



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATALI ELISABETE ITO

**ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO OSSO ALVEOLAR DE RATOS
SUBMETIDOS À PERIODONTITE EXPERIMENTAL E FOTOTERAPIA A 940NM**

Londrina
2015

NATALI ELISABETE ITO

**ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO OSSO ALVEOLAR DE RATOS
SUBMETIDOS À PERIODONTITE EXPERIMENTAL E FOTOTERAPIA A 940NM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Departamento de Odontologia da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Solange de Paula
Ramos .

Londrina
2015

NATALI ELISABETE ITO

**ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO OSSO ALVEOLAR DE RATOS
SUBMETIDOS À PERIODONTITE EXPERIMENTAL E FOTOTERAPIA A 940NM**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Odontologia da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a Dr^a. Solange de Paula
Ramos.

Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a. Graziela Sciantti Ceravolo.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de Outubro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, foi ele quem me deu e dá forças para continuar e perseverar os meus sonhos, e conseguir realizar esse foi mais um deles, também pelas pessoas que colocou em minha vida durante este período, com todas as coisas que vivi e aprendi e vou levar para sempre comigo.

Ao meu pai Marco Antonio Ito por todo apoio, incentivo, dedicação, amor e carinho sendo um alicerce fundamental para essa conquista. Sem ele nada disso teria acontecido.

Minha mãe Sandra Cristina Fumie Murata Ito (In memorian), Posso não te la mais no plano físico mas sei o quanto vibra por essa vitória e torce por mim, e essa concretização sempre foi um sonho e que hoje posso retribuir todo amor e dedicação que sempre teve comigo.

Aos meus irmãos Naiana Ito e Marcos Miguel Ito, por todo incentivo, palavras, conselhos e mesmo em períodos difíceis na faculdade sempre me apoiaram. Essa vitória também é de vocês.

A minha família e meus amigos que sempre me incentivaram e torceram por mim.

Aos amigos que fiz durante esses anos de faculdade e que foram uma família aqui para mim, e espero levar para vida toda, nunca irei me esquecer de cada um, e serão sempre lembrados por terem feito parte de uma grande etapa de minha vida.

A minha orientadora Professora Solange De Paula Ramos por passar um pouco do seu conhecimento, pelo suporte e amizade, meus sinceros agradecimentos.

Obrigada a todos os professores do curso de odontologia da UEL (2011-2015) que contribuíram para minha formação como cirurgiã-dentista.

Meus agradecimentos também aos funcionários do setor de limpeza, da portaria, setor de prontuários, administrativo e colegiado, às meninas da central de medicamentos e esterilização, ao pessoal do laboratório de prótese e todos que tiveram na UEL durante este período.

ITO, Natali Elisabete. **Análise microtomográfica do osso alveolar de ratos submetidos à periodontite experimental e fototerapia a 940nm**. 2015. 36 folhas. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2015.

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela destruição das estruturas de suporte dentário (epitélio juncional, ligamento periodontal, osso alveolar e cimento), com formação de bolsas periodontais, aumento da mobilidade dentária podendo causar perda do elemento dentário. O tratamento consiste em técnicas de raspagem, para remoção da placa bacteriana e descontaminação da superfície radicular, podendo ou não requerer tratamento cirúrgico para reconstituição da morfologia dos tecidos periodontais. A fototerapia é uma modalidade terapêutica com atividade anti-inflamatória, promovendo a regeneração e reparo dos tecidos conjuntivos por meio da estimulação da síntese de matriz extracelular e proliferação celular. Sendo assim, a fototerapia pode promover a redução do quadro inflamatório e estimular o reparo dos tecidos ósseos e periodontais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo do tecido ósseo periodontal irradiado a 940nm (4J/cm², 4J) após indução de doença periodontal. Foram utilizados 12 ratos Wistar machos, pesando aproximadamente 350 gramas, divididos em grupos: P (periodontite, n=2), PR (periodontite e raspagem, n=5), PRL (periodontite, submetido a raspagem e LEDterapia, n=5). Os animais dos grupos P, PR e PRL foram anestesiados e realizada a amarra subgingival dos primeiros molares superiores direito e esquerdo com fios de amarra ortodôntica, mantidos em posição durante 14 dias. Dois animais do grupo foram sacrificados aos 14 dias para avaliação da formação de bolsas periodontais. Após este período foi realizada raspagem e LEDterapia nos demais grupos que foram eutanasiados 28 dias após o início da experimentação. Foi realizada análise microtomográfica do volume ósseo e área de superfície óssea nas regiões interproximais e interradiculares. As diferenças entre os grupos foram comparadas com teste T de student sendo consideradas significantes quando P<0.05. Não foram observadas diferenças no volume ósseo entre os grupos PR e PRL, no entanto o grupo PRL apresentou um aumento significativo na área de superfície óssea. Os resultados sugerem que a LEDterapia a 940nm pode aumentar a síntese de matriz calcificada de osso, acelerando o processo de reparo periodontal.

