



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Monitoramento da Doença Periodontal em Modelo Animal pelo Sistema de Tomografia por Coerência Óptica

ADAIANA MUNGO MAISTRO

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

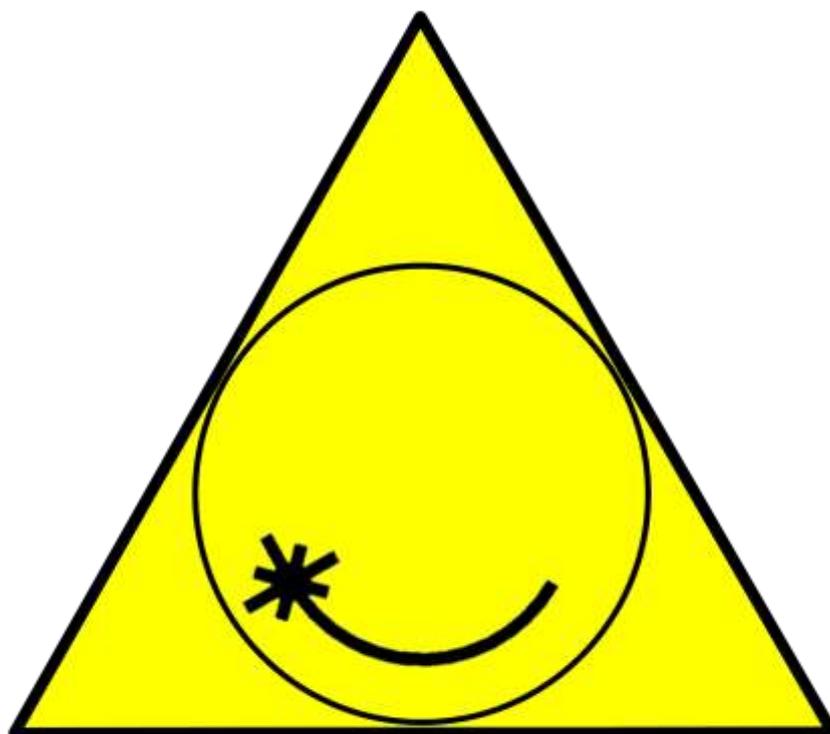
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana da Costa Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

SÃO PAULO

2010





MESTRADO PROFISSIONALIZANTE

LASERS EM ODONTOLOGIA

**INSTITUTO DE PESQUISA ENERGÉTICAS E NUCLEARES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Monitoramento da Doença Periodontal em Modelo
Animal pelo Sistema de Tomografia por Coerência
Óptica**

ADAIANA MUNGO MAISTRO

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

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana da
Costa Ribeiro**

**Co-orientador: Prof. Dr. Anderson
Zanardi de Freitas**

SÃO PAULO

2010

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, que é meu exemplo e minha fortaleza, sempre me apoiando nas minhas conquistas e em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois foi Ele que me permitiu chegar até aqui, através de toda minha história, meus sonhos, vitórias e derrotas, aumentando minha fé, esperança e motivando ir buscar seus propósitos em minha vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana da Costa Ribeiro, que não tenho palavras para expressar todo meu carinho, respeito, amizade, admiração por todo seu empenho, paciência e dedicação durante todos esses meses. Aprendi ao seu lado, o que significa ser professor... ensinar com amor, foi isso que você me transmitiu, contagiou, mais que todos os estudos, o aprendizado de vida. Agradeço a Deus a oportunidade de ter sido a sua orientada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas, que foi extremamente presente, e dedicado em me ensinar e orientar em todos os momentos do decorrer da pesquisa. Agradeço a oportunidade de ter trabalho ao seu lado, pois além de me proporcionar uma experiência única de aprendizado, seu exemplo de professor e pesquisador foram muito importantes para mim.

À todos os professores que fizeram parte do mestrado profissionalizante *Lasers* em odontologia (IPEN e LELO), por transmitirem seus conhecimentos com toda dedicação e sabedoria.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Pinto Alves Mayer por ter aberto as portas de seu laboratório de microbiologia e com suas orientações, permitir a possibilidade do desenvolvimento dessa pesquisa.

À todos do laboratório de microbiologia, Ellen, Érica, Thalyta, Glau, Lili, Mike, Lucas, Pâmela, Didi, Cris, Josy, o Léo e o João Paulo, pessoas que me acolheram e tiveram paciência de me ajudar nos experimentos laboratoriais, sempre que necessário... à vocês, toda minha amizade, carinho e gratidão.

Agradecimento especial à Ellen, por seu acompanhamento em todos os procedimentos laboratoriais e no biotério, auxiliando, orientando, além de ser uma pessoa muito querida e especial.

Ao Éricles, que sempre esteve disposto a nos ajudar nos procedimentos envolvendo os camundongos, se tornando um grande amigo.

Agradecimento ao Sr. Carlos do biotério, pelo seus auxílios e cuidados e com os camundongos.

À Fernanda, que sua ajuda e seu trabalho no processamento histológico foram indispensáveis para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner, por ceder seu laboratório para realização das análises morfométricas durante o período da pesquisa.

À todos funcionários do LELO e do IPEN, que sempre foram muito receptivos e dispostos a nos ajudar.

À todos amigos que fiz na turma 9 do mestrado profissionalizante *lasers* em odontologia...conviver com vocês foi uma experiência única de aprendizado e de alegrias, os quais me fizeram crescer como pessoa...meu carinho especial para cada um de vocês.

Às minhas amigas Ana Paula e Carol que me acolheram não apenas em suas casas, mas em seus lares, em suas famílias, me dando um respaldo emocional no tempo longe da família, a quem tenho todo agradecimento num período muito importante para mim.

Aos meus pais, meus irmãos, a Fá, o Douglas, minhas sobrinhas lindas, Ana Luísa e Isadora... à vocês todo meu amor e gratidão por sempre estarem ao meu lado, me apoiando, me incentivando e não medindo esforços para ajudar a realizar meus sonhos.

Ao Márcio, meu namorado....obrigada por todo seu carinho, amor e paciência em suportar minhas ausências, falta de tempo, minhas angústias e ansiedades devido aos estudos, mas estar ao seu lado foi de extrema importância para conseguir chegar até aqui. Amo você!

A minha secretária Luzia e a Dr^a Fabíola, por cuidarem do consultório e me ajudarem profissionalmente no período em que estava longe.

Aos meus pacientes pela compreensão das minhas ausências clínicas.

E à todos que direta ou indiretamente, não me ajudaram somente no decorrer dessa pesquisa, mas participaram comigo de uma conquista.

Muito Obrigada!!!

Monitoramento da Doença Periodontal em Modelo Animal pelo Sistema de Tomografia por Coerência Óptica

ADAIANA MUNGO MAISTRO

RESUMO

A tomografia por coerência óptica (OCT) apresenta-se como uma nova proposta ao diagnóstico e à detecção precoce da doença periodontal, mediante as limitações dos métodos convencionais na avaliação da doença em seus estágios iniciais. Na busca por um método de diagnóstico sensível e específico, que reproduza com confiabilidade os dados clínicos da doença periodontal ao longo do tempo e que permita detalhamento das estruturas periodontais nos estágios iniciais da doença, este estudo teve como objetivo monitorar pela técnica de OCT a evolução experimental da doença periodontal induzida em modelo animal. Foram avaliadas, qualitativa e quantitativamente, as alterações ocorridas entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) após 7, 15 e 30 dias da indução da doença periodontal por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (clone JP2). Foram incluídos 35 camundongos machos (C57BL/6), com idade de seis a oito semanas, os quais foram aleatoriamente divididos em sete grupos: grupos experimentais – GE7d, GE15d e GE30d (n=6 por grupo), cujos animais foram infectados pela bactéria; grupos controles veículo – GV7d, GV15d, GV30d (n=4 por grupo), cujos animais foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo experimental, mas sem a presença da bactéria; grupo controle negativo – GN (n=5), cujos animais não foram submetidos a qualquer procedimento sendo sacrificados no tempo experimental zero. Decorridos 7, 15 e 30 dias os animais dos grupos GE e GV foram sacrificados e as hemi-maxilas removidas, as quais foram submetidas às avaliações tomográfica pelo sistema OCT, morfométrica por

estereo-microscópio e histomorfométrica. A distância JCE-COA foi mensurada em três sítios distintos (primeiro, segundo e terceiro molares) a partir dos tomogramas e das imagens morfológicas, utilizando-se o programa Image J. A distância JCE-COA nos histogramas foi mensurada na região distal do primeiro molar e na região mesial do segundo molar. A distância média de referência entre JCE-COA no grupo controle negativo foi de 0,128 mm no primeiro molar, 0,100 mm no segundo molar e 0,070 mm no terceiro molar, relevando concordância das análises tomográficas e morfométricas ($p > 0,05$ – ANOVA) entre os sítios analisados. Nos grupos controle veículo (GV7d, GV15 e GV30d) as distâncias médias JCE-COA aferidas não demonstraram, ao longo do tempo experimental, alterações significativas ($p > 0,05$ – ANOVA) quando os sítios avaliados foram comparados aos respectivos valores de referência, independente da técnica de análise. A análise dos tomogramas dos grupos experimentais revelou aumento significativo ($p < 0,05$ – ANOVA) da JCE-COA no primeiro molar, após 15 dias (GE15d), sendo possível aferir alteração de apenas 86 μm , e após 30 dias da infecção (GE30d), 100 μm . Já a avaliação morfométrica só demonstrou aumento significativo entre JCE-COA no primeiro molar após 30 dias (GE30d). A análise histomorfométrica revelou aumento significativo ($p < 0,05$) da JCE-COA quando as médias dos grupos controle veículo e experimental foram comparadas entre si, nos respectivos tempos experimentais, confirmando a evolução da doença no grupo experimental diante do aumento dos valores de referência. Mediante os resultados obtidos, a técnica de OCT mostrou-se viável na detecção e quantificação das alterações teciduais periodontais de camundongos saudáveis e infectados pelo *A. actinomycetemcomitans*, revelando-se eficaz ao monitoramento da doença periodontal desde suas manifestações precoces.

Monitoring Periodontal Disease in Animal Model by Optical Coherence Tomography

ADAIANA MUNGO MAISTRO

ABSTRACT

The optical Coherence tomography (OCT) technique is presented as a new approach to diagnosis and early detection of periodontal disease, considering the limitations of conventional methods in the evaluation of the disease in its early stages. In the search for a sensitive and specific diagnostic method, which reliably reproduces the clinical periodontal disease over time and allow breakdown of periodontal structures in the early stages of the disease, this study aimed to monitor the progress of the experimental periodontal disease induced in an animal mode through the OCT technique. We evaluated qualitatively and quantitatively, the changes occurring between the cementum-enamel junction (CEJ) and alveolar bone crest (ABC) after 7, 15 and 30 days of induction of periodontal disease using *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JP2 clone). We included 35 male mice (C57BL / 6), aged from six to eight weeks, which were randomly divided into seven groups: experimental - GE7d, and GE15d GE30d (n = 6 per group), whose animals were infected by the bacteria ; vehicle control groups - GV7d, GV15d, GV30d (n = 4 per group), whose animals were submitted to the same procedures in the experimental group, but without the presence of bacteria; negative control group - GN (n = 5), whose animals were not subjected to any procedure being sacrificed on the experimental time zero. After 7, 15 and 30 days, the animals in GE and GV were sacrificed and the hemi-maxillae were removed, which were subjected to evaluations by computed tomography OCT system, stereo-microscope morphometric and histomorphometric. The distance CEJ-ABC was measured at three different sites (first, second and third molars) from the tomograms and

morphological images, using the program Image J. The distance CEJ-ABC in the histograms was measured in the distal region of the first molar and mesial of second molar region. The average distance between the reference CJE-ABC in the negative control group was 0.128 mm in the first molar, 0.100 mm in the second molar and 0.070 mm in the third molar, revealing correlation of tomographic and morphometric analysis ($p > 0.05$ - ANOVA) between sites analyzed. In vehicle control groups (GV7d, GV15 and GV30d) the average distances CEJ-ABC measured did not demonstrate throughout the experimental period, significant changes ($p > 0.05$ - ANOVA) when sites were evaluated compared to their respective benchmarks, independent from the analysis technique. Analysis of the tomograms of the experimental groups revealed a significant increase ($p < 0.05$ - ANOVA) CEJ-ABC in the first molar after 15 days (GE15d), being able to measure an alteration of only 86 μm and 30 days after infection (GE30d), 100 μm . The morphometric evaluation showed significant increase among CEJ-ABC in the first molar only after 30 days (GE30d). Histomorphometric analysis revealed a significant increase ($p < 0.05$) JCE-ABC when the vehicle control and experimental groups averages were compared, in their respective experimental times, confirming the disease's evolution in the experimental group facing the increase in values reference. From the results obtained, the OCT technique was feasible in the detection and quantification of periodontal tissue changes in healthy mice and the ones infected with *A.actinomycescomitans*, proving to be effective in monitoring periodontal disease since its early manifestations.

