características, entre animais e humanos, apresentam diferentes variações dependendo do estágio de desenvolvimento da doença.

A destruição inflamatória do periodonto pode ser espontânea ou induzida experimentalmente em quase todas as espécies de mamíferos. Os animais mais utilizados para estudos em periodontia são primatas não-humanos, cães e roedores. Os macacos foram extensamente utilizados para pesquisas em periodontia para investigação da patogênese da doença, uso de implantes dentais, regeneração óssea guiada e outros procedimentos cirúrgicos. Estes animais apresentam ocorrência natural, mas tardia da doença periodontal em suas vidas e geralmente com lesões

assimétricas. As características histológicas e imunológicas são muito próximas da condição humana. As desvantagens encontradas neste modelo experimental são: o alto custo de aquisição e manutenção, difícil manipulação e possível transmissão de doenças infecciosas^[63].

Os cães são animais que apresentam susceptibilidade natural para a doença periodontal, particularmente beagles, são utilizados em estudos sobre a progressão da doença periodontal, regeneração óssea guiada, reparação tecidual e implantes dentais. Limitações encontradas neste modelo experimental são a grande variabilidade inter-animal, custo alto de aquisição e manutenção, número limitado de defeitos ósseos e rápida reabsorção óssea alveolar^[64].

Em roedores a doença periodontal pode ser induzida por meio de manipulação dietética, inoculação experimental de microorganismos periodontopatogênicos ou produtos e por meio da colocação de ligaduras ao redor da região cervical do molar do animal, geralmente o primeiro molar superior e inferior, que funcionam como sítio de colonização. A anatomia da junção dento-gengival de rato e hamsters é muito semelhante com àquela descrita no homem tornando o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nesses animais uma ferramenta bastante válida^[65].

A doença periodontal induzida pela modificação dos hábitos alimentares do animal consiste na administração de uma dieta rica em sacarose. Ao se comparar hamsters alimentados com dieta convencional e com dieta hipercalórica, observa-se que ambos apresentam deposição de biofilme dental, porém nos animais alimentados com dieta rica em carboidratos ocorre a migração de infiltrado inflamatório de PMN's logo abaixo do epitélio gengival estendendo-se apicalmente em direção a crista óssea alveolar, onde se observou intensa atividade osteoclástica, somente mediante a dieta sacarolítica. Este desenvolvimento natural da doença periodontal inflamatória crônica pode ocorrer devido ao aumento da síntese de polissacarídeos extracelulares que por sua vez facilitam a adesão e a colonização de bacteriana na superfície dentária e/ou devido a um aumento de fagocitose bacteriana por PMNs, com conseqüente liberação de enzimas lisossomais^[66].

O hamster sírio dourado é usado para indução de doença periodontal inflamatória devido a grande formação de placa dental, que se desenvolve rapidamente após um simples regime dietário. Esses animais apresentam a vantagem de serem de fácil aquisição e manipulação, baixo custo e pode ser mantido em um número grande de animais em pequenos espaços. O período de gestação é de 15 dias, menor que o de

outros animais de laboratório, com 5 a 6 filhotes. Apresenta 3 molares em cada quadrante similares aos dentes humanos^[18].

O hamster foi primeiramente utilizado em 1942 por Arnold em pesquisa de cárie dental. Em 1946, Keyes, descreveu lesões periodontais nestes animais. Em 1948, Mitchell, descreveu as características macroscópicas e microscópicas do periodonto normal do hamster e confirmou que uma dieta rica em carboidratos (15% sucrose, 20% flocos de milho, 30% farinha, 30% de leite em pó, 4% de alfalfa e 1% de NaCl) promove um acúmulo de debris gengivais identificável ao olho. A destruição periodontal ocorreu em associação a esta dieta e mostrou-se bem diferente em animais que estavam sob dieta convencional.

King & Gimson^[67] verificaram a relação entre a dieta e o acúmulo de cálculo dental ao redor dos dentes com destruição periodontal resultante. Os fatores sistêmicos também foram estudados: relação entre o hipotireoidismo induzido com aumento da doença periodontal; deficiência de cálcio sistêmico; efeito do tamanho da partícula da ração na impactação alimentar. O efeito antimicrobiano de substâncias também foi estudado: a combinação de fosfato de amônia dibásico e uréia e escovação sob dieta cariogênica foi associado a baixos índices de doença periodontal; ação da bacitracinas, estreptomycinas e aureomicinas, e clorexidinas também são citadas pela literatura. Rushton^[24] descreveu a progressão da perda da inserção epitelial ao longo das raízes de molares de hamsters. Ele acredita que esta perda está associada ao aumento da idade e depende unicamente da presença da placa bacteriana na margem gengival.

Para animais novos ou velhos, uma dieta rica em carboidratos promove o aumento do peso e após aproximadamente 100 dias resulta em acúmulo gengival e destruição periodontal. O acúmulo subgengival aparece como uma linha branca ao redor do dente. Inflamação gengival não é uma característica proeminente. A recessão gengival, perda óssea, reabsorção das cristas interproximais, bolsas periodontais repletas de material basofílico e perda dental são características observadas. A região mais afetada pelo aumento dos debris gengivais é a região lingual e mesial do M1 e M2 inferiores. O escore das fêmeas tendem a ser maiores que o dos machos mas não é estatisticamente relevante^[16-22].

A microbiota oral em hamsters apresenta predominância de Gram positivos bastonetes (65%), principalmente *Actinomyces israelii*, *viscosus* e *Propionibacterium*; *Coccus* Gram negativos (30%), *Coccus* Gram positivos (4%) e Gram negativo rods (1%) como *Fusobacterium* e *Bacterioides* incluindo bactérias pigmentadas de

preto^[16].. Logo, a produção de polissacarídeos extracelulares pelas diferentes espécies existentes na microflora oral de hamsters, estimulada pela presença da sacarose na dieta, tem como efeito o acúmulo de células bacterianas, aumento do volume de biofilme^[11] e estímulo da reação inflamatória determinando destruição periodontal, sendo assim, portanto, modelo experimental para a indução da doença periodontal e avaliação de possíveis efeitos terapêuticos de substâncias químicas sobre o periodonto animal.

3.5 A Terapia Fotodinâmica (PDT)

A terapia fotodinâmica vem do inglês *Photodynamic Therapy* e é uma modalidade terapêutica onde é utilizada a associação de um agente fotossensibilizador a uma fonte de luz ressonante e oxigênio obtendo assim um efeito bactericida com morte celular bacteriana^[33].

Há mais de 4.000 anos, os egípcios deram início a essa terapia, através da ingestão de plantas contendo psoralenos, e exposição à luz solar, para tratar doenças como o vitiligo. Entretanto, a técnica começou a ser empregada cientificamente apenas em 1900, quando Raab descreveu a ação do corante acridina e luz solar sobre *Paramecia*^[68], demonstrando que este organismo unicelular pode morrer sob essas condições. Em 1903, Trappeiner utilizou a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para tratamento de câncer de pele^[69]. Diversos autores^[70, 71] pesquisaram a ação da PDT em tumores determinando assim a terapia fotodinâmica como terapia clínica para câncer.

A terapia tem seu início quando a molécula do fotossensibilizador absorve a luz que irradia e sai do seu estado fundamental migrando para um estado mais energético, porém menos estável, chamado de estado singleto. Devido a grande estabilidade deste nível de energia, a molécula tem um tempo de vida muito curto e tende a voltar para um nível de energia mais baixo ou mesmo para seu estado inicial. Nessa transição, o excesso de energia pode ser transferido ao substrato de várias formas: por meio de fluorescência, onde o fotossensibilizador emite energia em forma de fótons, por conversão interna ou também pode passar a um nível de energia intermediário. Este nível intermediário chamado de estado tripleto, entre o estado fundamental e o singleto, apresenta um tempo de vida um pouco mais longo. Este decaimento energético pode excitar outros componentes do meio, interagindo bem com a molécula de oxigênio e gerando rapidamente formas tóxicas à célula, como

peróxidos, radicais hidroxila, íons superóxidos e oxigênio singlete, este último sendo apontado como maior causador de dano celular^[28, 72].

Muitos estudos realizados relatam o efeito bactericida da terapia fotodinâmica em microorganismos odontopatogênicos “*in vitro*”. Estes trabalhos sugerem a possibilidade da PDT tornar-se uma terapia alternativa para infecções microbianas localizadas. Okamoto *et al* (1992) investigaram *in vitro*, o efeito antimicrobiano do laser de He-Ne associado a diversos corantes sobre microorganismos patogênicos. Os autores testaram o efeito antimicrobiano do laser de He-Ne quando combinado com dez tipos de corantes (azuis, roxos e verdes) em espectroscopia de absorção atômica, espectroscopia ultravioleta e zona de inibição de crescimento em placas de cultura. Verificaram-se neste estudo os efeitos letais sobre os microorganismos eram efetivos, apenas quando corantes específicos foram utilizados^[29].