Palavras-chave: Fototerapia. Doença Periodontal. Regeneração. Reparo tecidual.
Inflamação

ITO, Natali Elisabete. **Microtomographic analysis of the alveolar bone of rats submitted to experimental periodontitis and phototherapy at 940nm**. 2015. 36 pages. Dissertation (Odontology) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina,2015.

ABSTRACT

The periodontitis is a chronic inflammatory disease characterized by the destruction of periodontium (junctional epithelium, periodontal ligament, alveolar bone and cementum), development of periodontal pockets and increase teeth mobility, that may lead to tooth loss. The treatment is the root scaling in order to remove dental plaque and decontaminate the root surface, associated or not with surgical treatment to reconstitute the periodontal contour. In this way, phototherapy is a therapeutic approach that elicits antiinflammatory actions, promoting connective tissue regeneration and repair by means of matrix synthesis and cell proliferation. The phototherapy may promote the reduction of inflammatory reactions and repair of bone and periodontal tissues. The aim of this work was to evaluate the repair of periodontal bone irradiated at 940nm ($4\text{J}/\text{cm}^2$, 4J) after induction of periodontal disease. Twelve male Wistar rats, weighing 350 g, were allocated in groups: P (periodontitis, n=2), PR (periodontitis and scaling and root planing, n=5), PRL (periodontitis, scaling and root planing and LEDtherapy, n=5). The animals of P, PR e PRL were anesthetized and submitted tooth orthodontic ligation in the left and right upper first molars maintained in position during 14 days. Two animals were killed after 14 days to evaluate formation of periodontal pockets. Animals were submitted to scaling and root planing with or without LEDtherapy and euthanized at 28 days. The microtomographic were realized to determine the bone volume and bone surface area in the interproximal and interradicular areas. The differences between groups were tested with T Student test considering $P < 0.05$. There was no differences in bone volume between PR and PRL groups. However, the PRL group presented increased bone surface area. The results suggested that LEDtherapy at 940nm may increase the synthesis of calcified bone matrix, accelerating the periodontal repair.

Keywords: Phototherapy. Periodontal disease. Regeneration. Tissue repair. Inflammation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RAR	Raspagem e alisamento radicular
LED	Diodo emissor de luz
LPS	Lipopolissacarídeos
MMPs	Metaloproteinases
COX-2	Ciclooxigenase 2
PGE2	Prostaglandina E2
IL-8	Interleucina-8
LT	Toll Like Receptor
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
TH1	Resposta imune adaptativa com padrão 1
MICRO CT	Microtomografia computadorizada
LASER	Amplificação de luz estimulada por emissão de radiação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 IDENTIFICAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL	13
1.2 REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL.....	14
1.3 DIMINUIÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA NA DOENÇA PERIODONTAL:ESTUDOS MICROTOMOGRÁFICOS	16
1.4 FOTOTERAPIA.....	17
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	22
4.2 SEDAÇÃO,ANESTESIA.....	22
4.3 RASPAGEM.....	23
4.4 FOTOTERAPIA.....	23
4.5 EUTANÁSIA.....	23
4.6 MICROTOMOGRAFIA.....	24
4.7 ESTATÍSTICA.....	24
5 RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 IDENTIFICAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal crônica ou periodontite apresenta alta prevalência na população adulta (acima de 30 anos), com estimativas a ser observada em 47 a 70% da população, dependendo da ferramenta de coleta de dados utilizada. Considerando a profundidade de sondagem acima de 3mm como critério de diagnóstico, 72% da população apresenta pelo menos um dente com doença periodontal. No entanto, a profundidade de sondagem superior a 5mm (doença periodontal avançada), afetando um ou mais dentes pode ser observada em aproximadamente 21 a 42% da população adulta (PETER *et al.*, 2014).

A periodontite é definida como uma doença inflamatória crônica, provocada pelo acúmulo de placa bacteriana, induzindo a destruição dos tecidos do periodonto de inserção, incluindo a degeneração do ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar (ARMITAGE, 1999). O biofilme dental apresenta uma microbiota complexa e inter-relacionada entre si e com a profundidade de sondagem, composta por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas micra*, *Agregatibacter sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Campylobacter sp.*, *Prevotella sp.*, entre outros (POLLANEN *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2012; LOOZEN *et al.*, 2014). A medida que a superfície dentária é colonizada, a composição e virulência da placa bacteriana é alterada, com a transição do biofilme predominante gram-negativo para gram-negativa anaeróbica (POLLANEN *et al.*, 2012). No entanto, fatores de risco individuais (idade, gênero, diabetes, obesidade, predisposição genética, consumo de álcool e fumo) também contribuem para o aumento da prevalência e severidade da doença periodontal (GENCO E BORGNAKKE , 2013).