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivos	19
3. Revisão da literatura	20
3.1. Etiologia da doença periodontal	20
3.2. Diagnóstico periodontal	21
3.3. Tomografia por coerência óptica	23
3.4. Tomografia por coerência óptica na Periodontia	24
4. Material e Métodos	26
4.1. Estudo Piloto 1	26
a. Seleção dos animais	26
b. Avaliação das estruturas periodontais por OCT	26
4.2. Estudo Piloto 2	27
a. Seleção dos animais	28
b. Preparo do inóculo bacteriano	28
c. Indução da doença periodontal	28
d. Avaliação das estruturas periodontais por OCT	30
4.3. Estudo Experimental	30
a. Seleção dos animais	30
b. Preparo do inóculo bacteriano e Indução da doença periodontal	31
c. Avaliação das estruturas periodontais por OCT	31
d. Avaliação morfométrica	32
e. Avaliação histomorfométrica	32
5. Resultados	34
6. Discussão	46
7. Conclusão	49
8. Referências Bibliográficas	50

1. Introdução

As manifestações clínicas mais comuns da doença periodontal são a gengivite e a periodontite. A gengivite é a manifestação não destrutiva da doença periodontal, enquanto a periodontite acomete destrutivamente os tecidos periodontais. A periodontite é uma doença infecciosa multifatorial, caracterizada por inflamação, infecção e destruição dos tecidos de suporte dos dentes, tais como a gengiva, o cemento, o ligamento periodontal e o osso alveolar, sendo relacionada à suscetibilidade do hospedeiro às bactérias periopatogênicas.¹

A periodontite crônica é a forma mais comum da doença periodontal destrutiva, freqüentemente relacionada à idade adulta e em idosos. A patologia exhibe lenta progressão caracterizada por períodos de atividade e de quiescência do processo inflamatório, que podem culminar na perda dos elementos dentários envolvidos. Já a periodontite agressiva caracteriza-se por rápida progressão e, comumente, acomete adolescentes e adultos jovens sistemicamente saudáveis. A forma agressiva da periodontite determina grande perda de inserção clínica associada à rápida destruição óssea alveolar, principalmente, em incisivos centrais e primeiro molares.²

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a periodontite ocorre em 50% da população mundial e, especificamente, a periodontite severa, que causa danos funcionais ao paciente, atinge de 5 a 15% dessa população, sendo considerada um dos mais importantes problemas de saúde bucal.³ No Brasil, a prevalência da periodontite agressiva na população é de 5,5%, sendo 2,5%, 4,3% e 9,9% desta fração representada por indivíduos nas faixas etárias de 14-19, 20-24 e 25-29 anos, respectivamente.⁴

A doença periodontal se desenvolve a partir do rompimento do equilíbrio na interação entre hospedeiro e microorganismos patogênicos com potencial de colonizar os biofilmes da cavidade bucal.⁵ A manifestação e a progressão da doença periodontal, além da patogenicidade bacteriana, dependem de alguns fatores de risco, como genéticos, sistêmicos, sociais, comportamentais, e da resposta imune do hospedeiro.⁶

A forma agressiva da doença periodontal caracteriza-se por uma microbiota complexa constituindo-se geralmente de bactérias anaeróbias gram-negativas, destacando-se o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, considerado um dos principais patógenos da doença periodontal agressiva, devido ao grande número de fatores de virulência que favorecem a colonização e a permanência da espécie na cavidade oral, invadindo tecidos periodontais e interferindo na resposta tecidual do hospedeiro.⁷⁻⁹

O diagnóstico da doença periodontal requer apurada anamnese, exames clínico e radiográfico detalhados, que podem ser complementados por exame microbiológico. No exame clínico periodontal são avaliados: a presença de placa visível, o sangramento gengival, o sangramento gengival à sondagem, a profundidade de sondagem, o nível clínico de inserção e a mobilidade dentária. A avaliação do nível clínico de inserção e da perda óssea alveolar permitem inferir a extensão e severidade da doença periodontal.^{10, 11}

A aferição do nível clínico de inserção é realizada com auxílio da sonda periodontal, calibrada em milímetros, que é inserida no sulco gengival e bolsa periodontal estimando-se a distância entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/ bolsa periodontal. O exame pode ser extremamente desconfortável e doloroso para o paciente e sendo sujeito a variáveis, como a pressão do operador exercida à sonda, o diâmetro da sonda, o grau de inflamação tecidual e as irregularidades da anatomia dentária. Tais variáveis limitam a reprodutibilidade do método e a fidelidade da medida real do espaço biológico e da quantidade de estrutura perdida, pois erros inerentes à técnica variam de 0,62 a 1,17 mm.^{12, 13}

O exame radiográfico pode revelar informações importantes quanto às características morfológicas dos tecidos duros periodontais, as quais não podem ser identificadas num exame clínico visual. As imagens radiográficas permitem detectar e mensurar a perda óssea alveolar após significativo comprometimento tecidual, não permitindo, contudo, avaliação da atividade da doença.¹⁴ Algumas tecnologias, como radiografia digital e tomografia computadorizada, são propostas para auxiliar no diagnóstico da periodontite, pois permitem mensurar os níveis de perda óssea alveolar com maior sensibilidade que a radiografia convencional e proporcionam melhor

imageamento de crateras ósseas periodontais e de áreas com envolvimento da região de furca.^{14, 15}

Os métodos de diagnóstico convencionais à disposição do profissional na Odontologia, em suas diferentes especialidades (cariologia, endodontia, periodontia, estomatologia), não permitem a avaliação dos sinais clínicos das diferentes patologias em seus estágios iniciais. Novas tecnologias, como a tomografia por coerência óptica (OCT – *Optical Coherence Tomography*), são propostas a suprir essa lacuna como um método de diagnóstico por imagem capaz de executar, com alta resolução, o imageamento óptico de tecidos duros/ moles e permitir a detecção precoce e monitoramento de patologias.¹⁶⁻¹⁸

A inserção da técnica OCT na área da saúde iniciou-se na Medicina, em estudos na oftalmologia¹⁹ e se difundiu para outras especialidades como dermatologia,^{20, 21} cardiologia^{22, 23} e otorrinolaringologia,²⁴⁻²⁶ estabelecendo-se como uma nova opção de diagnóstico por imagem e monitoramento de patologias. A tomografia por coerência óptica é uma técnica não-invasiva, que permite o imageamento de tecidos vivos em tempo real, utilizando-se de luz no infra-vermelho próximo ao invés de radiação ionizante. Através desta tecnologia detalhes micro-estruturais do tecido podem ser avaliados, permitindo verificar estruturas que, muitas vezes, só poderiam ser avaliadas por exame histopatológico.^{16, 17, 27}

Na Odontologia, a OCT tem despertado o interesse de pesquisadores pelos seus inúmeros benefícios, apesar de ser uma técnica ainda pouco explorada. Estudos revelaram que imagens tomográficas adquiridas de tecidos dentais e periodontais permitem a identificação e o monitoramento da progressão de lesões cariosas,²⁸⁻³⁰ identificação de fraturas radiculares,³¹ avaliação do selamento marginal de restaurações³² e detecção de alterações periodontais durante movimentos ortodônticos.^{33, 34} A técnica permite obter informações qualitativas e quantitativas dos tecidos bucais por meio de uma biópsia óptica, capaz de penetrar em média 3 mm de profundidade a partir da superfície, de acordo com as propriedades ópticas do tecido. Os tomogramas exibem resolução de 1-15 μm podendo detectar precocemente alterações morfológicas nos tecidos moles/ duros.^{35, 36}

A técnica de OCT ainda não é utilizada clinicamente na Odontologia, entretanto, os resultados de pesquisas laboratoriais, nas diversas especialidades da área, demonstraram-se promissores e incentivam novos estudos que certamente alicerçarão a aplicação da técnica clínica num futuro próximo. A técnica permitirá ao profissional oferecer ao paciente uma opção segura, eficaz e precisa de diagnóstico e monitoramento de diferentes patologias bucais, favorecendo a manutenção da saúde bucal. Neste intuito, este estudo teve como objetivo investigar a viabilidade da OCT na avaliação e monitoramento das estruturas de suporte do elemento dentário após a indução experimental da doença periodontal em modelo animal.

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral monitorar, pela técnica de tomografia por coerência óptica, a periodontite induzida em modelo animal.

Para tanto, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- indução da periodontite em camundongos (C57Bl/6);
- avaliação, qualitativa e quantitativa, pelas técnicas OCT, morfométrica e histomorfométrica das alterações morfológicas dos tecidos periodontais em diferentes tempos experimentais após a indução da doença periodontal.

3. Revisão da literatura

3.1. Etiologia da doença periodontal

A microbiota da doença periodontal agressiva, caracterizada especialmente por bactérias anaeróbias gram-negativas, revela maior prevalência de espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium* ssp. e espécies de *Selenomonas*.^{37, 38} Muito embora esses microorganismos tenham sido relacionados com a patologia, faz-se necessário para início e a progressão da periodontite o rompimento do equilíbrio ecológico entre a microbiota oral e o hospedeiro.⁵

A atividade do *A. actinomycetemcomitans* na forma agressiva da doença periodontal tem sido bastante investigada.⁹ A espécie revela notável capacidade de adesão a componentes da cavidade oral, como superfícies dentárias e células epiteliais e a outras bactérias da microbiota bucal.^{39, 40} O microorganismo agride os tecidos periodontais através da síntese de collagenases, epiteliotoxinas, fatores inibidores de fibroblastos, fatores indutores de reabsorção óssea e de um potente lipopolissacarídeo.⁴¹

O *A. actinomycetemcomitans* sintetiza uma leucotoxina, incluída na família das citolisinas bacterianas RTX, que induz à lise de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos humanos, sendo considerada o principal fator de virulência do microorganismo.^{42, 43} A produção da leucotoxina varia entre diferentes clones do *A. actinomycetemcomitans*, destacando-se o clone JP2 por sua freqüente associação aos quadros avançados de periodontite agressiva, que são caracterizados por perda severa do nível de inserção clínica.^{44,45,46} Além disso, longitudinalmente, a doença periodontal nos pacientes colonizados pelo clone JP2, possui maior resistência à terapia periodontal convencional e apresentam maior perda tecidual que nos pacientes não portadores desse clone.⁴⁷

Mediante o notável grau de virulência do *A. actinomycetemcomitans*, diferentes estudos tem utilizado a espécie na indução experimental da doença periodontal em modelo animal, com o intuito de verificar seu mecanismo de ação, as respostas e os níveis inflamatórios do hospedeiro, seu potencial de

agressão tecidual ao longo do tempo e a interferência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no desenvolvimento da doença.^{48, 49}

Diferentes protocolos são sugeridos na literatura, de forma que alterações nos tecidos periodontais são observadas após a inserção de ligaduras na região do sulco gengival^{50, 51} e/ou inoculações de suspensões bacterianas no tecido gengival/ cavidade oral^{48, 49, 52} em diferentes tempos experimentais.

3.2. Diagnóstico periodontal

O tratamento e o controle da doença periodontal são baseados no correto diagnóstico e na adequada terapia periodontal, que deve priorizar a remoção e o controle da placa/ cálculo supra e subgengival e, se necessário, cirurgias periodontais e administração de antibióticos sistêmico.⁵³⁻⁵⁵

O correto diagnóstico de uma patologia norteará o plano de tratamento e seu prognóstico. Maiores serão as probabilidades de sucesso terapêutico e manutenção da saúde quando a doença for diagnosticada precocemente. O diagnóstico da doença periodontal inicia-se por uma apurada anamnese, sendo importante coletar dados da história médica do paciente, antecedentes familiares com casos da doença, hábitos e cuidados de higiene bucal e relatos de sinais e sintomas relacionados à patologia. Complementarmente, o exame clínico periodontal avalia as manifestações clínicas da doença através do índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem, níveis de inserção clínica, mobilidade dentária e quantidade de perda óssea alveolar.^{10,11}

A perda de inserção clínica e do osso de alveolar são sinais preditores da doença, sendo a sondagem periodontal e o exame radiográfico procedimentos padrões para diagnóstico da doença e durante o acompanhamento longitudinal após o tratamento. A sondagem é realizada por meio de sonda periodontal calibrada inserida, manualmente ou por instrumentos eletrônicos de força controlada, no sulco gengival/ bolsa periodontal. A pressão exercida à sonda, o tamanho e a forma da ponta da sonda, o local de inserção e o grau de inflamação gengival são algumas das

variáveis que podem interferir na precisão do método, cuja resolução pode variar de 0,1 a 1,0 mm, dependendo do instrumento.⁵⁶ As sondas eletrônicas foram desenvolvidas na tentativa de aperfeiçoar a resolução da técnica, de forma a controlar a força de inserção e automatizar os registros, mas ainda carecem de precisão e reprodutibilidade.⁵⁷⁻⁵⁹

Exames radiográficos são relevantes na prática clínica por revelarem as características e alterações morfológicas dos tecidos duros periodontais, sem, contudo, distinguir o grau de atividade da doença. A radiografia convencional auxilia na avaliação da perda óssea acometida pela periodontite, mas com baixa sensibilidade, pois revelam alterações teciduais após 30 a 50% de perda mineral, identificando apenas perdas ósseas significativas.⁶⁰⁻⁶²

A avaliação da perda óssea alveolar por interpretação radiográfica exige padronização das técnicas radiográficas de forma que variáveis (tempo de exposição, temperatura e tempo de processamento, posicionamento radiográfico, etc) sejam controladas e permitam comparações entre radiografias antes e pós-tratamento. A subtração radiográfica, já bem estabelecida na Medicina, ganha espaço na Periodontia permitindo detecção de alterações ósseas na ordem de 1 mg.⁶³ Imagens são sobrepostas e através de um algoritmo a sobreposição das imagens é comparada avaliando-se quantitativamente os níveis de escala de cinza entre as imagens. A técnica revela melhor sensibilidade e precisão quando comparada às interpretações radiográficas realizadas visual ou digitalmente, muito embora também exija precisa padronização.^{64, 65}

Vale ressaltar que a radiação ionizante possui uma energia de radiação que interage com o tecido biológico e, dependendo da dose irradiada e da sensibilidade tecidual, pode ser transferida para o DNA celular modificando ou lesando sua estrutura. Apesar da dose utilizada na Odontologia, nas técnicas radiográficas, ser considerada segura, estudos revelaram que células da mucosa bucal podem ser lesadas.⁶⁶

Na tentativa de aperfeiçoar o diagnóstico da periodontite, vários estudos têm dado ênfase ao assunto e pesquisas são realizadas em diversas áreas, como microbiológica, clínica odontológica e tecnológica. Nesta última, novos métodos de diagnóstico por imagem não-invasivos e que não utilizam a

radiação ionizante despertam grande interesse de pesquisadores e clínicos, de forma que o diagnóstico precoce e o monitoramento da periodontite sejam realizados com maior precisão e sensibilidade.