Dobson e Wilson (1992), em um estudo *in vitro*, analisaram a redução bacteriana por fotossensibilização de biofilme formado pelas espécies *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actynomicetemcomitans* por um laser de baixa intensidade. Utilizando sobre amostras de biofilme em placa de petri, uma associação de diversos corantes e um laser de He-Ne de 7,3 mW de potência, os autores concluíram que os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram eficazes em eliminar as quatro espécies de bactérias e os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematorporfirina HCl e hematoporfirina ester somente foram efetivos em sensibilizar alguns microorganismos. Os autores sugerem que, baseados em seus resultados, que a técnica da terapia fotodinâmica pode ser efetiva em eliminar bactérias periodontopatogênicas da placa bacteriana^[30].

Wilson *et al* (1992) testaram *in vitro*, vinte e sete compostos associados a um laser de He-Ne de 7,5 mW de potência na capacidade de sensibilizar e eliminar as bactérias *A. actynomicetemcomitans*, *S. sanguis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. Os corantes azul de toluidina, azul de metileno e cloreto azul B nas concentrações de 0,005% foram efetivos contra as quatro espécies de bactérias, quando associados a um tempo de exposição de apenas 30 segundos.

Wilson *et al* (1995) determinaram, em um estudo *in vivo*, se as bactérias da placa supragengival poderiam ser eliminadas por um laser em baixa intensidade associado a um fotossensibilizante. As amostras de placa bacteriana obtidas de dez voluntários, foram tratadas com corante azul de toluidina e ftalocianina dissulfonada de alumínio e então expostas a um laser de He-Ne ou ArGaAl respectivamente. Após a irradiação, houve redução substancial das bactérias anaeróbias assim como dos

Streptococcus e *Actinomyces* viáveis. Segundo os autores, a combinação de He-Ne e TBO se mostrou mais eficiente que a combinação de AsGaAl e AlPoS₂ na redução de bactérias quando usadas as energias de 1,31J^[32].

Soukos *et al* (1996) avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica, *in vitro*, da radiação laser vermelha e do corante azul de toluidina sobre queratinócitos orais humanos, fibroblastos e cultura de *S. sanguis*. O objetivo do trabalho era avaliar se a PDT poderia ser usada no tratamento da doença periodontal, eliminando as bactérias causadoras da mesma, sem provocar danos aos tecidos adjacentes. Os autores concluíram que o uso de baixas concentrações de corante e do laser provocava a morte bacteriana e não reduzia viabilidade celular^[73].

Wainwright (1998) revisando a literatura apresentou os mecanismos de ação da terapia fotodinâmica sobre microorganismos, os diversos corantes em uso, perspectivas futuras da técnica e propôs o termo *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy* (PACT) ou terapia fotodinâmica e quimioterapia antimicrobiana^[33].

König *et al* (2000) analisaram a terapia fotodinâmica com laser vermelho, sem uso externo de corantes, contra determinadas bactérias capazes de produzir porfirinas endógenas. Os autores preconizaram um novo método de redução bacteriana, baseado na fotossensibilização das porfirinas endógenas por um laser de He-Ne de 60 mW. As bactérias utilizadas foram: *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces odontolyticus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e como controle a *Streptococcus mutans*. Os resultados mostram redução de até 50% em algumas espécies produtoras de endoporfirinas, pronunciando um efeito sobre a bactéria pigmentada e nenhum efeito sobre o *S. mutans*, que não é capaz de produzir porfirinas endógenas e nem apresenta pigmentação. Os autores, baseando-se nos resultados, preconizaram esta técnica como método terapêutico contra bactérias produtoras de endoporfirinas. Os autores nos lembram ainda do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos torna cada vez mais importante a busca de novas formas de tratamento de infecções bacterianas e que a terapia fotodinâmica tem se mostrado uma interessante alternativa na prevenção de carie e doença periodontal^[74].

Kömerik *et al* (2002) avaliaram o efeito do azul de toluidina mediado pela terapia fotodinâmica na mucosa oral de ratos e a biodistribuição do fotossensibilizador no tecido. Uma solução de azul de toluidina foi aplicada na mucosa oral em um dos lados da cavidade oral e esta foi exposta à luz (633 nm) e o lado oposto foi considerado controle, onde não houve exposição. Foram avaliadas várias concentrações do corante (25, 50 e 200 µg/ml) e dosimetria (110, 170 e 340 J/cm²).

Este estudo sugere que o azul de toluidina (nas concentrações e doses testadas) pode ser uma técnica antimicrobiana segura e apropriada para as infecções orais sem dano para os tecidos adjacentes^[75].

Chan e Lai (2003) analisaram o efeito bactericida de diferentes comprimentos de onda nas bactérias periodontopatogênicas na terapia fotodinâmica onde culturas das bactérias *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermédia* e *S. sanguis* foram expostas ao laser He-Ne (632,8 nm – 30 mW), laser de diodo (655 nm – 100mW) e laser de diodo (830 nm – 100 mw) na presença e na ausência (controle) do corante azul de metileno como fotossensibilizador. Os melhores resultados foram conseguidos com a exposição ao corante e ao laser de diodo de 655 nm com dose de 21,2 J/cm² no tempo de 60 segundos. Nesta condição, houve redução bacteriana de aproximadamente 95% de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*, 99-100% de *P. gingivalis* e *P. intermédia* e 100% de *S. sanguis*. Os resultados demonstraram a importância do comprimento de onda ótimo e dose em combinação com um corante apropriado na terapia fotodinâmica. Concluíram que esta técnica pode ser importante como coadjuvante na raspagem e alisamento radicular para a prevenção da recolonização em lesões subgingivais por microorganismos periodontopatogênicos^[36].

Pfitzner et al (2004) avaliaram a PDT com uma nova terapia para eliminar bactérias periodontopatogênicas. Para realizar a PDT foram utilizados os corantes chlorina e6, BLC 1010, e BLC 1014 na concentração de 10µM. Os resultados mostraram melhores resultados para os corantes chlorina e6 e BLC 1010 que foram capazes de induzir zonas de inibição nas placas de agar. Sugere-se que a PDT é eficiente para suprimir bactérias periodontopatogênicas^[35].

Prates et al (2007) investigou a capacidade do fotossensibilizante verde malaquita associado a um laser vermelho em eliminar a bactéria periodontopatogênicas, *A.actinomycetemcomitans* (*A.a*), e investigar a foto degradação do corante após a PDT através de espectroscopia de absorção óptica. Meios de cultura bacteriana (*A.a*) foram irradiados com 30 mW de potência na presença ou na ausência do fotossensibilizante. A concentração utilizada foi de 0,01% w-v. O tempo de pré-irradiação para o grupo com culturas em campo escuro foi cinco minutos. Na presença do corante, dois tempos de pré irradiação foram analisados, três (5,4 J/cm²) e cinco minutos (9 J/cm²). .As amostras foram diluídas para realizar a contagem de unidade formadoras de colônias. Foram obtidos os espectros de absorção dos grupos estudados. Diferenças significantes foram observadas entre as

duas doses empregadas neste estudo. O uso do laser e do corante isoladamente não foram capazes de eliminar o microorganismo. A absorção óptica mostrou que o verde malaquita é foto degradado após a irradiação. Estes resultados demonstram que o *A.a* pode ser foto eliminado pela associação do laser vermelho e o verde malaquita e que o corante é foto degradado após a irradiação^[28].

Recentemente, alguns autores avaliaram a ação da terapia fotodinâmica na indução de infecções orais “*in vivo*”. Foi observada a redução de patógenos do biofilme dental e peri-implantar concluindo-se, portanto, que a terapia fotodinâmica é um tratamento não invasivo e que poderá ser utilizada complementando o tratamento convencional.

Dörtbudak (2001) avaliaram a descontaminação de implantes no tratamento da periimplantite. A periimplantite é considerada como sendo um processo multifatorial que envolve a contaminação bacteriana nas superfícies de implantes. Os autores estudaram, *in vivo*, em 15 pacientes o uso do laser de diodo (690 nm) associado ao corante azul de toluidina (0,1%) em implantes que apresentavam sinais clínicos e radiográficos de periimplantite, através da avaliação microbiológica das culturas coletadas antes, após o uso do corante e após a aplicação do laser, das bactérias *P. gingivalis*, *P. intermédia* e *A. actinomycetemcomitans*. Os autores concluíram que a associação do corante e do laser resultou em significativa redução bacteriana nas três espécies pesquisadas, sendo que em nenhuma das espécies houve total eliminação da cultura bacteriana^[76].

Ovchinnikov e Tuchin (2001) estudaram em situações pré-clínicas o uso da PDT em microorganismos da cavidade oral, com capacidade de gerar lesões infecciosas. Os autores concluíram que nos parâmetros utilizados (He-Ne 32mw) neste estudo, a concentração de 0,1% do corante de azul de metileno foi a concentração que apresentou os melhores resultados sem que esta concentração fosse tóxica para as bactérias ou para as células gengivais dos pacientes. Os autores preconizam, também o tempo de pré-irradiação de três minutos, pois, segundo eles, este tempo é clinicamente aceitável para o paciente e para o clínico e que tempo superiores a este poderiam levar a uma penetração do corante por tecidos saudáveis o que resultaria em danos aos tecidos sadios do paciente^[77].