A colonização da superfície dentária por microorganismos promove o recrutamento de liberação de mediadores inflamatórios, citocinas e enzimas (HIRSCHFELD *et al.*, 2015). Alterações no tecido conjuntivo, devido a ativação de receptores do tipo Toll-like (TL), e receptores ativados por proteinases por produtos bacterianos, induzem a produção de mediadores inflamatórios (interleucina-8 [IL-8], interleucina-1beta [IL-1 β]), alterações vasculares, recrutamentos de células inflamatórias. A presença de mediadores inflamatórios inibe a proliferação de

fibroblastos, a produção de matriz extracelular e promove a produção de metaloproteínas que resultam na degradação da matriz extracelular (POLLANEN *et al.*, 2012). O recrutamento e ativação de neutrófilos e macrófagos para o tecido periodontal e sulco gengival, provoca a destruição do tecido periodontal por liberação de grânulos contendo enzimas (mieloperoxidase, elastase, gelatinase etc) e por estresse oxidativo (BENAKANAKERE E KINANE, 2012). O estímulo inflamatório crônico provocado pelos periodontopatógenos promove a estimulação da resposta imune adaptativa, com o recrutamento de linfócitos T e B. O desenvolvimento da resposta imune adaptativa com padrão 1 (TH1), ou resposta imune celular, está associado a progressão da periodontite, com a produção de citocinas inflamatórias e ativação de macrófagos.

A periodontite é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, aterosclerose e o infarto agudo do miocárdio. Em pacientes com periodontite que desenvolveram infarto agudo do miocárdio é observado um aumento significativo dos níveis de marcadores inflamatórios circulantes, incluindo a proteína C reativa (73%) e o fator de necrose tumoral alfa (134.3%) em relação aos pacientes não periodontopatas (EL-BESHISHY *et al.*, 2014). Um estudo em pacientes japoneses revelou que existe uma associação entre a aterosclerose e doença periodontal, sendo que o aumento da profundidade de sondagem (perda de inserção) apresentou associação com o aumento de espessura e rigidez da carótida (HAYASHIDA *et al.*, 2013).

A eliminação do biofilme subgengival, por meio de técnicas de curetagem e raspagem, e a descontaminação da superfície dentária radicular constitui a principal modalidade terapêutica no tratamento da periodontite em bolsa periodontais com profundidade até 5mm (HAYASHIDA *et al.*, 2013). O processo de reparo do tecido periodontal é lento e a proliferação do epitélio do sulco gengival induz a formação de um epitélio juncional longo.

1.2 REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL: MEDIADORES INFLAMATÓRIOS QUE PROVOCAM ATIVAÇÃO DE OSTEOCLASTOS E REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL

A doença periodontal possui mecanismos com interações complexas, dentre eles produtos bacterianos, células do hospedeiro e fatores biológicos ativos localmente produzidos, mediadores químicos, como as prostaglandinas e citocinas, contribuindo para a progressão da doença, causando reabsorção óssea entre outros. Para que ocorra a reabsorção óssea, os osteoclastos devem ser ativados e recrutados para reabsorverem matriz de tecido mineralizado. Os osteoblastos controlam, indiretamente, a atividade reabsortiva por meio de sinalizações tanto autócrinas quanto parácrinas, com produção local de citocinas e prostaglandinas envolvidas no recrutamento e na maturação dos osteoclastos. Intervenções farmacológicas são muitas vezes utilizadas como coadjuvantes na terapia da doença periodontal, controlando a produção de mediadores inflamatórios (GURGEL *et al.*, 2005).

Algumas substâncias naturais, possuem ações terapêuticas, como a quercetina, um flavonóide que é encontrado na dieta humana (frutas, legumes, cereais) e possui dentre as propriedades a ação anti-inflamatória (BEHLING *et al.*, 2008). Em um estudo experimental, o qual visava avaliar o efeito da quercetina sobre a destruição periodontal em ratos, foi possível analisar que houve diminuição na formação de osteoclastos quando a quercetina foi administrada aos animais. Muitos osteoclastos com lacunas de reabsorção foram facilmente observadas na superfície alveolar em ratos que receberam 5 mg /ml de LPS (Lipopolissacarídeos), enquanto que a formação de osso foi observada nas superfícies dos alvéolos em ratos que não receberam nenhum LPS, o tratamento com quercetina (75 mg/kg) reduziu o número de osteoclastos induzida por LPS (CHENG *et al.*, 2010). Esses resultados sugerem que o uso de terapia anti-inflamatória pode inibir a reabsorção do tecido ósseo periodontal.