3.3. Tomografia por coerência óptica

A tomografia por coerência óptica (OCT) foi inicialmente preconizada por Huang e colaboradores em 1991, como uma técnica de diagnóstico por imagem não-invasiva, obtendo-se tomogramas de amostras teciduais, tendo como princípio as diferentes propriedades ópticas dos tecidos.⁶⁷ Inicialmente, a OCT foi desenvolvida para área médica, especificamente à oftalmologia, permitindo avaliar regiões profundas do olho, como a retina, favorecendo o diagnóstico por imagem de patologias nessas estruturas.¹⁹

A OCT é uma tecnologia que foi desenvolvida com base na teoria óptica e dos lasers, onde através do uso de um laser de banda larga ou de um led luminescente no infra-vermelho próximo, permite o imageamento micro estrutural de tecidos vivos, em tempo real e *in situ*. Através de uma biópsia óptica, o OCT pode penetrar até 3 mm de profundidade no tecido, de acordo com as propriedades ópticas do mesmo, resultando numa imagem digital com resolução de 1-15 μm .³⁶ Na Odontologia, o sistema OCT é capaz de avaliar tecidos duros e moles da cavidade bucal e identificar com precisão suas diferenças estruturais.⁶⁸

Essas vantagens propõem a inserção da técnica em diversas situações clínicas, pois pode possibilitar o imageamento e diagnóstico precoce de tecidos patológicos, quando a biópsia excisional é impossível ou envolve maior risco ao paciente.^{19, 27}

A sensibilidade da técnica permite mencionar ainda outras vantagens, como a possibilidade de monitorar e diagnosticar, em tempo real, as pequenas alterações no tecido dentário, periodontal e na mucosa bucal. No tecido dentário, possibilita visualizar pequenas alterações no processo de desmineralizações e remineralizações do esmalte por interferência do pH, já que o desequilíbrio desse processo leva ao início da lesão cariosa,^{69, 70} sendo possível também o monitoramento da progressão do processo de desmineralização.^{30, 71} A técnica permite ainda visualizar falhas/ trincas nas

restaurações³² e na adaptação de selantes oclusais.⁷² A literatura também relata a utilização do OCT na avaliação de falhas na obturação do canal radicular no tratamento endodôntico e de fraturas verticais radiculares, aspectos dificilmente visíveis através da radiografia convencional, que podem comprometer o sucesso da terapia.³¹

Nos tecidos periodontais, o sistema permite identificar com precisão estruturas teciduais possibilitando o diagnóstico da doença periodontal⁷³ e ainda mostrar alterações do ligamento periodontal mediante forças ortodônticas.^{33, 34} A técnica também poderá auxiliar na detecção de displasias em tecidos moles e lesões pré-cancerosas.^{16, 74}

3.4. Tomografia por coerência óptica na Periodontia

As falhas dos métodos de diagnóstico convencionais e a falta de reprodutibilidade no monitoramento da doença periodontal, estimularam o surgimento de novas pesquisas e aperfeiçoamentos tecnológicos em busca por métodos mais confiáveis no diagnóstico precoce da doença periodontal.

A tomografia por coerência óptica foi proposta na especialidade revelando detalhes micro estruturais de tecidos moles e duros,¹⁸ subsidiando novos estudos com o objetivo de acompanhar a atividade da doença periodontal antes que ocorra significativa perda tecidual. A OCT pode ainda determinar com precisão a localização da inserção do tecido gengival na superfície dentária e reproduzir, com mais fidelidade, a profundidade da bolsa periodontal permitindo um monitoramento da evolução da doença.⁵⁶

As propriedades ópticas do sistema de OCT não requerem contato direto com o tecido e, como não há pressão tecidual, o sistema faz mensurações reais do tecido saudável sem caráter invasivo, podendo diagnosticar precocemente a periodontite, além de proporcionar imagens tri-dimensionais.⁵⁶ Na literatura, o primeiro estudo em modelo animal, avaliando o tecido periodontal saudável através do OCT em suíno,¹⁸ incentivou a avaliação da viabilidade da técnica em humanos.^{73, 75} As imagens tomográficas geradas por OCT demonstraram a viabilidade na identificação de toda superfície dentária, contorno gengival e tecido ósseo alveolar, iniciando um novo conceito de diagnóstico de doenças periodontais.^{18, 75, 76}

A espessura do ligamento periodontal em humanos varia em média de 0,15-0,38 mm, enquanto em camundongos aproxima-se de 0,22 mm, distâncias aferidas em estudos prévios que utilizaram sistemas de OCT com resolução de 10-14 μm .³⁴

Entretanto, até o presente momento, os estudos limitam-se à análise das estruturas periodontais *in situ*, tanto em modelo animal como em humanos, não havendo relatos na literatura sobre o acompanhamento longitudinal da saúde/doença periodontal através do sistema OCT. Esta proposta permitirá verificar a viabilidade da técnica OCT em detectar e monitorar, através do imageamento óptico utilizando-se de um sistema com resolução de apenas 6 μm , as primeiras alterações e perdas teciduais durante a periodontite induzida em camundongos.

4. Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do IPEN (ANEXO A) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ANEXO B).

4.1. Estudo Piloto 1

O ensaio piloto foi realizado com o objetivo de verificar a viabilidade do sistema de OCT (OCP930SR, Thorlabs Inc) na avaliação das estruturas periodontais em camundongos.

a. Seleção dos animais

Foram selecionados 05 camundongos *Swiss*, machos, com idade entre 6-8 semanas, os quais foram criados no Biotério do IPEN. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seguindo-se a divulsão dos tecidos moles e exposição da maxila, que foi removida e, imediatamente, fixada em solução de formaldeído a 4% com finalidade de preservação das estruturas biológicas.

b. Avaliação das estruturas periodontais por OCT

O sistema de OCT (OCP930SR, Thorlabs Inc) utilizado neste estudo (Figura 1), emprega um LED superluminescente com comprimento de onda em 930nm, com resolução, no ar, lateral e longitudinal de 6,0µm, capaz de apresentar até 8 imagens por segundo. De acordo com as características ópticas do tecido a ser avaliado, o sistema pode avaliar até 3 mm em profundidade.

O espécime, hemi-secção da maxila com 1,5 mm de profundidade, foi colocado sobre um aparato, mantendo-se relação perpendicular entre as estruturas periodontais e a ponta de prova do OCT fixada em um sistema de translação linear x, y e z, permitindo um ajuste da ponta de prova para geração das imagens de OCT, que posteriormente foram analisadas com o programa Image J.

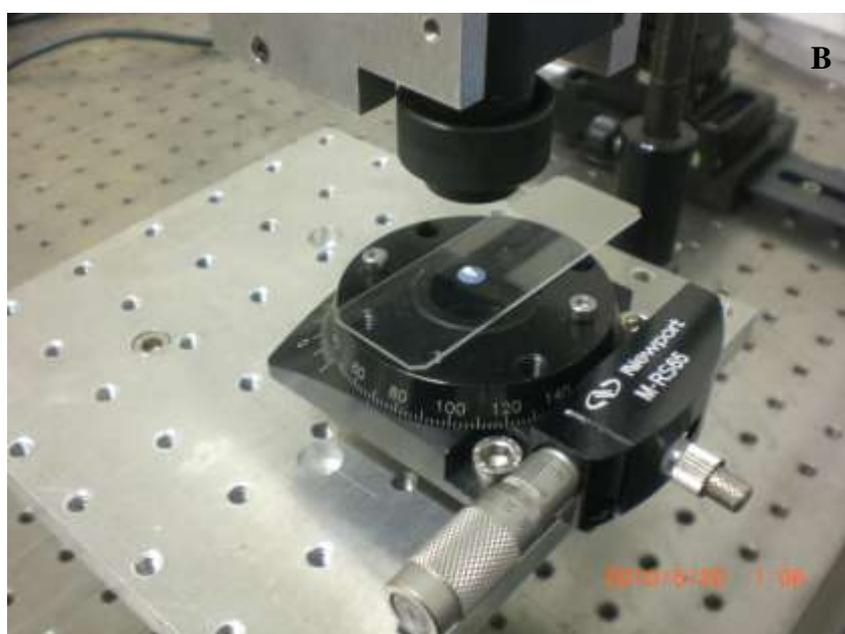
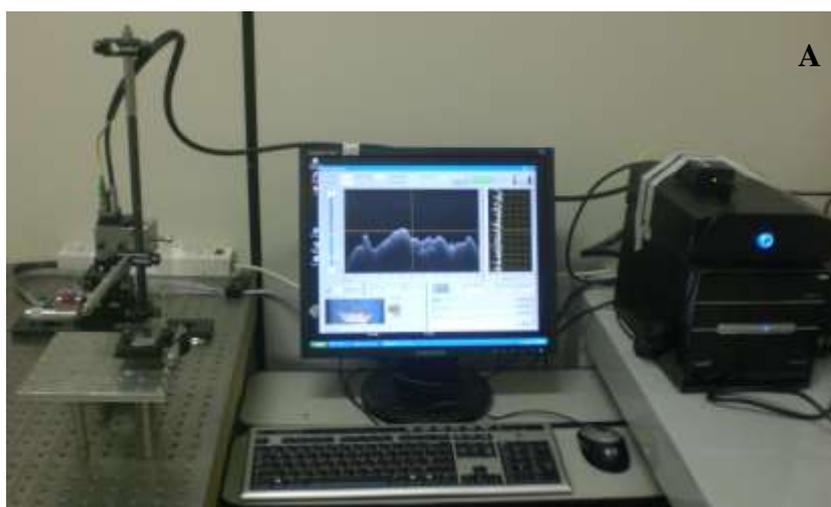


Figura 1. Sistema de OCT – OCP930SR (Thorlabs Inc.) utilizado no estudo (A) e detalhe da ponta de prova do sistema posicionada durante aquisição dos perfis tomográficos da hemi-maxila (B).

4.2. Estudo Piloto 2

Este ensaio teve como objetivos: (i) avaliar a efetividade da indução da doença periodontal em duas linhagens de camundongos; (ii) verificar a viabilidade do sistema da técnica de OCT na avaliação das alterações das

estruturas periodontais em camundongos por ocasião da presença da doença periodontal.

a. Seleção dos animais

Foram incluídos 08 camundongos C57BL/6 e 08 camundongos Swiss, machos, com idade entre seis a oito semanas, mantidos durante o período de experimentação no biotério do Departamento de Microbiologia (ICB/USP). Para cada uma das linhagens, 4 animais foram infectados (Grupo experimental) por uma suspensão bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* e os outros 4 animais foram submetidos aos mesmos procedimentos, mas sem a presença da bactéria no inóculo recebido (Grupo controle veículo).

b. Preparo do inóculo bacteriano

A amostra de *A. actinomycetemcomitans* (JP2) foi cultivada por 48 horas em estufa com atmosfera de 10% CO₂ em ágar triptcaseína de soja acrescido de extrato de levedura (TSAYE). Colônias isoladas foram transferidas para 8 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas por 12 horas nas mesmas condições atmosféricas descritas. A suspensão bacteriana foi ajustada para densidade óptica 1,0 no comprimento de onda de 495 nm.