Komerik *et al.* (2003) apresentou o tratamento preventivo da periodontite induzida com *P. gingivalis* em molares de ratos. Após a inoculação das bactérias, foi realizada a terapia fotodinâmica com azul de toluidina e um laser em $\lambda = 630$ nm e E= 48 J entregue por uma fibra óptica acoplada a um difusor. Foi determinado o número

de *P. gingivalis* após o tratamento, assim como os efeitos da terapia na estrutura periodontal através de exames histológicos e microbiológicos. Os resultados apresentaram uma menor perda óssea nas regiões onde foram realizadas a terapia fotodinâmica e ausência de inflamação. Concluíram que esta terapia pode ser utilizada na prevenção antimicrobiana da periodontite^[41].

Shibli *et al* (2003) avaliou o efeito antimicrobiano no tratamento de peri-implantite induzida em cães através de avaliação microbiológica das espécies *P. intermedia/nigrescens*, *Fusobacterium spp* e *Streptococcus* beta hemolítico. A indução da doença foi realizada através de ligadura por dois meses. Após a remoção da ligadura, foi instituído controle de placa através de aplicação tópica diária de clorexidina a 0,12% . Subsequentemente, retalhos mucoperiosteos foram realizados para a raspagem da superfície do implante. Amostras microbiológicas foram obtidas com pontas de papel absorvente antes e depois da terapia fotodinâmica com uma associação de 100 µg/mL de azul de toluidina exposta por 80 segundos a um laser de diodo de GaAlAs de 685 nm com 50 mW de potência. Pode-se concluir que a fotossensibilização letal resultou em redução da contagem bacteriana e a completa eliminação de algumas espécies bacterianas foi obtida^[78].

Meisel e Kocher (2004), em revisão do estado da arte na terapia fotodinâmica para doenças periodontais, concluíram que mesmo ainda em estágios experimentais, a PDT poderá ser um coadjuvante importante às técnicas convencionais no controle bacteriano das doenças periodontais e que estudos clínicos são necessários para confirmar a eficácia deste procedimento^[37].

Hayek *et al* (2005) comparou os efeitos da terapia fotodinâmica às técnicas convencionais de redução microbiana em peri-implantite induzida por ligadura em cães. Foram extraídos dezoito terceiros pré-molares de cães labradores e imediatamente após implantes foram submergidos. Após o processo de ósseointegração, a peri-implantite foi induzida através de ligaduras durante o período de quatro meses. Após este período, as ligaduras foram removidas e os animais permaneceram por mais quatro meses para permitir a formação natural de biofilme dental. Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos. O grupo controle recebeu tratamento convencional através de retalho mucoperiosteos para raspagem da superfície dos implantes associado à irrigação com solução de clorexidina. No segundo grupo, a PDT foi realizada após a cirurgia de retalho mucoperiosteos. Dentro da bolsa peri-implantar foi aplicada uma pasta do fotossensibilizador azuleno irradiada com laser vermelho 660nm com potência de 40 mW, E=7,2 J por 3 minutos. Foram

coletadas amostras microbiológicas antes e imediatamente após o tratamento. Foi removido um implante antes de realizado o tratamento para validar a contaminação. Os resultados deste estudo demonstraram que em ambos os grupos houve redução de patógenos do biofilme peri-implantar. Após o tratamento não foi encontrada diferenças significantes entre os grupos. Conclui-se, portanto, que a terapia fotodinâmica é um tratamento não invasivo e pode ser utilizado para reduzir a peri-implantite^[38].

Sigusch *et al* (2005) estudaram a eficácia da terapia fotodinâmica nos sinais inflamatórios e em duas espécies periodontopatogênicas em cães beagle. Foram testados dois fotossensibilizadores chlorine e6 e BLC1010. Os animais foram infectados com *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) em áreas subgingivais. Foram observados os sinais de inflamação através dos índices gengivais. A terapia fotodinâmica foi realizada através de um laser de diodo com 662 nm e 0,5 W de potência e os fotossensibilizadores acima. A PDT causou uma redução significativa nos sinais clínicos de inflamação e vermelhidão comparada ao grupo controle. Este estudo demonstrou que a terapia fotodinâmica apresenta vantagens para o controle da doença periodontal^[40].

Almeida *et al* (2007) avaliou o efeito da terapia fotodinâmica na evolução da doença periodontal induzida em ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos e foram colocadas ligaduras ao redor dos primeiros molares. O grupo PDT foi tratado com fotossensibilizador azul de metileno a 100 µg/ml e irradiado com laser de baixa intensidade com dose de 4,5J/cm². Os animais foram sacrificados 5, 15 e 30 dias após o tratamento e avaliados histologicamente e radiograficamente. O grupo PDT apresentou menor perda óssea comparada ao grupo controle nos dias 5 e 15. Não houve diferença estatística no dia 30. Após 15 dias, os resultados histológicos mostraram diferença estatística na extensão da reação inflamatória no tecido gengival. Conclui-se, portanto, que a terapia fotodinâmica pode reduzir a destruição óssea periodontal^[42].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo Experimental Animal

Foram utilizados 29 hamsters sírios dourados (*Golden syrian hamster*), fêmeas, com 3 meses de idade e massa corpórea aproximada de 150 g, mantidas no biotério do IPEN – CNEN/SP. O experimento foi previamente autorizado pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). A figura 1 ilustra o período experimental.

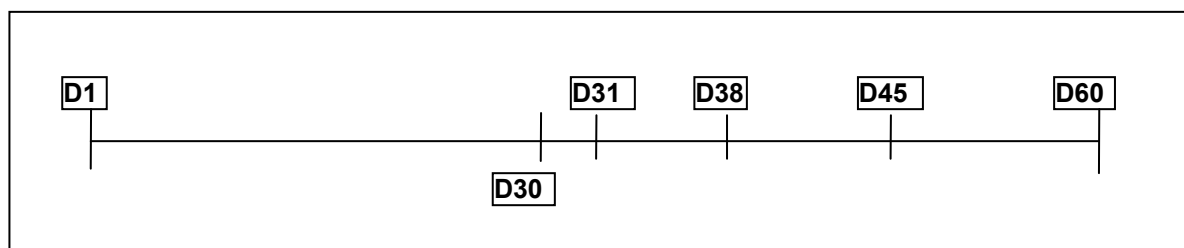


Figura 1 – Tempo experimental de 60 dias. D1 – Início da indução da dieta; D30- tratamento; D31- Sacrifício após 1 dia de tratamento realizado ; D38 – Sacrifício após 7 dias do tratamento realizado; D45 – Sacrifício após 15 dias do tratamento realizado; D60- Sacrifício após 30 dias do tratamento realizado.

No dia 1, dois animais foram sacrificados em câmara de CO₂ para a observação das características histológicas do periodonto na condição inicial do estudo. Estes animais não receberam dieta e não foram submetidos a nenhum tratamento.

Para a indução de doença periodontal, vinte e sete animais receberam dieta rica em carboidratos adaptada de Keyes & Jordan (1964)^[11] e água bi-deionizada *ad libitum* por um período de 60 dias. Os animais foram mantidos em mini-isoladores individuais em um regime 12h/12h de claro e escuro. A dieta consistiu em (quadro 1):

Composição Dieta 2000	Porcentagem
<i>Açúcar</i>	57%
<i>Leite em Pó</i>	28%
<i>Farinha de trigo</i>	6%
<i>Fermento em pó</i>	4%
<i>Alfafa</i>	3%
<i>NaCl</i>	2%

Quadro 1 – Dieta 2000 adaptada de Keyes & Jordan ^[11]

Esta dieta foi preconizada por Keyes & Jordan (1964). Segundo os autores, os animais adultos mantidos em dieta rica de carboidratos desenvolvem doença periodontal espontânea por possuírem um agente etiológico natural capaz de induzir a doença periodontal em condições favoráveis e a doença ocorre enquanto os animais forem alimentados com a dieta específica. Observou-se placa bacteriana, recessão gengival e perda óssea alveolar. Fêmeas são mais susceptíveis a doença periodontal embora nem sempre houve uma diferença estatística significativa. Outros autores realizaram experimentos utilizando este modelo experimental associado a diversos tratamentos para o controle e prevenção da doença periodontal. ^[11-26]

Estudos mostram que o início do processo inflamatório gengival em hamster sírio dourado acomete principalmente a região de primeiro e segundo molares inferiores e é observado após 30 dias da indução da doença. Após este período, evolui com o comprometimento dos tecidos de suporte, caracterizando o início da periodontite, em torno de 60 dias. A partir daí a doença evolui para um quadro de periodontite avançada com destruição do ligamento periodontal e perda óssea alveolar e estabiliza após 4- 6 meses. ^[13, 17-20, 24]

No dia 30, três animais foram sacrificados para a observação das características histológicas após a indução da doença com a dieta. Vinte e quatro animais, então, foram separados aleatoriamente em três grupos, com um total de oito animais por grupo. A região avaliada foram os primeiros e segundos molares inferiores de ambos os hemiarcos mandibulares (n =16) (quadro 2).