Certos fármacos não-esteroides anti-inflamatórios são usados em tratamento periodontal, alterando a progressão da doença, sendo assim uma boa alternativa para se utilizar como uma terapia coadjuvante (CHENG *et al.*, 2010). O uso de inibidores da cicloxigenase- 2 (COX-2) seletivos sob a forma de aplicação local, tais como: pastas dentífricas, géis, soluções de bochecho, dispositivos de liberação lenta, e aplicação tópica, podem ser eficazes ou podem fornecer benefícios como agentes adjuvantes para terapia mecânica, evitando ou reduzindo a perda de osso e os efeitos secundários de seu uso sistêmico (LIU *et al.*, 2010). Num experimento

reproduzindo periodontite em ratos, observou-se que Lumiracoxib, um inibidor altamente seletivo da COX-2, foi eficaz na redução do infiltrado inflamatório, destruição das fibras de colágeno, cemento e reabsorção óssea na área de bifurcação. Os efeitos do Lumiracoxib sobre a doença periodontal humana têm sido pouco examinado, assim, novos estudos são necessários para entender o papel desta droga na fisiopatologia da doença periodontal crônica e durante a cicatrização periodontal a longo prazo. (GARCIA *et al.*, 2010).

Algumas substâncias acabam induzindo a doença periodontal, como é o caso das metaloproteinases de matriz (MMPs), que compõem uma grande família de cálcio dependente, contendo zinco- endopeptidase. Dentre os processos patológicos que acometem a cavidade bucal e envolvem a participação das MMPs, destacam-se a destruição tecidual periodontal, lesões de cárie radicular, metástases em alguns tipos de tumores e as desordens da articulação temporomandibular (NAVARRO *et al.*,2006).

Segundo um estudo tendo como objetivo investigar a expressão e localização de MMP-8 e MMP-13 durante o desenvolvimento de periodontite induzida por ligadura em ratos, durante 21 dias, e analisar as correlações de inibidores de metaloproteinases com a MMP-8 e MMP-13 em periodontite. A MMP-13 pode estar envolvida na destruição do osso alveolar, bem como na remodelação do osso fisiológico e a MMP-8 é expressa principalmente neutrófilos e pode estar associado com a destruição da gengiva durante a inflamação. Os resultados do presente estudo indicam que o inibidor de metaloproteinase pode regular a MMP-13 na periodontite, mas não MMP-8. (YANG *et al.*, 2013). Há um interesse crescente no desenvolvimento de pesquisas de inibidores biológicos de MMPs que possam ser utilizados com sucesso e segurança na clínica odontológica (NAVARRO *et al.*,2006).

1.3 DIMINUIÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA NA DOENÇA PERIODONTAL: ESTUDOS MICROTOMOGRÁFICOS

A destruição tecidual que ocorre em modelos de ligadura experimental em ratos, do mesmo modo que na doença periodontal em humanos, está associada com a resposta do hospedeiro, expressa com a formação de um infiltrado inflamatório na gengiva antes da reabsorção óssea. Nos ratos, a perda dos tecidos

de inserção e óssea ocorrem num período de 7 dias. Assim como na periodontite em humanos, a perda óssea alveolar nos modelos de ligadura dependem da presença de bactérias (BEZERRA *et al.*, 2002). A distinção entre tecido ósseo e os demais tecidos se dá pela propriedade de mineralização da matriz permitindo a formação de um tecido duro (ROSS ROMREL,1993). A reparação óssea é mais lenta em relação ao de tecidos moles, pois há diferença na morfologia e composição tecidual. O tecido ósseo possui enorme capacidade de regeneração, permitindo a restauração e função original (PINHEIRO *et al.*, 2003). Há vários métodos para se obter a perda óssea alveolar, entre alguns deles podemos citar os histológicos, morfométricos e radiológicos.