Esta suspensão foi diluída (1:40) em caldo BHI e incubado por 6 horas em iguais condições atmosférica e de temperatura. Ao final deste período, a suspensão foi ajustada para valores de densidade próximos a 0,3 (DO_{495nm}), estimando-se 10⁸ UFC/mL. Procedeu-se a obtenção do precipitado bacteriano (5000 rpm, 5 minutos, 4°C), que foi ressuscitado em 300 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) – inóculo do tecido gengival; e 100 µL de PBS acrescida de carboximetilcelulose a 2% – inóculo da cavidade oral.⁴⁹

c. Indução da doença periodontal

Os animais foram anestesiados com uma mistura de anestésicos composta por Ketamine (80 mg/Kg) e Xylazine (15 mg/Kg) injetada intraperitonealmente. As manobras para indução da doença periodontal foram

realizadas em três momentos, conforme ilustra a Figura 2. Inicialmente, foi injetado na região palatina dos segundos molares 10 μ L do inóculo do tecido gengival, estimando-se a inoculação de 1×10^6 unidades formadoras de colônias (UFC). Em seguida, foi dispensado na cavidade oral 100 μ L da suspensão bacteriana em PBS acrescida de carboximetilcelulose a 2%, estimando-se a inoculação de 1×10^7 UFC (Figura 3). Após 48 e 96 horas a inoculação na cavidade oral do animal foi repetida.⁴⁹

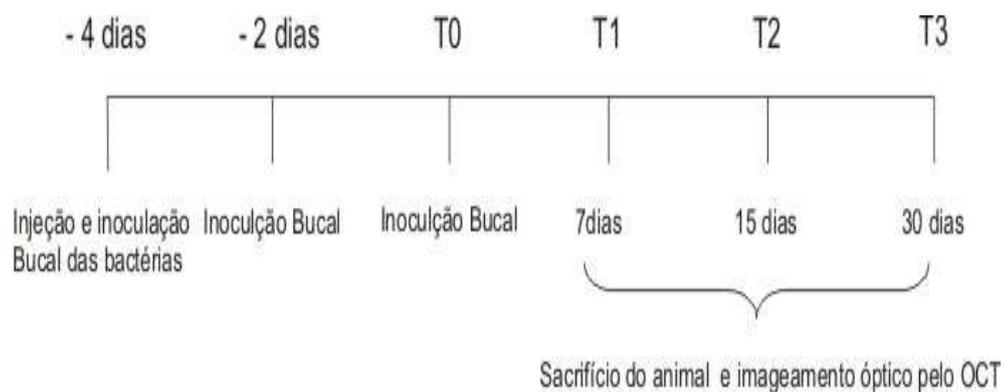


Figura 2. Delineamento experimental ilustrando os tempos de inoculação e de sacrifício dos animais para imageamento óptico por OCT e análises morfológica e histológica.



Figura 3. Imagens representativas da inoculação da suspensão bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* na região palatina (imagem esquerda) e cavidade oral de camundongo (imagem direita).

d. Avaliação das estruturas periodontais por OCT

Neste ensaio (Estudo Piloto 2) o imageamento das estruturas periodontais por OCT ocorreu 7 e 15 dias após o finalização dos procedimentos de indução da doença periodontal, sendo 4 animais do grupo experimental e 4 do grupo controle veículo sacrificados em cada tempo. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seguindo-se a divulsão dos tecidos moles e exposição da maxila, que foi removida e, imediatamente, fixada em solução de formaldeído a 4%.

Igualmente ao descrito no Estudo Piloto 1, os espécimes foram avaliados pelo sistema de OCT, com resolução de 6µm, e as imagens geradas foram analisadas pelo programa Image J.

4.3. Estudo Experimental

a. Seleção dos animais

Foram incluídos 35 camundongos C57BL/6 machos, com idade entre seis a oito semanas, mantidos durante o período de experimentação no biotério do Departamento de Microbiologia (ICB/USP). Durante o período de experimentação, os animais foram mantidos em isoladores em ambiente com regime de iluminação 12/12h e alimentados *ad libidum* com ração sólida e água esterilizados.

Os animais foram aleatoriamente divididos em sete grupos:

- 3 Grupos experimentais (GE n=18), sendo n=6 para cada tempo experimental de 7 (T7), 15 (T15) e 30 (T30) dias. Nesses grupos os animais foram infectados pela suspensão de *A. actinomycetemcomitans*;
- 3 Grupos controles veículo (CV n=12), sendo n=4 para cada tempo experimental de 7 (T7), 15 (T15) e 30 (T30) dias. Nesses grupos os animais não foram infectados, mas foram submetidos a todos os procedimentos do protocolo de indução sem a presença da bactéria;

- 1 Grupo controle negativo (C0 n=5), animais que não foram submetidos a nenhum procedimento experimental.

A Tabela 1 descreve os tempos experimentais de sacrifício dos animais. Nos grupos experimental e controle veículo os animais foram sacrificados 7, 15 e 30 dias após a finalização dos procedimentos de indução da doença periodontal. Já os animais do grupo controle negativo foram sacrificados no tempo zero (T0), conforme ilustra a figura 2.

Tabela 1. Detalhamento dos grupos experimentais.

Grupos	Detalhamento experimental	Sacrifício/ Análise OCT	n
Controle negativo	nenhum procedimento	0 dias	5
Controle veículo	animais submetidos aos procedimentos de indução da DP sem a presença da bactéria	7 dias	4
		15 dias	4
		30 dias	4
Experimental	animais infectados pelo <i>A. actinomycetemcomitans</i>	7 dias	6
		15 dias	6
		30 dias	6

b. Preparo do inóculo bacteriano e Indução da doença periodontal

Os procedimentos para preparo do inóculo bacteriano e para indução da doença periodontal foram os mesmos descritos anteriormente no item II – Estudo Piloto 2.

c. Avaliação das estruturas periodontais por OCT

O imageamento das estruturas periodontais por OCT ocorreu após 7, 15 e 30 dias após a finalização dos procedimentos da indução da doença periodontal (Figura 2). Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seguindo-se a divulsão dos tecidos moles e exposição da maxila, que foi

removida e, imediatamente, fixada em solução de formaldeído a 4%. Os espécimes foram avaliados pelo sistema de OCT no mesmo dia do sacrifício dos animais.

O sistema OCT utilizado foi o mesmo já descrito nos ensaios anteriores. Os espécimes foram fixados sobre um aparato resguardando relação perpendicular entre a ponta de prova do OCT e às estruturas periodontais da região de molares, avaliando-se as superfícies vestibular e palatina (Figura 1).

Os tomogramas adquiridos foram avaliados para mensurar a distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) nas regiões de primeiro, segundo e terceiro molares, pelo programa *Image J*.

d. Avaliação morfométrica

Imediatamente após a aquisição dos tomogramas, os espécimes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 12 -16h para remoção de remanescentes teciduais facilitando a avaliação morfológica dos tecidos duros em estéreo microscópio (Quimis Q7355 TZ).

Foram obtidas imagens das superfícies vestibular e palatina dos espécimes, as quais foram capturadas por câmera CCD, através do programa Pinnacle Media Center, e armazenadas para posterior análises. A distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) nas regiões de molares, foi mensurada utilizando-se o programa *Image J*.

e. Avaliação histomorfométrica

O processamento histológico foi iniciado imediatamente após a avaliação morfométrica. Para esta avaliação, foram selecionados aleatoriamente, metade do n de cada grupo das amostras, nos diferentes tempos experimentais. Os espécimes foram individualmente submetidos à descalcificação pela imersão em solução de EDTA 10%, que foi renovada a cada 24 horas por 7 dias. As amostras foram desidratadas em solução alcoólica 70% por 24 horas, seguidos de: 2 imersões em álcool 80% e 90% por 15 minutos cada; 4 imersões em álcool 100% por 15 minutos; 3 imersões em

xylol por 20 minutos cada e, por último, 3 imersões em parafina por 60 minutos para posterior inclusão em parafina. Secções histológicas de 5 µm foram obtidas, considerando-se por amostra 5 secções, as quais referiam-se, aproximadamente, à distância média entre superfícies vestibular e palatina.

Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina e avaliados em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital. Foram adquiridas imagens da região interproximal entre primeiro e segundo molares, as quais foram avaliadas a distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte mensurada com auxílio do programa Image J.

5. Resultados

Os ensaios realizados neste estudo permitiram verificar a viabilidade da técnica de OCT na avaliação das estruturas periodontais de camundongos saudáveis e infectados pelo *A. actinomycetemcomitans*. Os tomogramas adquiridos no estudo Piloto 1 possibilitaram a visualização das estruturas dentais e periodontais, tais como: esmalte, dentina, câmara pulpar, canais radiculares, espaço periodontal, crista óssea alveolar, inserção conjuntiva (Figura 4).

No estudo Piloto 2, foi observado o aumento da distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e à crista óssea alveolar (COA), caracterizada pela alteração óssea após 15 dias da infecção dos animais pelo *A. actinomycetemcomitans* (Figura 5).

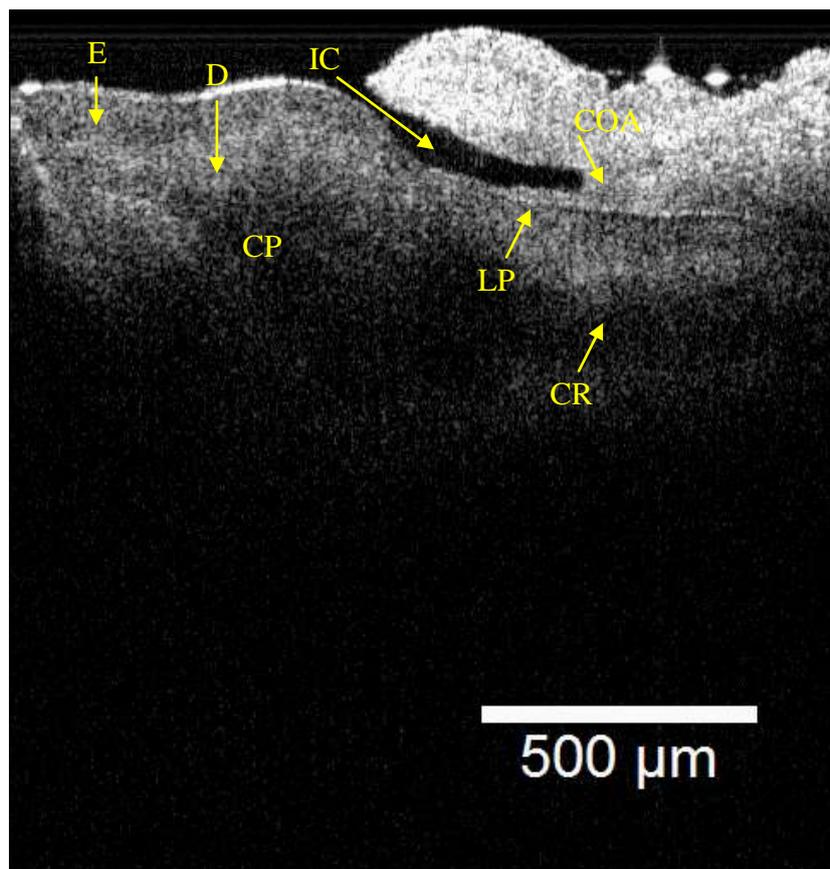


Figura 4. Estudo Piloto I, camundongo Swiss, tomograma da superfície vestibular do primeiro molar superior de camundongo saudável [E – esmalte; D – dentina; CP – câmara pulpar; CR – canal radicular; LP – ligamento periodontal; IC – inserção conjuntiva; COA – crista óssea alveolar].

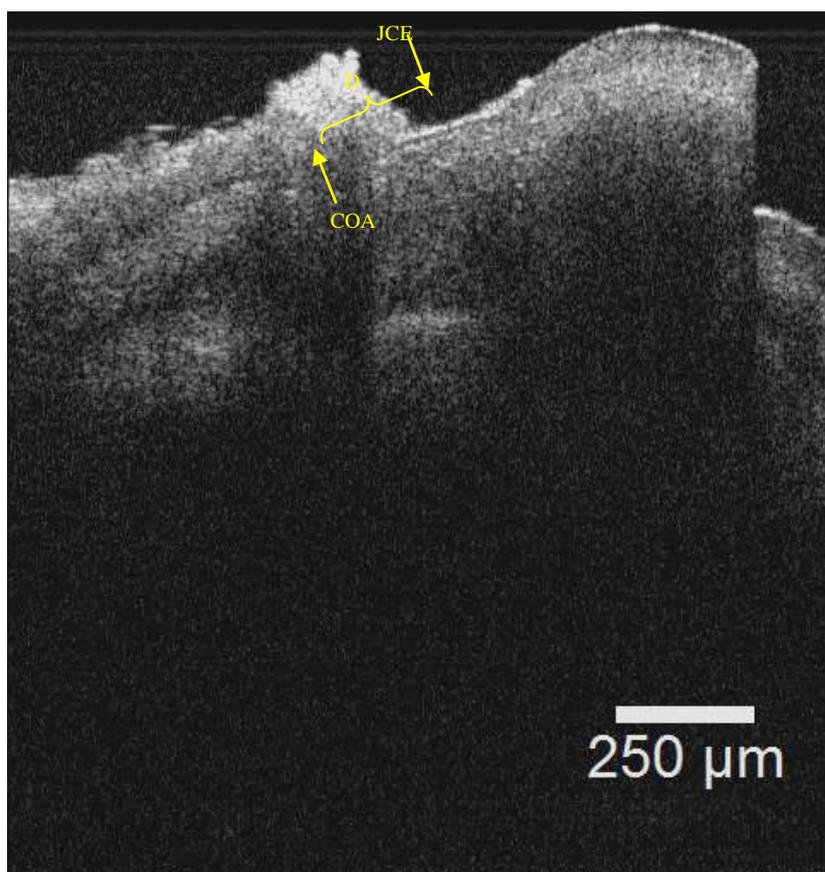


Figura 5. Estudo Piloto II, camundongo C57BL/6, tomograma da superfície palatina do primeiro molar superior após 15 dias de indução da doença periodontal. [JCE = junção cimento-esmalte; COA = crista óssea alveolar; D = distância JCE-COA].