GRUPOS	PROCEDIMENTOS
GRUPO 1	Controle (C) – ausência de tratamento
GRUPO 2	Remoção Mecânica de Placa (RM)
GRUPO 3	Terapia Fotodinâmica (PDT)

Quadro 2 – Divisão aleatória dos animais dos grupos de estudo.

Após a divisão dos grupos, os animais dos grupos 2 e 3 foram anestesiados com uma associação de 0,07mL\Kg de Copazine (Xilazina) e 0,28 mL\Kg de Vetanarcol (Quetamina) com técnica anestésica intraperitoneal.

No grupo 2, realizou-se então, a remoção mecânica de placa com auxílio de escova dental (Bitufo, Itupeva –SP Brasil). As cerdas foram posicionadas a 45 graus em relação aos molares inferiores e foram realizados 10 movimentos vibratórios em ambos os hemiarcos ^[79]. Tanto as faces vestibulares como as faces linguais receberam a técnica de escovação.

No grupo 3, onde se realizou a PDT, utilizou-se a associação do fotossensibilizador azul de metileno a 0,01% (m/V) (Chimiolux \ Hypofarma - BeloHorizonte – MG Brasil) a um laser com comprimento de onda de 660nm e potência de 40 mW (Twin Flex MMOptics São Carlos – SP Brasil). O fotossensibilizador foi aplicado nas superfícies dos molares com o auxílio de uma seringa descartável e deixado por um minuto (tempo de pré-irradiação (TPI), isto é, tempo que o corante interage com as bactérias). Após o TPI, a região foi irradiada por 2 minutos e a dose utilizada foi 24,5 J/cm². O quadro 3 resume o protocolo utilizado.

Procedimentos	Parâmetros
Corante	Azul de Metileno a 0,01%
Comprimento de Onda	$\lambda = 660\text{nm}$
Potência	$P = 40 \text{ mW}$
Dose	$D = 24,5 \text{ J/cm}^2$
Tempo de Pré-Irradiação	$t = 1 \text{ min}$
Tempo de Irradiação	$t = 2 \text{ min}$

Quadro 3 – Parâmetros utilizados no grupo PDT

Após 31, 38, 45 e 60 dias, dois animais de cada grupo (PDT, Controle e RM) foram sacrificados para avaliação da progressão da doença. A mandíbula foi removida cirurgicamente e fixada em formaldeído a 10%. As amostras seguiram, então, procedimento de rotina para preparação das lâminas histológicas. As amostras foram descalcificadas com concentrações decrescentes de EDTA por um período de 15 dias, sob agitação. Posteriormente, os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados em parafina e cortados no sentido méso-distal na espessura de 4 μm . As seções histológicas assim obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e observadas ao microscópio de luz (Leica, Alemanha). Todos os cortes foram realizados em triplicata.

A área escolhida para avaliação foi a papila dental entre os primeiros e segundos molares inferiores, e foi analisada a presença ou não de infiltrado inflamatório, congestão vascular, colônias bacterianas e osteoclastos no tecido epitelial e conjuntivo acima das fibras interdentais e perda óssea na crista alveolar. As lâminas foram observadas juntamente com um examinador calibrado, que descreveu os resultados conforme os escores relatados abaixo. Os escores foram tabelados conforme mostra o quadro 4 e foi feita a moda para obtenção da tendência para cada grupo.

Grau Escore	0	1	2	3
Processo Inflamatório	Ausência	Presença de: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Vasos congestos 	Presença de: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Vasos congestos ➤ Células inflamatórias ➤ Gengivite ➤ Inflamação supraepitelial 	Presença de: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Vasos congestos ➤ Células inflamatórias ➤ Inflamação subepitelial ➤ Início de perda óssea ➤ Periodontite
Biofilme	Ausência	Presença	-----	-----
Osteoclastos	Ausência	Presença de: <ul style="list-style-type: none"> ➤ 1 – 2 lacunas ➤ Osteoclastos 	Presença de: <ul style="list-style-type: none"> ➤ + de 2 lacunas ➤ Osteoclastos 	-----

Quadro 4: Classificação dos escores utilizados neste estudo.

O processo inflamatório Grau 2 caracteriza-se pela presença do processo inflamatório restrito ao tecido epitelial acima das fibras interdentais que se localiza logo acima da crista óssea alveolar com presença de osteoclastos.

O processo inflamatório Grau 3 caracteriza-se pela extensão do processo inflamatório ao tecido subepitelial com presença de rompimento das fibras interdentais e presença de reabsorção óssea alveolar.

5. RESULTADOS:

A **Figura 2** mostra uma fotomicrografia de periodonto de hamster obtida antes da indução da doença. Nota-se a ausência de infiltrado inflamatório, biofilme dental e osteoclastos na crista óssea alveolar, caracterizando um quadro de uma gengiva clinicamente saudável.

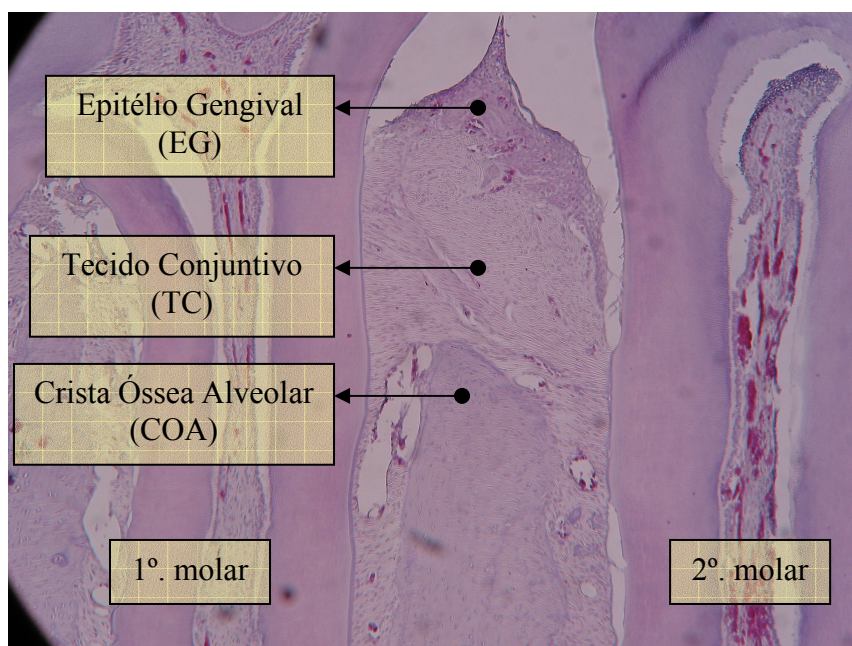


Figura 2 – Fotomicrografia de periodonto de hamster obtida antes da indução da doença periodontal. HEx100

A **Figura 3** mostra uma fotomicrografia obtida antes do tratamento, 30 dias após a indução. Das seis lâminas observadas (3 animais), predominou a presença de vasos congestionados no tecido conjuntivo bem como células inflamatórias migradas para o epitélio (escore 2); a presença de biofilme dental interdental (escore 1) e invasão bacteriana tecidual. Não foram observadas lacunas nem osteoclastos na crista óssea alveolar (escore 0). Estes achados indicam que há um processo inflamatório restrito à gengiva, caracterizando gengivite induzida por biofilme.

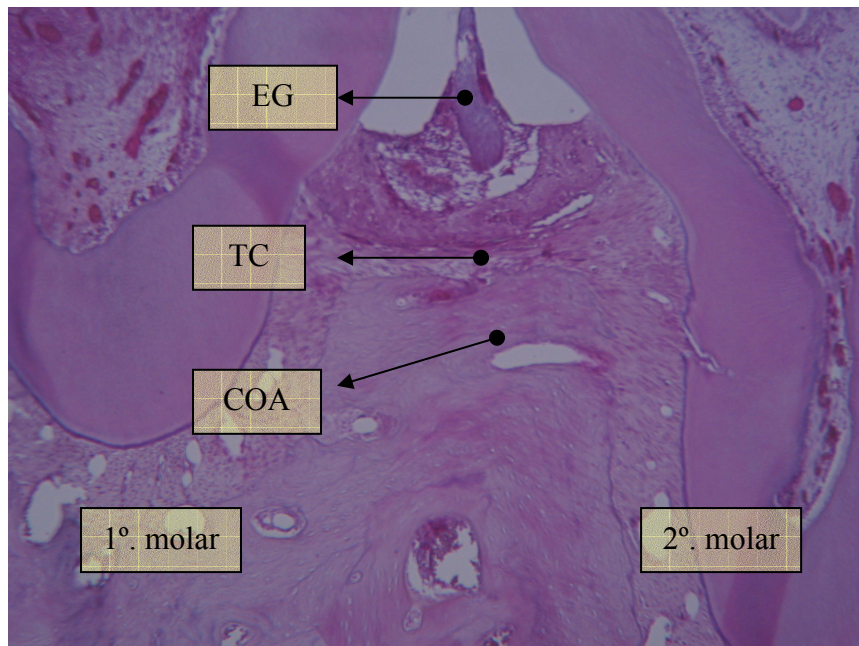


Figura 3 – Fotomicrografia de periodonto de hamster obtida antes do tratamento. HEx100.

As **Figuras 4A** , **4B** e **4C** representam o dia 31 do experimento após o tratamento realizado nos grupos. **Na Figura 4A** observa-se uma fotomicrografia do grupo PDT. Observa-se a redução do processo inflamatório e biofilme dental. Foi observada a presença de osteoclastos na crista óssea alveolar em duas amostras do grupo tratado. **Na Figura 4B** observa-se infiltrado inflamatório, biofilme dental e presença de osteoclastos. Esta figura representa a avaliação histológica do grupo tratado com remoção mecânica de placa. Nota-se que neste dia houve diferença entre os tratamentos propostos. O grupo controle, onde não foi realizado nenhum tratamento, pode ser observado na **Figura 4C**. Nota-se a manutenção do grau de inflamação e presença de biofilme e osteoclastos.

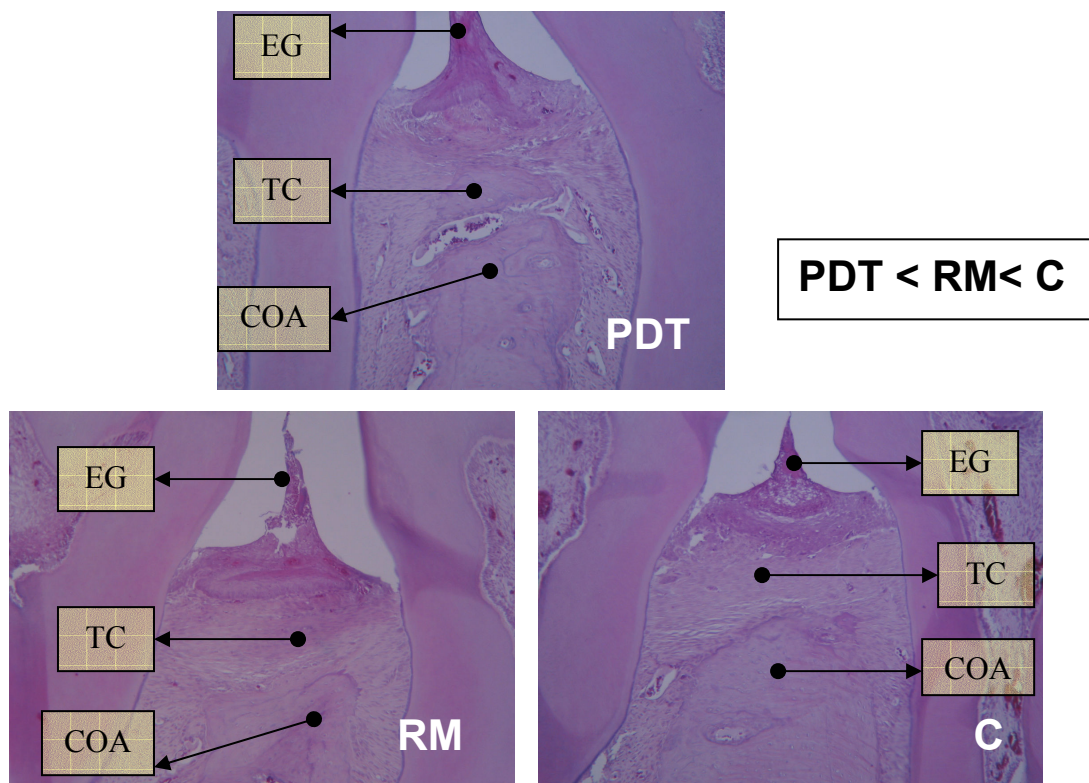


Figura 4: Fotomicrografia de periodonto de hamster 31 dias após indução da doença. Grupo PDT; Grupo RM; Grupo controle. HEx100.

Nas **Figuras 5A e 5B** observam-se as fotomicrografias dos grupos PDT e controle 7 dias após o tratamento realizado. Neste período, não foram observadas diferenças entre os grupos PDT, RM e controle, quanto ao processo inflamatório e presença de biofilme dental. Entretanto, o número de osteoclastos foi maior no grupo controle.

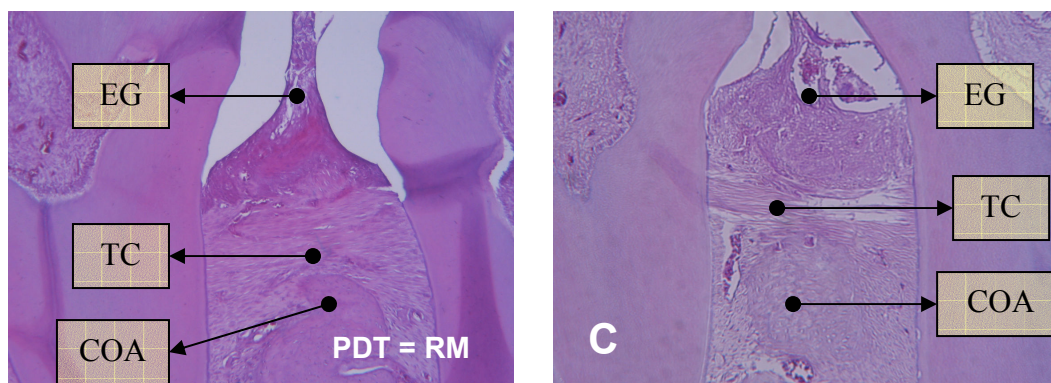


Figura 5- Fotomicrografia de periodonto de hamster 38 dias após indução da doença. Grupo PDT; Grupo RM; Grupo controle. HEx100.

A **Figura 6** mostra o processo inflamatório 15 dias após o tratamento, que anteriormente havia regredido para os grupos experimentais. No grupo PDT (fig. 6A), observa-se processo inflamatório menos intenso que o grupo controle (fig. 6B). Observa-se também a presença de biofilme dental nas regiões interdentais e invasão bacteriana no tecido epitelial para ambos os grupos. Há também o aumento da atividade osteoclástica no grupo controle. Neste período, o grupo controle não mostrou diferenças significativas comparado ao grupo RM.

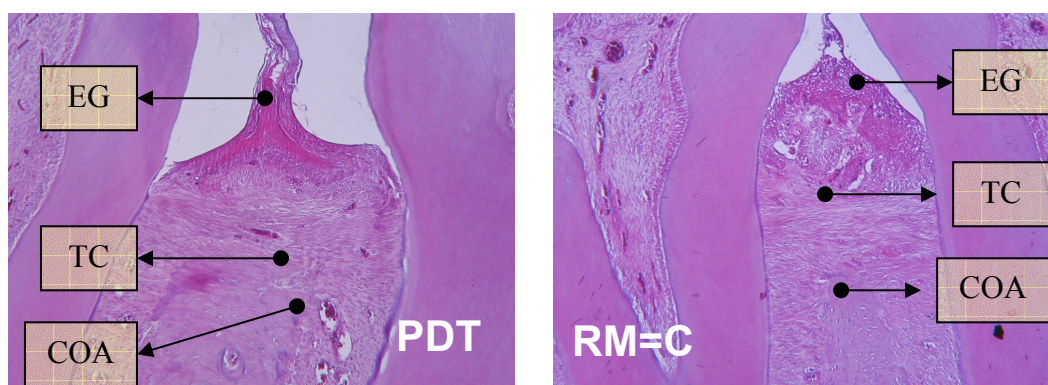


Figura 6 - Fotomicrografia de periodonto de hamster 45 dias após indução da doença. HEx100. Grupo PDT; Grupo RM; Grupo controle

A **Figura 7** mostra o processo inflamatório 30 dias após o tratamento, que anteriormente havia regredido para os grupos experimentais. Observa-se em todos os grupos (PDT, RM e C) processo inflamatório intenso com presença de biofilme dental nas regiões interdentais e desorganização e invasão bacteriana do tecido epitelial. Observa-se também um aumento considerável de vasos sanguíneos congestionados ao redor do processo alveolar caracterizando assim um processo intenso de reabsorção óssea. Na **Figura 8** observa-se a reabsorção da crista óssea alveolar. Após 60 dias o animal apresenta início de periodontite.