No estudo experimental, também foram evidenciadas alterações nas estruturas periodontais nos tomogramas analisados, que revelaram aumento da distância JCE-COA após 7, 15 e 30 dias da indução da infecção. Para uma melhor comparação das estruturas acometidas durante o desenvolvimento da doença, a Figuras 6, revela o tomograma (A) e imagem morfológica (B) da superfície palatina do molar superior do grupo controle negativo, que não foi submetido a nenhum tipo de procedimento, portanto, a referência da anatomia saudável do camundongo.

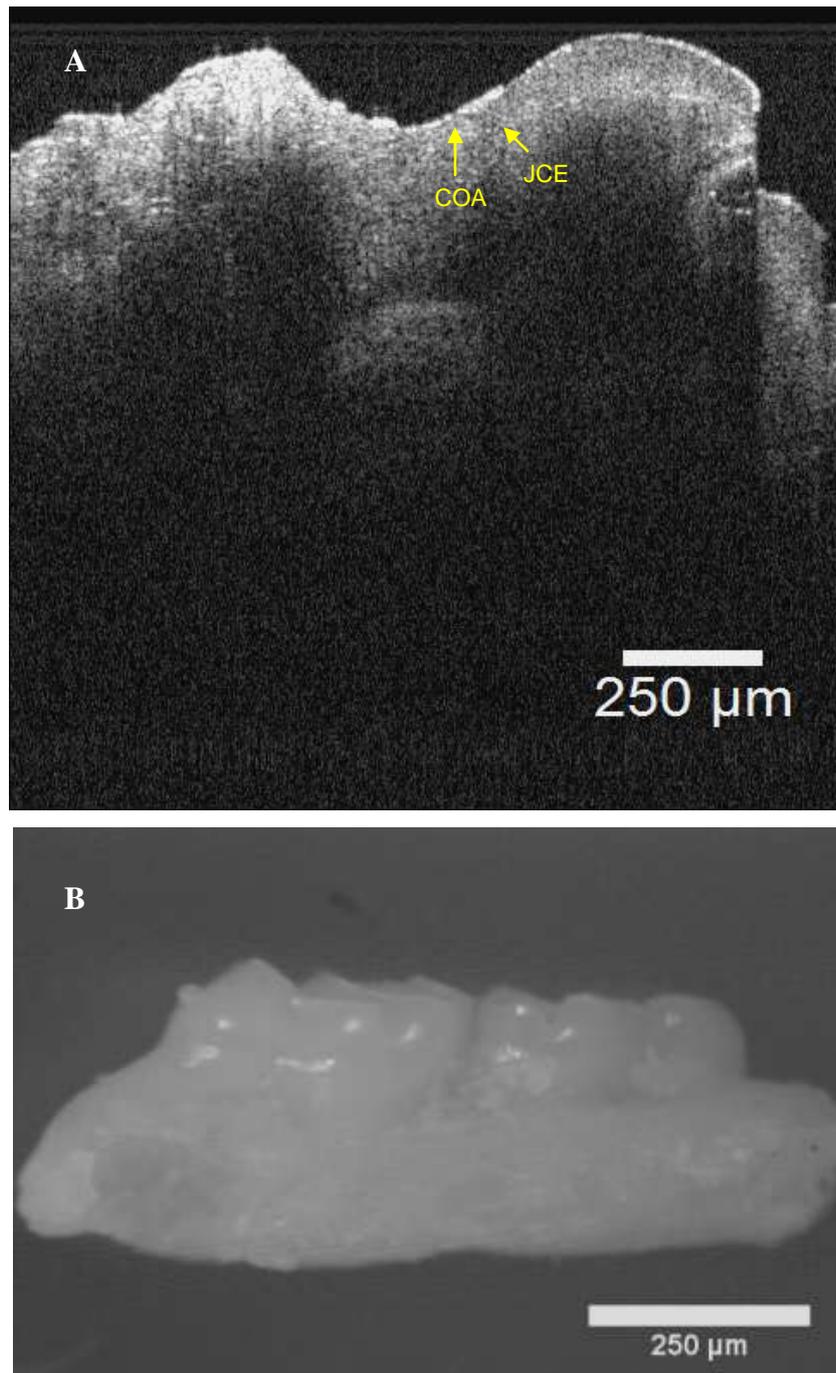


Figura 6. Estudo experimental, camundongos C57BL/6, tomograma da superfície palatina do primeiro molar superior do grupo controle negativo (A) e respectiva imagem morfológica (B). A distância JCE-COA é indicada entre setas no tomograma da figura A.

A figura 7 ilustra, representativamente, imagem do tomograma da superfície palatina de molar superior e imagem morfológica da respectiva hemimaxila do grupo experimental 15 dias após a infecção.

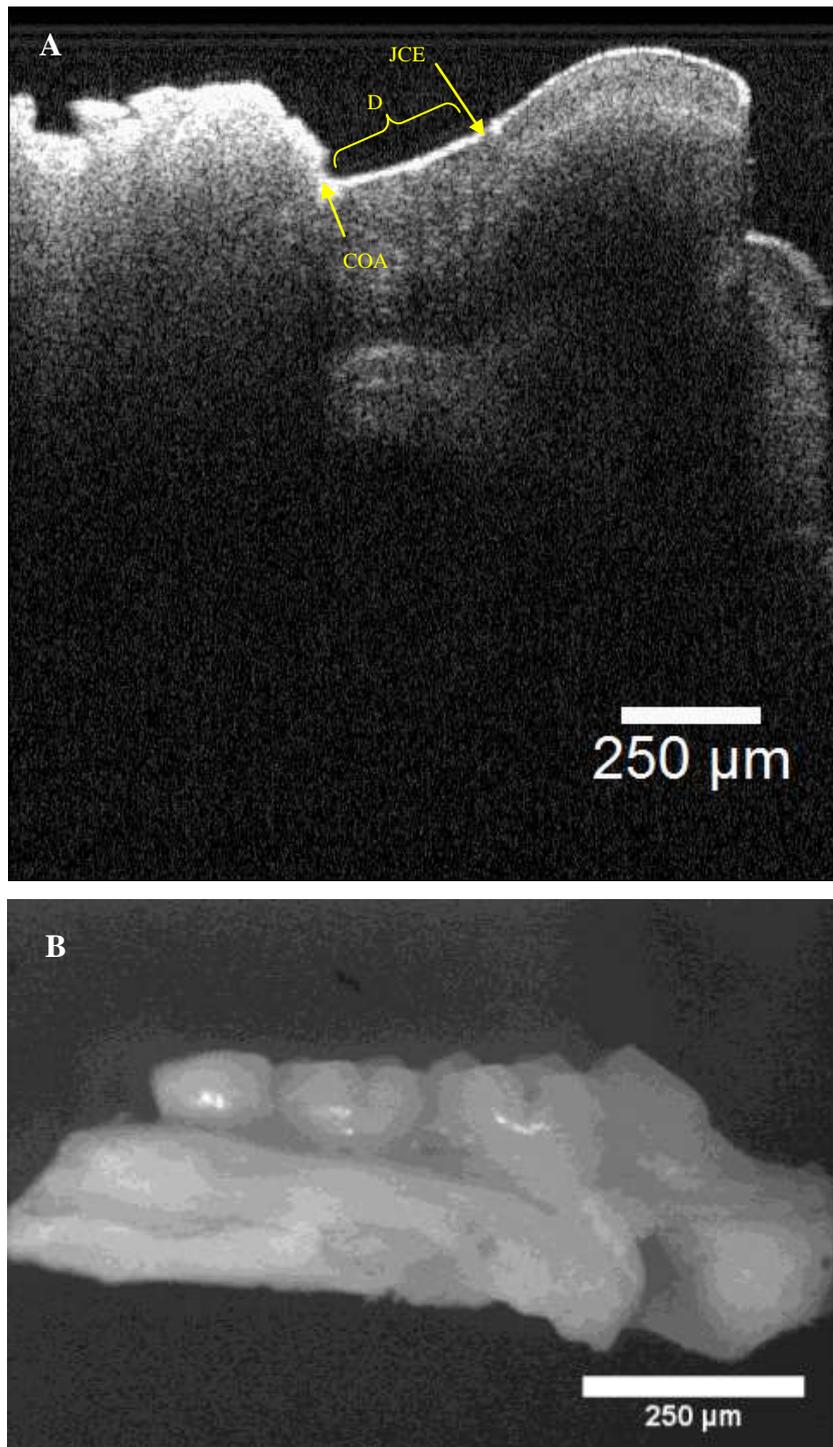


Figura 7. Estudo experimental, camundongo C57BL/6, (A) tomograma da superfície palatina do primeiro molar superior após 15 dias da indução da doença. (B) Imagem da região palatina da hemi-maxila avaliada no tomograma em A. [JCE = junção cimento esmalte; COA = crista óssea alveolar D = distância JCE-COA].

As figuras seguintes exibem tomogramas do grupo controle veículo (Figura 8A) e grupo experimental – 30 dias (Figura 8B). Pode-se evidenciar o aumento da distância JCE-COA no tomograma do grupo experimental quando comparado ao do grupo controle veículo.

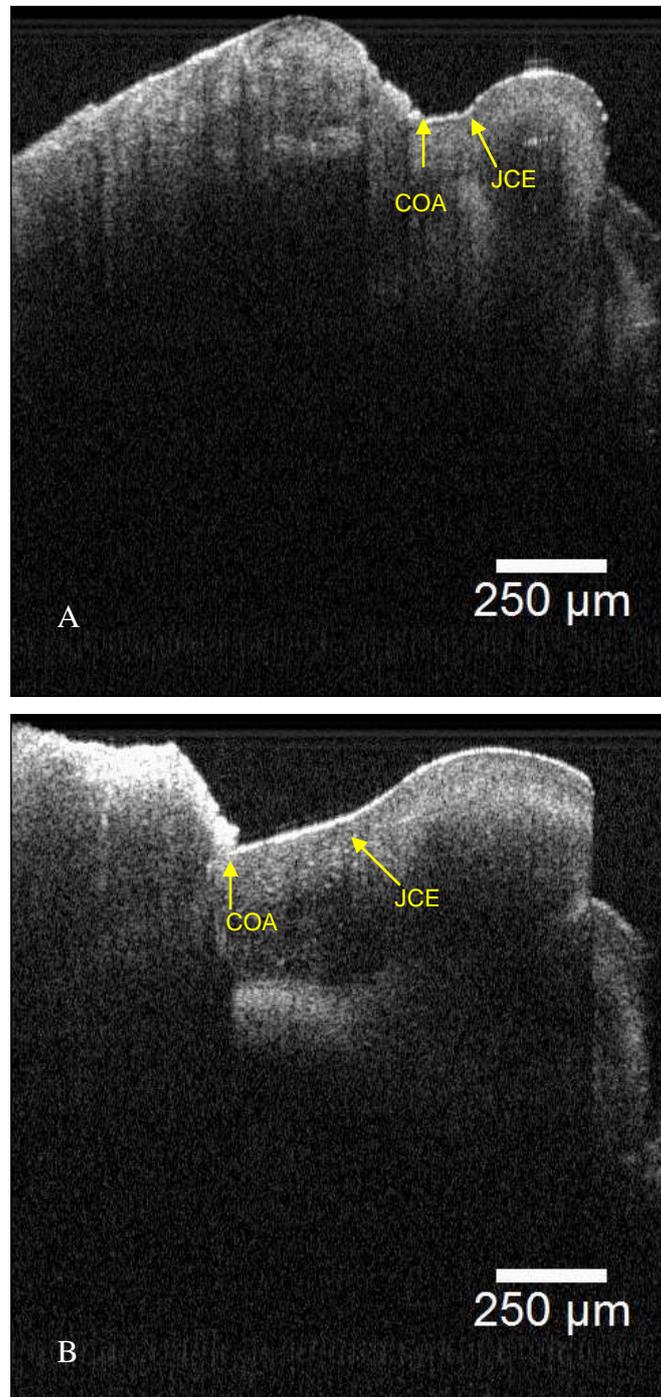


Figura 8. Estudo experimental, camundongo C57BL/6, tomograma da superfície palatina do primeiro molar superior do grupo controle veículo (A) e do grupo experimental (B) após 30 dias da indução da doença periodontal. Distância JCE-COA demarcada entre setas.

As respectivas imagens morfológicas dos tomogramas ilustrados na figura 8 são exibidas abaixo (Figura 9). Observa-se aumento da distância JCE-COA, caracterizada pela remodelação do nível ósseo horizontal, nos diferentes sítios de análise (primeiro, segundo e terceiros molares).