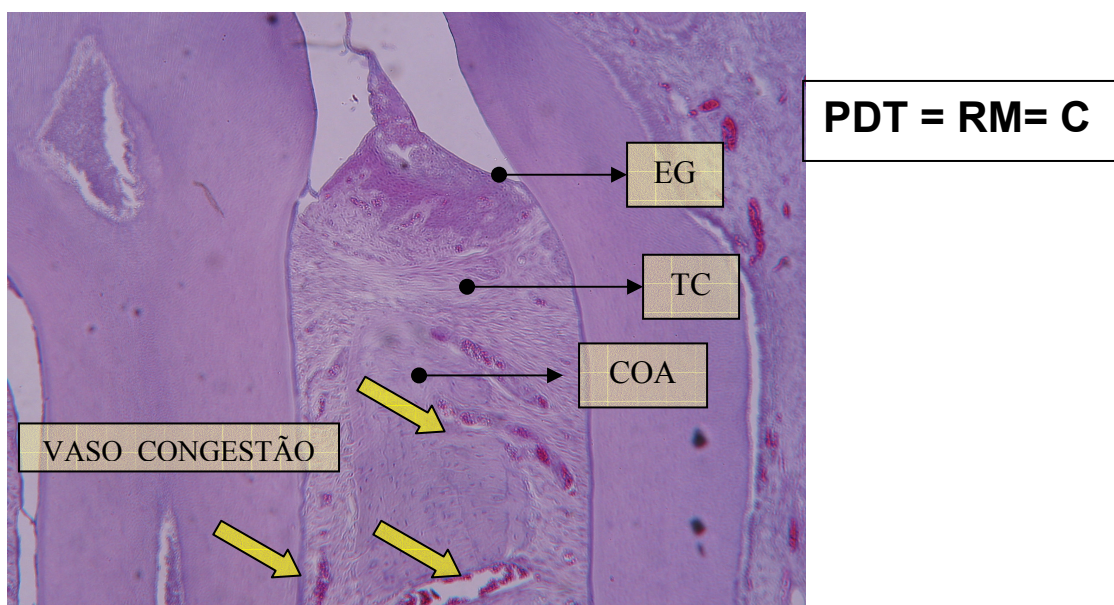


Figura 7 - Fotomicrografia de periodonto de hamster 60 dias após indução da doença. HEx100.

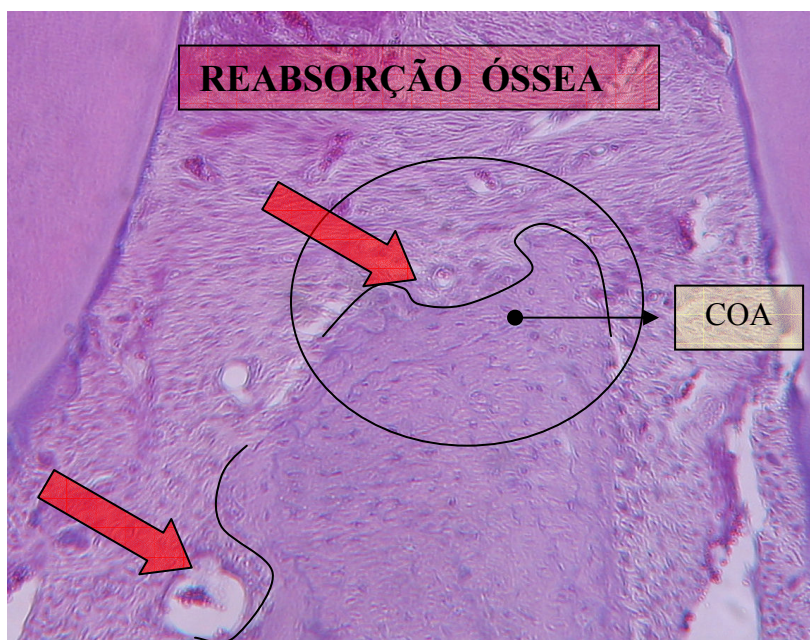


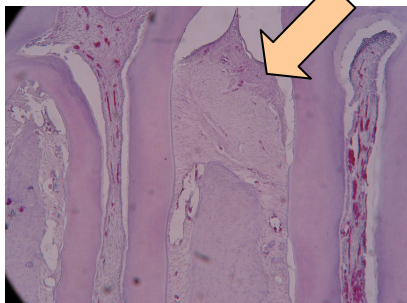
Figura 8 - Fotomicrografia ampliada – reabsorção em crista óssea alveolar após 60 dias após indução da doença. HEx100.

A prancha abaixo resume a evolução da indução da doença periodontal em cada

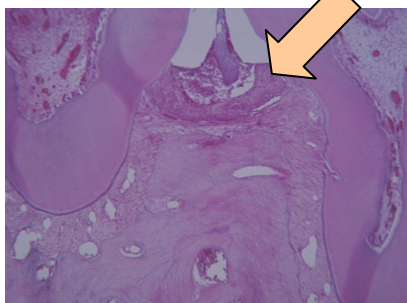
grupo estudado:

1. Grupo Controle (C)

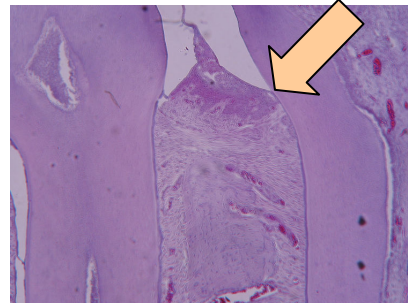
Antes da indução



Após 30 dias da indução

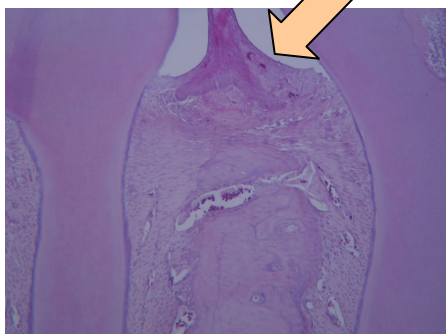


Após 60 dias da indução

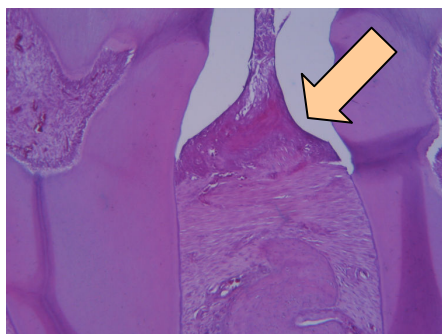


2. Grupo Terapia Fotodinâmica (PDT)

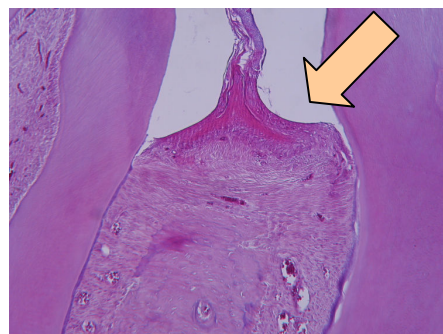
1 dia após (Dia 31)



7 dias após (Dia 38)

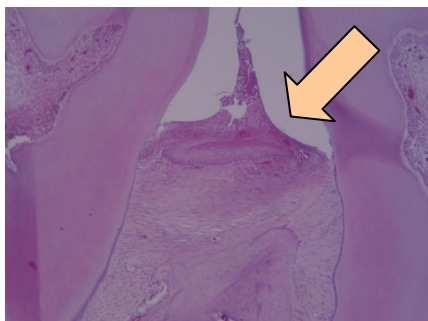


15 dias após (Dia 45)

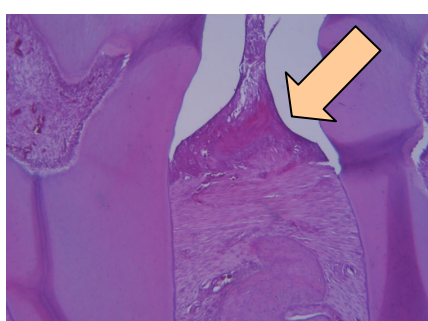


3. Grupo Remoção Mecânica (RM)

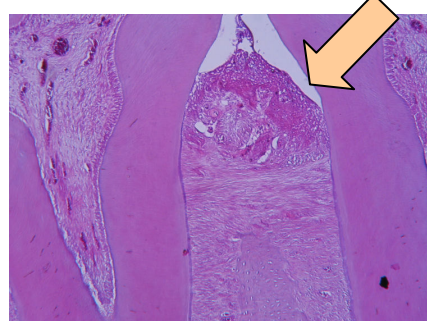
1 dia após (Dia 31)



7 dias após (Dia 38)



15 dias após (Dia 45)



O quadro 2 mostra a moda dos escores obtidos:

Resultados	Grupo PDT				Grupo controle				Grupo RM			
	Dias	31	38	45	60	31	38	45	60	31	38	45
Processo Inflamatório	1	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	3
Biofilme Dental	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Osteoclastos	0	0	0	2	2	2	2	2	0	0	1	2

Quadro 2 - Moda dos escores obtidos após análise dos grupos estudados. Quatro lâminas (duas do hemiarco esquerdo e duas do hemiarco direito) foram analisadas.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigou-se histologicamente os efeitos da terapia fotodinâmica e da remoção mecânica de placa supragengival da região de 1º e 2º molares mandibulares de hamsters sírios dourados. Todos os animais apresentaram biofilme dental aderido aos dentes em todos os momentos do experimento. Os animais do grupo controle, onde se manteve a dieta, apresentaram um nível de inflamação progressivo com o passar do tempo.

As amostras observadas previamente ao início do experimento apresentavam características de gengiva clinicamente saudável onde há presença de poucas células inflamatórias e o tecido apresenta-se organizado e sadio.

Após 30 dias de indução da dieta, as amostras dos animais previamente ao tratamento apresentaram processo inflamatório restrito ao tecido epitelial (acima das fibras interdentais) sem perda óssea alveolar caracterizando assim um quadro de gengivite.

No dia 31 observou-se no grupo controle as mesmas características de gengivite citadas acima. Constatou-se neste grupo a evolução da doença periodontal após 38 e 45 dias, onde se observou o aumento do grau de inflamação com presença de infiltrado inflamatório epitelial e subepitelial, invasão microbiana e desorganização tecidual. Após 60 dias, observou-se no grupo controle, além das características acima citadas, o aumento da atividade osteoclástica com o início da reabsorção óssea caracterizando assim periodontite inicial no animal. Estes resultados mostram que a metodologia utilizada induz a doença periodontal concordando com diversos trabalhos relatados na literatura através de dieta rica em carboidratos^[11-26]. Esta dieta promove o acúmulo de biofilme dental e promove a destruição do periodonto através da progressão do processo inflamatório gengival e aumento da atividade osteoclástica a qual resulta em processo inflamatório gengival e perda óssea inicial em um período de 60 dias. Comparando-se esta metodologia, de indução da doença periodontal através de uma dieta rica em carboidratos, aos outros modelos experimentais testados em roedores e cães (ligaduras e inoculação de bactérias periodontopatogênicas), observa-se, como principal diferença, a evolução natural da doença periodontal condizente com o desenvolvimento da doença em humanos. Esta metodologia nos oferece a possibilidade de testar em hamsters diversas terapêuticas indicadas para o controle da placa bacteriana^[12, 14, 19, 20, 25].

Nos animais tratados, observou-se nos grupos PDT e RM, um menor grau de

inflamação até o dia 45 após o tratamento comparado ao grupo controle, levando-se em consideração todas as características observadas: processo inflamatório, presença de biofilme dental e presença de osteoclastos. Todos apresentavam biofilme dental aderido à superfície dental. Após este período, tanto o grupo PDT quanto o grupo RM, apresentaram evolução do processo inflamatório.

O grupo RM apresentou menor grau de inflamação em relação ao grupo controle até o dia 45. No dia 60, os grupos RM e Controle apresentaram características iguais inflamatórias. Neste grupo utilizou-se para a remoção mecânica de placa, escova dental (Bitufo, Itupeva –SP Brasil). As cerdas foram posicionadas a 45 graus em relação aos molares inferiores e foram realizados 10 movimentos vibratórios em ambos os hemiarcos^[79]. Tanto as faces vestibulares como as faces linguais receberam a técnica de escovação. Esta técnica está de acordo com a técnica preconizada para o uso diário e foi adaptada para a sua indicação em roedores, como descrito em outros trabalhos^[26].

Sabe-se que o controle mecânico, através da escovação e outros procedimentos de remoção mecânica de placa é a melhor forma de prevenção das doenças periodontais, levando-se em consideração intervalos regulares das técnicas de higiene oral em uma rotina diária. A maioria das pessoas adota algum método de higiene oral e a escovação é a primeira escolha. O controle mecânico da placa bacteriana resulta em desorganização do biofilme dental e, conseqüentemente, redução do agente etiológico bacteriano e, portanto redução do processo inflamatório causado por esta injúria.

O grupo PDT apresentou regressão no quadro inflamatório sendo melhor que o grupo controle até o dia 60. Em relação ao grupo RM, o grupo PDT apresentou menor grau de inflamação no dia 31 (01 dia depois). Nos dias 38 e 45 mostrou-se igual ao grupo RM, ou seja, após 7 e 15 dias do tratamento. No dia 60, os 3 grupos mostravam características similares de inflamação.

Estes resultados estão de acordo com estudos científicos que revelam que a remoção mecânica ou ação química pode ser indicada no controle da placa bacteriana e prevenção da doença periodontal^[54, 80, 81]. Em animais, o controle da placa bacteriana supragengival e subgengival resulta em remissão do processo inflamatório periodontal comparado a animais não tratados^[63].

A terapia fotodinâmica tem se mostrado eficiente no combate a doença periodontal e também em outras áreas da odontologia, como por exemplo, na implantodontia e na endodontia. A literatura mostra em vários trabalhos a ação letal da

PDT em microorganismos patogênicos da cavidade oral.

Os resultados encontrados para o grupo PDT, onde se associou o fotossensibilizador azul de metileno (MB) ao laser vermelho, revelou o efeito da PDT na redução do processo inflamatório. A possível causa deste efeito antiinflamatório seria a ação antimicrobiana exercida no biofilme dental animal reduzindo assim o agente etiológico. A redução de bactérias periodontopatogênicas por ação da PDT é observada tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Alguns autores estudaram a ação da PDT na prevenção da doença periodontal induzida em roedores. Komerick *et al* (2003) ao induzirem a doença periodontal em ratos obtiveram como resultado a prevenção da perda óssea alveolar após 90 dias do tratamento da PDT comparado ao grupo controle. As amostras foram avaliadas através de avaliação radiográfica, microbiológica e histológica. Almeida *et al* (2007) avaliaram a ação da PDT no processo inflamatório periodontal induzido em roedores através de ligadura nos molares inferiores. Os grupos PDT, LILT, MB e controle foram comparados entre si. Os autores observaram diferença estatística na avaliação radiográfica, onde o grupo PDT apresentou redução da perda óssea alveolar nos dias 5 e 15 comparado aos outros grupos. Este fato provavelmente ocorreu devido à permanência do trauma causado pela ligadura no tecido gengival comparado ao trabalho presente, a indução da doença é mais rápida e invasiva.

Os parâmetros utilizados para realizar a terapia fotodinâmica neste experimento, como por exemplo, fotossensibilizador, concentração do fotossensibilizador, fonte de luz, dose, tempo de pré-irradiação e irradiação, foram escolhidos baseados na possibilidade da indicação da PDT na clínica odontológica e em trabalhos da literatura. Usacheva *et al* observaram que a associação MB a um laser de diodo de 665 nm, com parâmetros clínicos como, 1 minuto de irradiação e densidade de energia de $21,2\text{J}/\text{cm}^2$, 100mW de potência, reduz significativamente 95 a 100% dos microorganismos estudados. Tanto o equipamento laser quanto o corante estão disponíveis para os profissionais da área de odontologia. O fotossensibilizador azul de metileno, corante da família das fenotiazinas, é efetivo na inativação de microorganismos patogênicos incluindo vírus, bactérias e fungos ^[33]. A sua estrutura molecular e propriedades físico-químicas são similares ao do fotossensibilizador azul de toluidina (TB) e apresenta pico de absorção entre 620 e 670 nm. O MB associado ao laser de emissão vermelha apresenta ação fotoquímica em microorganismos gram positivos e negativos e tem capacidade de atravessar a membrana lipoprotéica bacteriana e não apresentar toxicidade às células do tecido humano na concentração

de 0,01% m/V ^[85]. A outra preocupação é determinar um tempo clínico compatível de aplicação na PDT em relação ao atendimento ao paciente no consultório odontológico. Além disso, os principais fatores para o sucesso da terapia fotodinâmica são a otimização do tipo e da dose do fotosensibilizador, a densidade de energia do laser e o intervalo de tempo para as aplicações.

Outra possível causa da ação antiinflamatória no periodonto de hamsters tratados com a PDT seria o efeito residual da ação da terapia com laser em baixa intensidade nos tecidos periodontais. Morioka et al (1989) ^[87], observaram o efeito inibitório do laser de He-Ne na deposição de placa dental em hamsters sírios dourados. A indução da formação de biofilme dental foi realizada através de dieta 2000 por um período de 8 semanas, semelhante à indução realizada neste trabalho. Após quatro semanas, o hemiarco esquerdo de cada animal foi irradiado com o laser com potência de 6mW durante 2 minutos diariamente por mais 4 semanas. Ao final do experimento, os autores observaram uma redução significativa de placa bacteriana nos animais tratados.

Sem dúvida alguma, para a pessoa motivada e bem instruída sobre a importância da higiene oral e que está disposta a despende tempo e esforço, os métodos mecânicos são eficientes no controle do biofilme dental. Por outro lado, a prática clínica e diversos grupos de estudo mostram que a habilidade técnica, o tempo e a perseverança necessários para a manutenção contínua podem exceder a capacidade da média das pessoas. Pacientes com deficiências mentais e físicas são incapazes de controlar tais técnicas de escovação adequadamente e este fato resulta em alto índice de doença periodontal. Duas formas de complementar essa escovação deficiente é através de métodos de controle mecânico profissional periódico e através do controle químico da placa bacteriana ^[70]. Pacientes com deficiências mentais e físicas são incapazes de controlar tais técnicas de escovação adequadamente e este fato resulta em alto índice de doença periodontal. Duas formas de complementar essa escovação deficiente é através de métodos de controle mecânico profissional periódico e através do controle químico da placa bacteriana ^[82].

Os resultados obtidos no grupo PDT são promissores para a utilização desta terapêutica na clínica odontológica principalmente para pacientes com necessidades especiais. No entanto, mais estudos são necessários para se instituir um protocolo adequado para pacientes na rotina de atendimento odontológico.