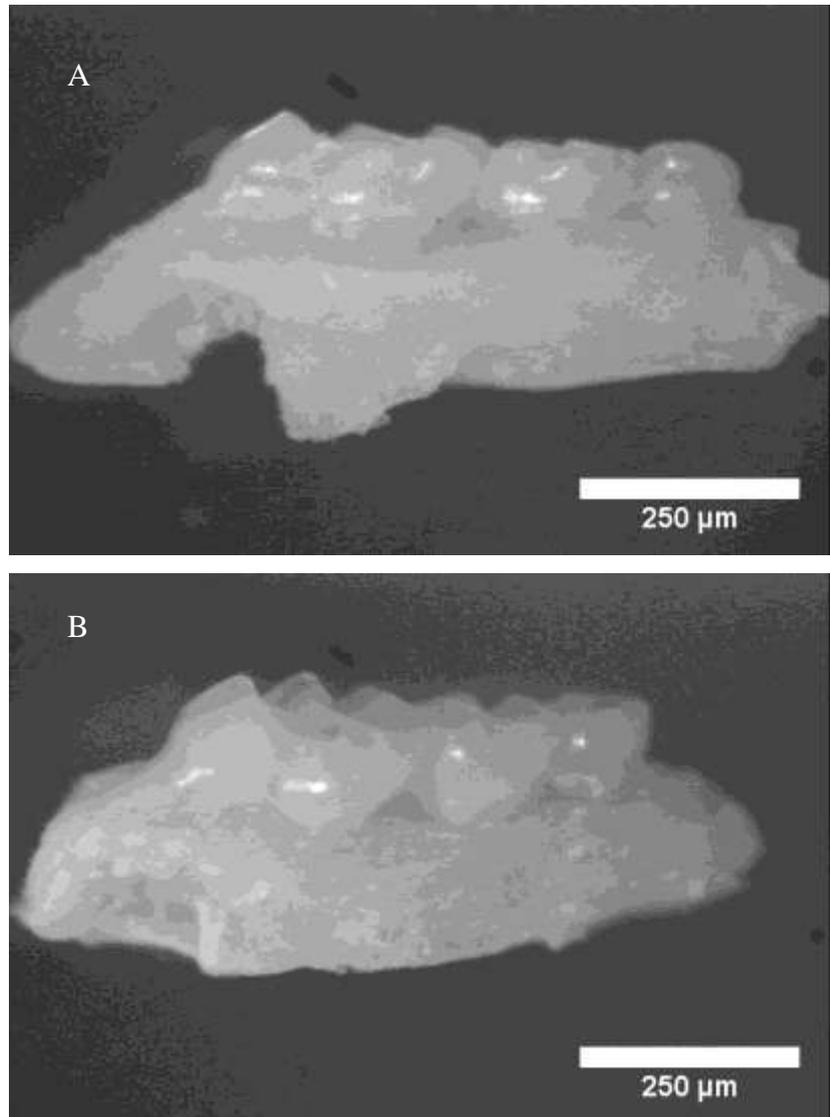


Figura 9. Estudo experimental, camundongo C57BL/6, imagens morfológicas da superfície palatina de hemi-maxilas correspondentes ao tomogramas ilustrados na Figura 8. (A) – grupo controle veículo e (B) grupo experimental após 30 dias da indução da doença periodontal.

O acompanhamento longitudinal das alterações morfológicas ocorridas no tecido ósseo alveolar foram mais evidentes na superfície palatina que na superfície vestibular. Nesta última, as alterações teciduais

só foram evidenciadas decorridos 30 dias após a infecção por *A. actinomycetemcomitans*. A figura 10 revela com maior nitidez o comprometimento tecidual vestibular nas imagens morfológicas do grupo experimental de 30 dias (Figura 10B) quando comparado ao grupo controle negativo (Figura 10A). Nota-se alteração do nível ósseo no sentido horizontal especialmente na região da raiz distal do primeiro molar.

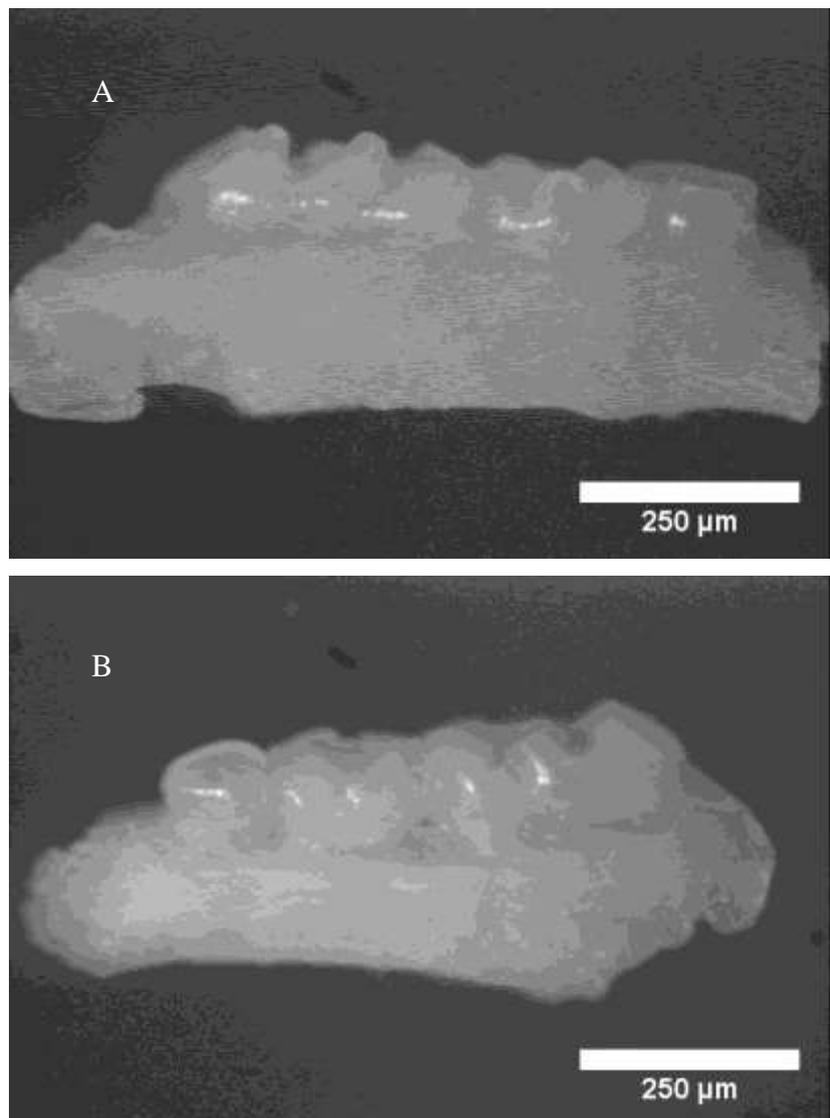


Figura 10. Estudo experimental, camundongo C57BL/6, imagens morfológicas da superfície vestibular do grupo controle negativo (A) e grupo controle experimental após 30 dias da infecção (B).

Os gráficos das figuras 11 e 12 apresentam as médias e desvios-padrão referentes à distância junção cimento-esmalte (JCE) e crista óssea alveolar (COA) mensuradas através dos tomogramas e imagens morfológicas nos diferentes tempos experimentais, considerando como sítios de avaliação o primeiro, o segundo e o terceiro molar, para os grupos controle veículo e grupo experimental, respectivamente. As distâncias médias e desvios-padrão, obtidas após análise tomográfica (OCT) e morfométrica nas amostras do grupo controle negativo, foram utilizadas como referência da anatomia saudável.

A distância JCE-COA nos animais do grupo controle negativo não apresentou diferença significativa entre o primeiro, o segundo e o terceiro molares, independente da técnica de avaliação utilizada ($p > 0,05$ – ANOVA).

No grupo controle veículo, os resultados obtidos pelas técnicas tomográfica e morfométrica apresentaram equivalência das distâncias JCE-COA considerando-se, independentemente, os sítios de avaliação e os correspondentes valores de referência (grupo controle negativo) nos tempos 7, 15 e 30 dias ($p > 0,05$ – ANOVA).

No grupo experimental, as alterações ósseas foram mais evidentes no primeiro molar, especialmente quando a técnica de OCT foi utilizada. A análise tomográfica revelou aumento significativo ($p < 0,001$ – ANOVA) da distância JCE-COA 15 e 30 dias após a infecção, quando os valores médios JCE-COA, nesses tempos experimentais, foram comparados com as médias de referência do grupo controle negativo. A análise morfométrica do primeiro molar no grupo experimental só revelou alterações significativas ($p < 0,001$ – ANOVA) na distância JCE-COA no tempo experimental de 30 dias, considerando o controle negativo como referência.

Ambas as técnicas foram concordantes ao detectarem aumento significativo ($p < 0,05$) da distância JCE-COA, no segundo molar de animais infectados, quando as distâncias médias no tempo experimental de 30 dias foram comparadas ao controle negativo do respectivo sítio. Entretanto, apenas a análise morfométrica foi capaz de evidenciar progressão das alterações ósseas alveolares no terceiro molar, não sendo o mesmo observado na análise tomográfica daqueles sítios ($p > 0,05$).

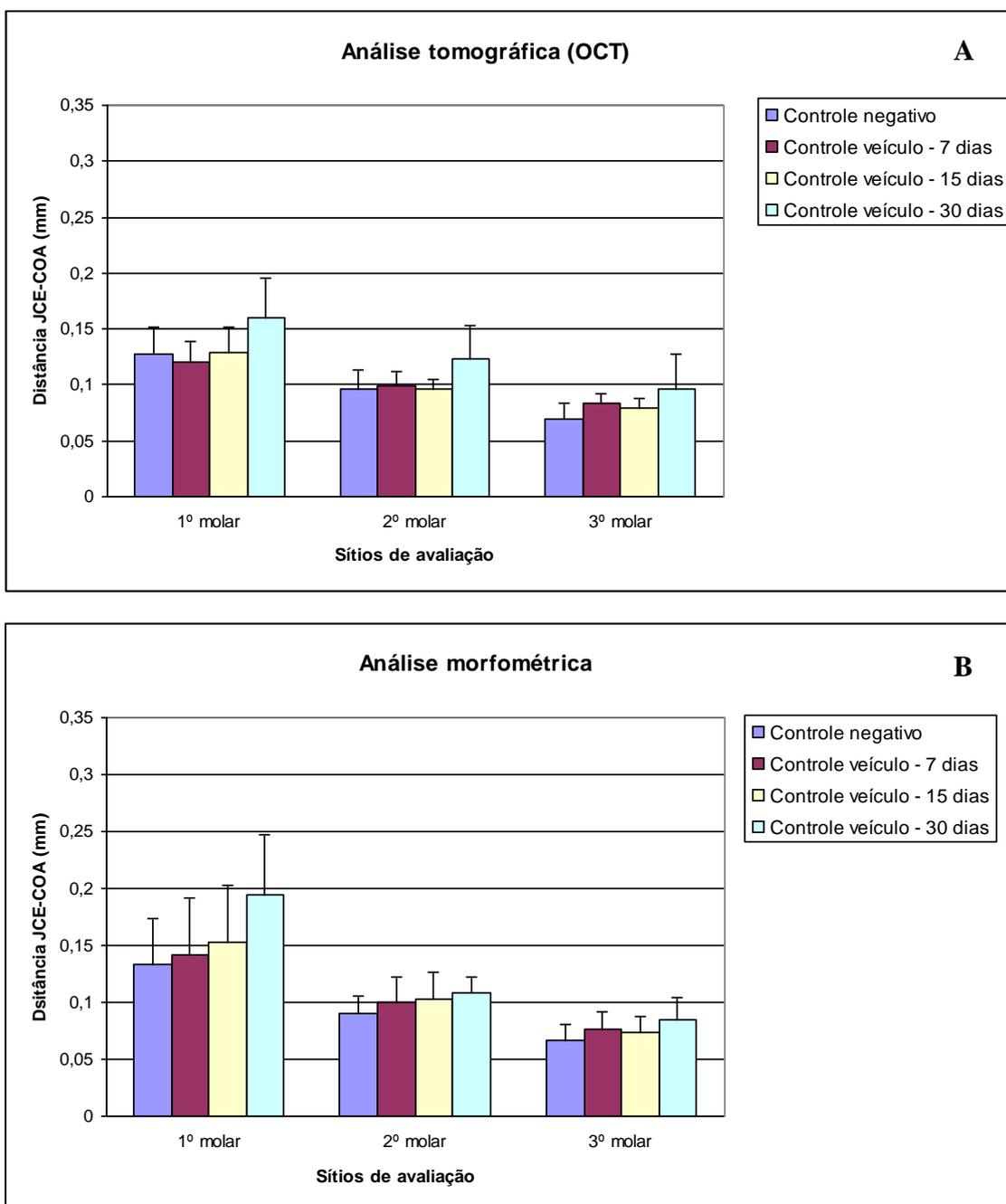


Figura 11. Distâncias médias e desvios padrão JCE-COA, em milímetros, obtidas após análise tomográfica (A) e morfométrica (B) das regiões de molares de animais do grupo controle veículo nos diferentes tempos experimentais. (JCE – junção cimento esmalte; COA – crista óssea alveolar). Ausência de diferença significativa nos sítios de avaliação ao longo do tempo ($p > 0,05$ – ANOVA).

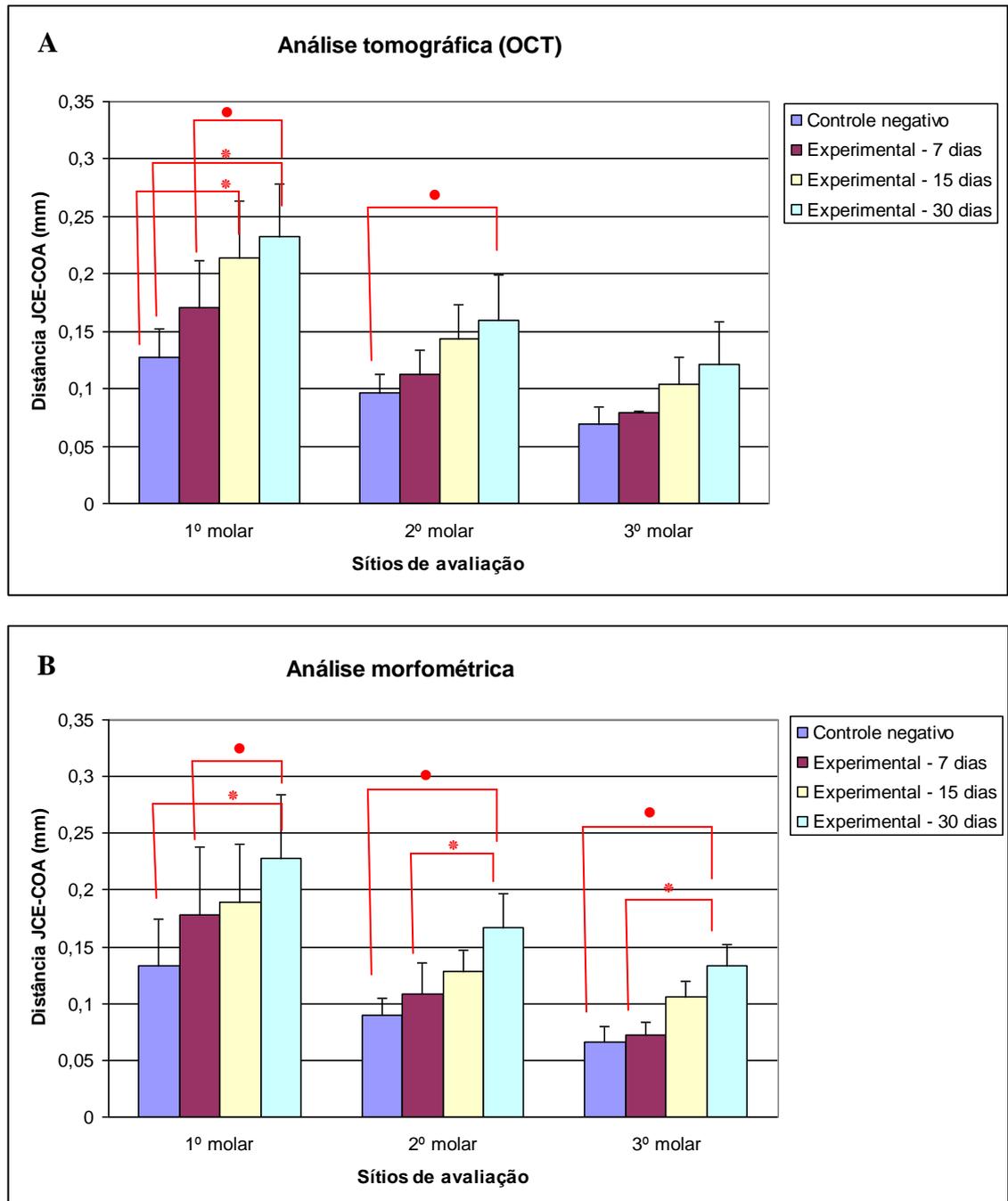


Figura 12. Distâncias médias e desvios padrão JCE-COA, em milímetros, obtidas após análise tomográfica (A) e morfométrica (B) das regiões de molares de animais do grupo experimental nos diferentes tempos experimentais. (JCE – junção cimento esmalte; COA – crista óssea alveolar). (●) $p < 0,05$ e (*) $p < 0,001$ ANOVA

Ressalta-se, pelos resultados apurados, a concordância entre as técnicas de OCT e morfométrica, quando as distâncias médias JCE-COA dos mesmos sítios foram comparadas considerando o mesmo tempo experimental. Exceção feita apenas quando os valores médios de JCE-COA do primeiro molar, mensurados pelas duas técnicas, foram comparados no tempo experimental 15 dias, onde a técnica de OCT mostrou-se mais sensível que a análise morfométrica, sendo capaz de aferir diferenças de 86 μm .

A figura 13 representa os resultados da distância média e desvios padrão referentes da distância JCE-COA, obtidos após a análise histomorfométrica. O sítio de avaliação selecionado foi a região interproximal, entre o primeiro e segundo molares, dos grupos controle veículo, grupos experimentais e grupo controle negativo.

A análise histomorfométrica revelou aumento significativo ($p < 0,05$) da distância JCE-COA quando as médias dos grupos controle veículo e experimental foram comparadas aos valores de referência do Grupo Controle negativo, nos diferentes tempos experimentais. Entretanto, a avaliação intra-grupo não revelou aumento significativo da distância JCE-COA ao longo do tempo para ambos os grupos ($p > 0,05$).

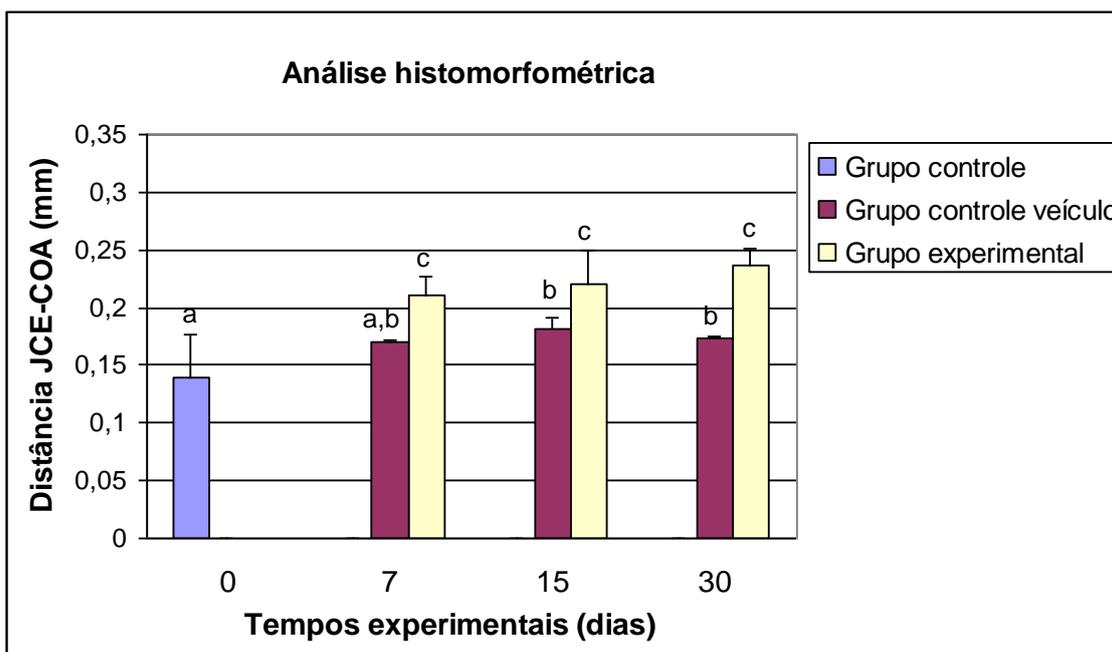


Figura 13. Distâncias médias e desvios padrão JCE-COA, em milímetros, obtidas após análise histomorfométrica das regiões interproximal de primeiro e segundo molares nos diferentes tempos experimentais. Diferenças significantes são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$ –ANOVA) (JCE – junção cimento esmalte; COA – crista óssea alveolar).

6. Discussão

A busca por um método de diagnóstico efetivo na detecção inicial das alterações teciduais que ocorrem mediante o processo de degeneração periodontal, por ocorrência da periodontite, e que reproduza com confiabilidade dados clínicos ao longo do tempo no monitoramento da doença, tornou a tomografia por coerência óptica, um sistema promissor na prática clínica.

Essa importância se deve ao fato de que a partir do momento que a doença periodontal é detectada pelo profissional, seu grau de evolução determinará o plano de tratamento e o prognóstico da doença. Sendo assim, quanto antes o diagnóstico for estabelecido, haverá melhores provisões terapêuticas e de sucesso clínico, juntamente com maior controle e manutenção da saúde bucal.

Os relatos encontrados na literatura ressaltam algumas vantagens da OCT sobre os métodos convencionais no diagnóstico da doença periodontal, como determinar com precisão a localização do tecido conectivo na superfície dentária, reproduzir com maior fidelidade a profundidade de sondagem da bolsa periodontal e apresentar imagens tri-dimensionais, recurso que permite visualizar com maior precisão a quantidade óssea tecidual em todas as faces da estrutura dentária⁵⁶.

No presente estudo, para contemplar o objetivo de verificar a viabilidade e a efetividade da OCT no monitoramento da doença periodontal, foi realizado a indução da doença periodontal em modelo animal (camundongos C57BL/6). Para tal procedimento, seguiu-se protocolos pré-estabelecidos na literatura.^{48, 49} Modelos de indução periodontal em pequenos animais vêm sendo utilizados há anos, devido as vantagens de seus fundamentos biológicos e genéticos já serem conhecidos, possuem facilidade de manuseio e especialmente, na linhagem isogênica, possuir a capacidade de reproduzir respostas teciduais homogêneas num mesmo grupo.⁷⁷

Muito embora estudos prévios também tenham utilizado modelos animais,^{18, 33, 34} este é o primeiro estudo que avalia longitudinalmente a evolução da doença periodontal induzida. No presente estudo foi possível identificar estruturas dentais e periodontais pela técnica OCT, corroborando com os resultados de estudos prévios.^{18, 73, 75, 76} Porém, nos estudos

encontrados na literatura não há uma padronização dos sistemas OCT utilizados, os quais exibem resoluções de 10-20 μm ,^{17,18,33} enquanto no presente estudo a resolução é de apenas 6 μm . Esse detalhamento é de grande relevância clínica, pois é possível analisar as alterações das estruturas periodontais em seus estágios iniciais, além de auxiliar o clínico na detecção de grandes perdas teciduais vestibulares, já que a técnica radiográfica além de possuir uma resolução de 500 μm , apenas permite a visualização das áreas interproximais.

Desde seus primeiros relatos na década de 90, os sistemas estão em constantes aperfeiçoamento, apresentando fontes de luz, comprimentos de ondas e pontas de prova diferentes, fatores que interferem no seu potencial de penetração tecidual e na qualidade de imageamento óptico das estruturas.³⁶

Os tomogramas do estudo experimental não apresentaram algumas das estruturas detectadas no Estudo Piloto 1, como a papila interdentária e as fibras colágenas da inserção conjuntiva. Este fato deve-se a remoção do tecido gengival palatino e vestibular para posteriores análises moleculares dos níveis de colonização pelo *A. actinomycetemcomitans*.

Os tempos experimentais considerados (7, 15 e 30 dias) foram assim determinados com o intuito de verificar as alterações dos tecidos periodontais no início do desenvolvimento da doença. A grande maioria dos estudos, consideram longos períodos de indução (8 semanas), que permitem que a doença seja instalada e grande perda óssea, em volume e em altura, inclusive nas áreas interproximais, sejam detectáveis por métodos de diagnóstico convencionais.⁷⁷⁻⁷⁹

Para o presente estudo, utilizou-se como referência, relatos de autores que observaram um elevado aumento do infiltrado inflamatório tecidual após 15 dias da indução da doença, embora não tenha sido realizada avaliação das alterações morfológicas.⁴⁹ A avaliação da distância JCE-COA pela análise tomográfica, morfométrica e histológica revelaram aumento significativo da distância JCE-COA após 15 e 30 dias da infecção. Esses resultados confirmam a viabilidade da OCT no monitoramento das alterações periodontais mesmo nos estágios iniciais da doença.

O modelo de indução da doença periodontal instituído mostrou-se efetivo, visto que o aumento da distância JCE-COA foi significativo, ao longo do

tempo, nos animais que foram inoculados pelo *A. actinomycetemcomitans*. Este padrão não foi observado no grupo controle veículos, que exibiram distâncias JCE-COA equivalentes nos diferentes tempos experimentais independente dos sítios de observação, fato que comprova a ação do *A. actinomycetemcomitans* na indução da doença. Convém ressaltar, que nos animais experimentais observou-se uma perda óssea horizontal progressiva, detectada nos tomogramas a partir de 15 dias, onde o OCT mostrou-se mais sensível que a análise morfométrica, sendo capaz de aferir diferenças de 86 μm e em 30 dias 100 μm , as quais só foram detectadas na análise morfométrica após 30 dias.

Nos tempos experimentais de 7 e 15 dias as alterações de perda tecidual na face vestibular foram sutis, ficando apenas mais evidente no grupo de 30 dias e especialmente na raiz distal do primeiro molar.

Houve concordância entre os resultados das mensurações das técnicas de OCT e morfométrica tanto no grupo controle negativo como nos grupos controle veículo e experimental ao longo de 7, 15 e 30 dias. Muito embora, a análise histomorfométrica não tenha demonstrado diferenças significantes da distância JCE-COA nos grupos controle veículo e experimental ao longo do tempo, tem-se a confirmação das diferenças histológicas entre esses grupos corroborando o processo de indução da doença periodontal.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo, permitiram verificar a viabilidade da técnica de OCT na avaliação das estruturas periodontais de camundongos e trouxeram alicerces para novos estudos e pesquisas no diagnóstico e monitoramento da doença periodontal, sendo uma proposta de grande relevância clínica.