CONCLUSÃO

Dentro dos parâmetros estudados, pode-se concluir que:

- Comparando a terapia fotodinâmica à remoção mecânica de placa, observou-se redução do processo inflamatório e ausência de osteoclastos principalmente no dia 1 após o tratamento sendo melhor que o grupo RM e controle neste dia.
- Todas as amostras apresentaram presença de biofilme na ausência ou presença de tratamento.
- A terapia fotodinâmica apresentou redução da atividade osteoclástica até o dia 45 após o tratamento comparado aos outros grupos. O grupo controle manteve a presença de osteoclastos durante todo o período experimental. O grupo RM apresentou também redução da atividade osteoclástica, mas apenas até o dia 38.
- Ambos os tratamentos, PDT e RM, mostram regressão e posterior evolução da doença periodontal.

Referências Bibliográficas

1. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986;13:418-30.
2. Williams RC. Periodontal disease. *N Engl J Med* 1990;322:373-82.
3. AAP. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:457-70.
4. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-64.
5. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.
6. LANG NP MA, ATTSTROM R. Placa e cálculo dentais. In: Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 66-91.
7. Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000* 1994;5:52-65.
8. HAAKE. Microbiologia Periodontal. In: Carranza AF, Newman MG. Periodontia Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 87-107.
9. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997;31:356-60.
10. TORRES CH, KC, ANIDO, A ; RODRIGUES JC. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos*, 2000;3:10.
11. Keyes PH, Jordan HV. Periodontal Lesions in the Syrian Hamster. Iii. Findings Related to an Infectious and Transmissible Component. *Arch Oral Biol* 1964;32:377-400.
12. KEYES PH LR. Plaque Formation, Periodontal Disease, and Dental Caries in Syrian Hamsters. *J Dent Res* 1946:25-166.
13. Klingsberg J, Butcher EO. Aging, diet, and periodontal lesions in the hamster. *J Dent Res* 1959;38:421.
14. Lallam-Laroye C, Escartin Q, Zlowodzki AS, Barritault D, Caruelle JP, Baroukh B, et al. Periodontitis destructions are restored by synthetic glycosaminoglycan mimetic. *J Biomed Mater Res A* 2006;79:675-83.
15. Makris GP, Saffar JL. Destruction and repair of periodontal tissues during burst episodes of activity in hamster periodontitis. *J Biol Buccale* 1986;14:101-13.

16. Mikx FH, Maltha JC, Wolters-Lutgerhorst JM, Franken HC. Age and diet composition in relation to experimental periodontal destruction in hamsters. *J Periodontol* 1984;19:51-60.
17. MIKX FHM MJ, FRANKEN HCM. , LUKASSEN JAM. Dietary and Microbial aspects of rapid periodontal bone loss in golden hamster. *J. Dental Research* 1979;55(D):225-227.
18. Miller WA, Ripley JF. Early periodontal disease in the Syrian hamster. *J Periodontol* 1975;46:368-74.
19. MITCHELL D. Introductory Observations of the Periodontium of the Syrian Hamster. *J. Dent. Res* 1948;27:330.
20. Mitchell DF. Periodontal disease in the Syrian hamster. *J Am Dent Assoc* 1954;49:177-83.
21. Mitchell DF, Johnson M. The nature of the gingival plaque in the hamster: production, prevention, and removal. *J Dent Res* 1956;35:651-5.
22. MITCHELL DF CD. Two studies of periodontal disease in the syrian hamster. *J Dental Res* 1951;30:802-25.
23. Ranieri JA, Toto PD, Gargiulo AW. Experimental gingivitis in the albino hamster. *J Periodontol* 1979;50:94-100.
24. Rushton MA. The epithelial down growth on the molar roots of golden hamsters. *Br Dent J* 1951;90:87-93.
25. Saffar JL, Makris GP. A morphological and quantitative study of osteoclast changes during the progress of periodontitis in the hamster. *J Biol Buccale* 1986;14:255-62.
26. Stralfors A, Thilander H, Bergenholtz A. Simultaneous inhibition of caries and periodontal disease in hamsterby disinfection, tooth-brushing or phosphate addition. *Arch Oral Biol* 1967;12:1367-73.
27. Ackroyd R, Keltly C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001;74:656-69.
28. Prates RA, Yamada AM, Jr., Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B* 2007;86:70-6.
29. Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg Med* 1992;12:450-8.
30. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992;25:77-81.

31. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:182-7.
32. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol* 1995;78:569-74.
33. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28.
34. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-50.
35. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343-9.
36. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-5.
37. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005;79:159-70.
38. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* 2005;76:1275-81.
39. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci* 2003;45:17-23.
40. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76:1100-5.
41. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:932-40.
42. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007;78:566-75.
43. Schmid-Schonbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:93-131.

44. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
45. Oringer RJ. Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol* 2002;73:460-70.
46. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 1965;36:177-87.
47. Schroeder H. The Periodontium. In: *Handbook of Microscopic Anatomy*. Berlin: Springer; 1986. p. 47-64.
48. LINDHE J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
49. Karring T, Loe H. The three-dimensional concept of the epithelium-connective tissue boundary of gingiva. *Acta Odontol Scand* 1970;28:917-33.
50. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:338-55.
51. Schroeder HE, Listgarten MA. Fine structure of the developing epithelial attachment of human teeth. *Monogr Dev Biol* 1971;2:1-134.
52. Schroeder HE. Structure and biology of the gingivo-dental area. *J Am Dent Hyg Assoc* 1971;45:378-9.
53. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986;13:431-45.
54. Pihlstrom BL, Ammons WF. Treatment of gingivitis and periodontitis. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. *J Periodontol* 1997;68:1246-53.
55. Loesche WJ. The antimicrobial treatment of periodontal disease: changing the treatment paradigm. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:245-75.
56. Axelsson P, Lindhe J. Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 1987;14:205-12.
57. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol* 2000;71:249-55.
58. Nakhjavani YB, Bayramy A. The dental and oral status of children with chronic renal failure. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2007;25:7-9.
59. Waldman HB, Perlman SP, Swerdloff M. Periodontics and patients with special needs. *J Periodontol* 2000;71:330-3.

60. Pope JE, Curzon ME. The dental status of cerebral palsied children. *Pediatr Dent* 1991;13:156-62.
61. Tomitaa N, Fagoteb, BF. Educative Program of Oral Health for Handicapped Patients. *Odontologia e Sociedade* 1999;1:45-50.
62. LÖE H. Human Research Model for the Production and Prevention of Gingivitis. *J Dent Res* 1971;50:256-264.
63. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol* 1999;26:335-40.
64. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 1994;65:1158-68.
65. Rodini CdO. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: Caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9 [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB); 2005.
66. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol 2000* 2000;24:226-38.
67. King JG, A. Experimental investigations of periodontal disease in the ferret and related lesions in man. *British Dental Journal* 1947;83:126–127.
68. Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol* 1900; 39:524–546.
69. Von Tappeiner H. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. *Muench. Med. Wochenschr* 1900;47: 5.
70. Meyer-Betz F. Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des hamatoporphyrins und anderer Derivative des Blut-und Gallenfarbstoffs. In: *Dtsch. Arch. Klin. Med*; 19 13 . p. 476-503.
71. Lipson R, Baldes, EJ. The photodynamic properties of a particular haematoporphyrin derivative. *Arch. Dermatol* 1960;82:508-516.
72. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002;66:89-106.

73. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med* 1996;18:253-9.
74. Konig K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000;46:1297-303.
75. Komerik N, Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol* 2002;92:618-23.
76. Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:104-8.
77. Ovchinnikov IS TV, Ivanov K, Titorenko VA. Preclinical and clinical studies of photodynamic action on some pathogenic micro-organisms of the oral cavity. *Biophotonics Instrumentation and Analysis* 2001;4597:100-108.
78. Shibli JA, Martins MC, Nociti FH, Jr., Garcia VG, Marcantonio E, Jr. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* 2003;74:338-45.
79. Bass CC. An effective method of personal oral hygiene; part II. *J La State Med Soc* 1954;106:100-12.
80. Bollen CM, Mongardini C, Papaioannou W, Van Steenberghe D, Quirynen M. The effect of a one-stage full-mouth disinfection on different intra-oral niches. Clinical and microbiological observations. *J Clin Periodontol* 1998;25:56-66.
81. Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol* 1979;50:495-509.
82. Loe H. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J* 2000;50:129-39.
83. Keyes PH, Gold HS. Periodontal lesions in the Syrian hamster. I. A method of evaluating alveolar bone resorption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1955;8:492-9.
84. Stahl SS, Miller SC, Goldsmith ED. The influence of occlusal trauma and protein deprivation on the response of periapical tissues following pulpal exposures in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1958;11:536-40.
85. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29:165-73.

86. Kga M. In. Frankfurt, Germany: Merck Chemical Reagents Index; 1999.
87. Iwase T, Saito T, Nara Y, Morioka T. Inhibitory effect of He-Ne laser on dental plaque deposition in hamsters. *J Periodontal Res* 1989;24:282-3.