7. Conclusão

No presente estudo foi possível induzir a doença periodontal em modelo animal (camundongos C57BL/6) e detectar, por meio da técnica de tomografia por coerência óptica, as alterações morfológicas dos tecidos periodontais, qualitativa e quantitativamente, após a indução da doença periodontal em diferentes tempos experimentais 7, 15 e 30 dias.

8. Referências Bibliográficas

1. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol.**4(1):1-6, 1999.
2. Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. **Dent Clin North Am.**49(3):517-532, 2005.
3. Burt B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. **J Periodontol.**76(8):1406-1419, 2005.
4. Susin C, Albandar JM. Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. **J Periodontol.**76(3):468-475, 2005.
5. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000.**38:135-187, 2005.
6. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontol 2000.**29:177-206, 2002.
7. Kuramitsu HK. Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. **Crit Rev Oral Biol Med.**14(5):331-344, 2003.
8. Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. Actinobacillus actinomycetemcomitans. **J Med Microbiol.**51(12):1013-1020, 2002.
9. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. **J Clin Microbiol.**45(12):3859-3869, 2007.
10. Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. **Periodontol 2000.**29:153-176, 2002.
11. Collins J, Carpio AM, Bobadilla M, et al. Prevalence of clinical attachment loss in adolescents in Santo Domingo, Dominican Republic. **J Periodontol.**76(9):1450-1454, 2005.
12. Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. **J Clin Periodontol.**9(6):472-481, 1982.
13. Cercek JF, Kiger RD, Garrett S, Egelberg J. Relative effects of plaque control and instrumentation on the clinical parameters of human periodontal disease. **J Clin Periodontol.**10(1):46-56, 1983.
14. Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. **Periodontol 2000.**25:37-58, 2001.
15. Vandenberghe B, Jacobs R, Yang J. Detection of periodontal bone loss using digital intraoral and cone beam computed tomography images: an in vitro assessment of bony and/or infrabony defects. **Dentomaxillofac Radiol.**37(5):252-260, 2008.
16. Colston BW, Jr., Everett MJ, Sathyam US, DaSilva LB, Otis LL. Imaging of the oral cavity using optical coherence tomography. **Monogr Oral Sci.**17:32-55, 2000.
17. Otis LL, Everett MJ, Sathyam US, Colston BW, Jr. Optical coherence tomography: a new imaging technology for dentistry. **J Am Dent Assoc.**131(4):511-514, 2000.
18. Colston BW, Jr., Everett MJ, Da Silva LB, Otis LL, Stroeve P, Nathel H. Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. **Appl Opt.**37(16):3582-3585, 1998.

19. Fercher AF, Hitzenberger CK, Drexler W, Kamp G, Sattmann H. In vivo optical coherence tomography. **Am J Ophthalmol.**116(1):113-114, 1993.
20. Mogensen M, Thrane L, Joergensen TM, Andersen PE, Jemec GB. Optical coherence tomography for imaging of skin and skin diseases. **Semin Cutan Med Surg.**28(3):196-202, 2009.
21. Velasco MV, Baby AR, Sarruf FD, et al. Prospective ultramorphological characterization of human hair by optical coherence tomography. **Skin Res Technol.**15(4):440-443, 2009.
22. Bouma BE, Tearney GJ, Yabushita H, et al. Evaluation of intracoronary stenting by intravascular optical coherence tomography. **Heart.**89(3):317-320, 2003.
23. Tearney GJ, Yabushita H, Houser SL, et al. Quantification of macrophage content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography. **Circulation.**107(1):113-119, 2003.
24. Ridgway JM, Armstrong WB, Guo S, et al. In vivo optical coherence tomography of the human oral cavity and oropharynx. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.**132(10):1074-1081, 2006.
25. Armstrong WB, Ridgway JM, Vokes DE, et al. Optical coherence tomography of laryngeal cancer. **Laryngoscope.**116(7):1107-1113, 2006.
26. Mahmood U, Ridgway J, Jackson R, et al. In vivo optical coherence tomography of the nasal mucosa. **Am J Rhinol.**20(2):155-159 Mar, 2006.
27. Drexler W. Ultrahigh-resolution optical coherence tomography. **J Biomed Opt.**9(1):47-74, 2004.
28. Lee C, Darling CL, Fried D. Polarization-sensitive optical coherence tomographic imaging of artificial demineralization on exposed surfaces of tooth roots. **Dent Mater.**25(6):721-728, 2009.
29. Ko AC, Choo-Smith LP, Hewko M, et al. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. **J Biomed Opt.**10(3):031118, 2005.
30. Freitas AZ, Zezell DM, Mayer MPA, Ribeiro AC, Gomes ASL, Vieira ND. Determination of dental decay rates with optical coherence tomography. **Laser Physics Letters.**6(12):896-900, 2009.
31. Shemesh H, van Soest G, Wu MK, Wesselink PR. Diagnosis of vertical root fractures with optical coherence tomography. **J Endod.**34(6):739-742, 2008.
32. de Melo LS, de Araujo RE, Freitas AZ, et al. Evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography. **J Biomed Opt.**10(6):064027, 2005.
33. Baek JH, Na J, Lee BH, Choi E, Son WS. Optical approach to the periodontal ligament under orthodontic tooth movement: a preliminary study with optical coherence tomography. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**135(2):252-259, 2009.
34. Na J, Lee BH, Baek JH, Choi ES. Optical approach for monitoring the periodontal ligament changes induced by orthodontic forces around maxillary anterior teeth of white rats. **Med Biol Eng Comput.**46(6):597-603, 2008.

35. Fujimoto JG, Drexler W, Schuman JS, Hitzenberger CK. Optical Coherence Tomography (OCT) in ophthalmology: introduction. **Opt Express**.17(5):3978-3979, 2009.
36. Fujimoto JG. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. **Nat Biotechnol**.21(11):1361-1367, 2003.
37. Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. **Oral Microbiol Immunol**.23(2):112-118, 2008.
38. Kamma JJ, Nakou M, Gmur R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol**.19(5):314-321, 2004.
39. Sliepen I, Hofkens J, Van Essche M, Quirynen M, Teughels W. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adhesion inhibited in a flow cell. **Oral Microbiol Immunol**.23(6):520-524, 2008.
40. Sliepen I, Van Essche M, Pauwels M, et al. Colonization of hard and soft surfaces by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* under hydrodynamic conditions. **Oral Microbiol Immunol**.23(6):498-504, 2008.
41. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Periodontol** 2000.20:136-167, 1999.
42. Iwase M, Korchak HM, Lally ET, Berthold P, Taichman NS. Lytic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human neutrophil cytoplasm. **J Leukoc Biol**.52(2):224-227, 1992.
43. Welch RA. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. **Mol Microbiol**.5(3):521-528, 1991.
44. Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Clin Periodontol**.29(7):657-660, 2002.
45. Haubek D, Ennibi OK, Vaeth M, Poulsen S, Poulsen K. Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Dent Res**.88(9):856-860 Sep 2009.
46. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V. The highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. **J Dent Res**.83(10):767-770 Oct 2004.
47. Cortelli SC, Costa FO, Kawai T, et al. Diminished treatment response of periodontally diseased patients infected with the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **J Clin Microbiol**.47(7):2018-2025, 2009.
48. Trombone AP, Ferreira SB, Jr., Raimundo FM, et al. Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. **J Periodontal Res**.44(4):443-451, 2009.
49. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs,

- RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiol Immunol.**21(1):12-20, 2006.
50. Queiroz-Junior CM, Pacheco CM, Fonseca AH, Klein A, Caliani MV, de Francischi JN. Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. **Mediators Inflamm.** 760837, 2009.
 51. Queiroz-Junior CM, Pacheco CM, Maltos KL, Caliani MV, Duarte ID, Francischi JN. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. **J Periodontal Res.**44(2):153-160, 2009.
 52. Cantley MD, Bartold PM, Marino V, et al. The use of live-animal micro-computed tomography to determine the effect of a novel phospholipase A2 inhibitor on alveolar bone loss in an in vivo mouse model of periodontitis. **J Periodontal Res.**44(3):317-322, 2009.
 53. Ziada H, Irwin C, Mullally B, Byrne PJ, Allen E. Periodontics: 4. Surgical management of gingival and periodontal diseases. **Dent Update.**34(7):390-396, 2007.
 54. Mullally B, Irwin C, Ziada H, Allen E, Byrne PJ. Periodontics: 3. Non-surgical periodontal therapy in general dental practice. **Dent Update.**34(6):326-335, 2007.
 55. Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. **J Clin Periodontol.**35(10):885-896, 2008.
 56. Xiang X, Sowa MG, Iacopino AM, et al. An update on novel non-invasive approaches for periodontal diagnosis. **J Periodontol.**81(2):186-198, 2009.
 57. Osborn JB, Stoltenberg JL, Huso BA, Aeppli DM, Pihlstrom BL. Comparison of measurement variability in subjects with moderate periodontitis using a conventional and constant force periodontal probe. **J Periodontol.**63(4):283-289, 1992.
 58. Osborn J, Stoltenberg J, Huso B, Aeppli D, Pihlstrom B. Comparison of measurement variability using a standard and constant force periodontal probe. **J Periodontol.**61(8):497-503,1990.
 59. Ziada H, Irwin C, Mullally B, Allen E, Byrne PJ. Periodontics: 1. Identification and diagnosis of periodontal diseases in general dental practice. **Dent Update.**34(4):208- 217, 2007.
 60. Jeffcoat MK, Jeffcoat RL, Captain K. A periodontal probe with automated cemento--enamel junction detection--design and clinical trials. **IEEE Trans Biomed Eng.**38(4):330-333, 1991.
 61. Jeffcoat MK, Reddy MS. A comparison of probing and radiographic methods for detection of periodontal disease progression. **Curr Opin Dent.**1(1):45-51, 1991.
 62. Hausmann E. Radiographic and digital imaging in periodontal practice. **J Periodontol.**71(3):497-503, 2000.
 63. Jeffcoat MK, Reddy MS. Advances in measurements of periodontal bone and attachment loss. **Monogr Oral Sci.**17:56-72, 2000.
 64. Benfica e Silva J, Leles CR, Alencar AH, Nunes CA, Mendonca EF. Digital subtraction radiography evaluation of the bone repair process of

- chronic apical periodontitis after root canal treatment. **Int Endod J.**43(8):673-680, 2010.
65. Corbet EF, Ho DK, Lai SM. Radiographs in periodontal disease diagnosis and management. **Aust Dent J.**54 Suppl 1:S27-43 Sep 2009.
 66. Angelieri F, de Cassia Goncalves Moleirinho T, Carlin V, Oshima CT, Ribeiro DA. Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. **Clin Oral Investig.** DOI 10.1007/s00784-009-0345-6, 2009.
 67. Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. **Science.**254(5035):1178-1181, 1991.
 68. Gimbel C. Optical coherence tomography diagnostic imaging. **Gen Dent.**56(7):750-757, 2008.
 69. Freitas AZ, Zezell D, Vieira Jr ND, Ribeiro AC, Gomes AS. Imaging carious human tissue with optical coherence tomography. **J Applied Physics.**99(2):24906, 2006.
 70. Kato IT, Mendes FM, Zezell DM, Freitas AZ, Raelle MP, Wetter NU. Inhibition of enamel remineralization with blue LED: an in vitro study. **Am J Ophthalmol.**7162, 2009.
 71. Fried D, Xie J, Shafi F, Featherstone JD, Breunig TN, Le C. Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography. **J Biomed Opt.**7(4):618-627, 2002.
 72. Otis L, Al-Sadhan RI, Meiers J, Redford-Badwal D. Identification of occlusal sealants using optical coherence tomography. **J Clin Dent.**14(1):7-10, 2003.
 73. Feldchtein FI, Gelikonov GV, Gelikonov VM, Iksanov RR, Kuranov RV, Sergeev AM. In vivo OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. **Opt Express.**3(6):239, 1998.
 74. Otis LL, Colston BW, Jr., Everett MJ, Nathel H. Dental optical coherence tomography: a comparison of two in vitro systems. **Dentomaxillofac Radiol.**29(2):85-89, 2000.
 75. Colston B, Sathyam U, Dasilva L, Everett M, Stroeve P, Otis L. Dental OCT. **Opt Express.**3(6):230-238, 1998.
 76. Otis LL, Colston B, Armitage GC, Everett M. Optical image of periodontal tissue. **J Dent Res.**76:386, 1997.
 77. Rogers JE, Li F, Coatney DD, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. **J Periodontol.**78(3):550-558, 2007.
 78. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. **J Periodontol.**78(6):1120-1128, 2007.
 79. Bendyk A, Marino V, Zilm PS, Howe P, Bartold PM. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. **J Periodontal Res.**44(2):211-216, 2009.



Parecer - Projeto N° 46/CEPA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"IMAGEAMENTO ÓPTICO DAS ESTRUTURAS PERIODONTAIS DE CAMUNDONGOS"** de responsabilidade da pesquisadora **ADRIANA DA COSTA RIBEIRO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEPA.

São Paulo, 13 de agosto de 2009



Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Linus Pauling, 2416 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7722 - telefax: (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 154 nas fls. 78 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Márcia P.A. Mayer, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Imageamento óptico da perda óssea alveolar na periodontite induzida em camundongos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Thalita Thereza Soares D'Epiro, Adaiana Maisto e os pesquisadores Adriana da Costa Ribeiro, Anderson Zanardi de Freitas**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **17.11.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de novembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