Porém, estes fornecem informações bidimensionais (2D) de uma estrutura tridimensional (3D). A microtomografia computadorizada (micro-CT) vêm sendo utilizada como uma nova técnica de se avaliar as estruturas 3D dos tecidos duros, podendo construir um osso e analisar os dados com alta precisão, sem danificar a estrutura. A tecnologia 3D é uma ferramenta poderosa para a análise quantitativa e qualitativa da morfologia do osso alveolar (FERNANDES P.G,2014). As imagens reconstruídas fornecem informações 3D sobre tecidos rígidos internos (LIU *et al.*, 2010), sendo assim, podemos obter medidas da altura do osso, densidade óssea, estrutura óssea, trabeculado ósseo, superfície do tecido, matriz tecidual, volume do tecido entre outros.

1.4 FOTOTERAPIA

O tratamento utilizando o *Laser (Light-Amplification of Stimulated Emission Radiation)* de baixa intensidade têm sido utilizada como uma modalidade terapêutica para promover a cicatrização de feridas desde 1970 (CHANG *et al.*, 2013).

O diodo emissor de luz (LED – *Light-emitting diode*) é um dispositivo semicondutor que emite uma luz de baixa intensidade variando comprimentos de onda espectro ultravioleta ao infravermelho. Foi demonstrado que a luz emitida por LEDs facilita a reparação de feridas por meio da estimulação da passagem de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial, promovendo o aumento da síntese de ATP e promovendo a síntese de colágeno e inibindo a expressão das MMPs. Sendo utilizado na reparação dos tecidos conjuntivos (CHANG *et al.*, 2013).

A LEDterapia promove a neoformação óssea e revascularização, aumentando a quantidade de cálcio, fósforo, colágeno e trabéculas ósseas. No entanto, o mecanismos de atuação sobre a neoformação óssea ainda não está totalmente esclarecida (TRELLES *et al.*, 1987). Os dispositivos terapêuticos com LED demonstram atividades anti-inflamatória e promovem a estimulação de regeneração e reparo tecidual, em comprimentos de onda variando de 604 a 940nm (KARU, 1987; WHELAN *et al.*, 2003). A fototerapia utilizando lasers promovem efeitos pró-regenerativos sobre o tecido ósseo *in vivo* e *in vitro* (BARBOS PINHEIRO *et al.*, 2003; PIRES OLIVEIRA *et al.*, 2008; POPPI *et al.*, 2011). A fototerapia induz a diferenciação e proliferação de osteoblastos (BOUVET-GERBETTAZ *et al.*, 2009; PIRES OLIVEIRA *et al.*, 2011), acelera a deposição e remodelamento da matriz óssea (BARBOS PINHEIRO *et al.*, 2003; HABIB *et al.*, 2010; POPPI *et al.*, 2011).

Um recente estudo em ratos demonstrou que a administração de laserterapia (808nm, 10J) pode promover redução significativa do infiltrado inflamatório e número de osteoclastos, além de aumento da área de osso neoformado e deposição de colágeno, em lesões de furca induzidas experimentalmente (THEODORO *et al.*, 2015). A LEDterapia pode melhorar o processo de cicatrização de lesões do tecido periodontal, podendo aumentar a diferenciação de células mesenquimais em fibroblastos (CASALECHI *et al.*, 2009; VINCK *et al.*, 2003).

Outra pesquisa realizada avaliou quantitativamente os efeitos do laser (660 nm) sobre a atividade das células do osso dos ratos durante o período inflamatório. Os resultados indicaram que o volume do osso, volume osteóide, número osteoclastos foi maior no grupo irradiado, indicando que houve aumento a atividade nas células ósseas em torno do local da lesão. Porém não houve alterações significativas na espessura trabecular, número trabecular e separação trabecular, nem na arquitetura óssea com índices estruturais normais (NICOLAU R. A *et al.*, 2003).

A atuação da terapia de baixa potência na periodontia usada como coadjuvante ao tratamento convencional não cirúrgico reduzindo os processos inflamatórios de origem infecciosa ou traumática, se dá principalmente em relação a regeneração tecidual e óssea, efeito anti-inflamatório e analgésico, estímulo da microcirculação sanguínea, vasodilatação e angiogênese, além da ação sobre a síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas E2 (PGE2) COX-2 e IL-

1β. Além disso, a LEDterapia expressa significativa melhora da sensibilidade dentinária decorrente do processo de raspagem e alisamento radicular (RAR, e quando associada com a RAR, obteve uma redução da perda óssea e da inflamação, estimulando a reparação do tecido gengival e do ligamento periodontal (PRATES ARAUJO RENATO *et al.*, 2012).

No entanto, os efeitos locais da LEDterapia sobre a deposição de matriz óssea calcificada periodontal ainda não foi totalmente esclarecida. Considerando que a LEDterapia é administrada com diodos que podem irradiar áreas mais amplas de tecido, além de possuir custo reduzido em relação ao laser (KARU, 1987), esta modalidade de tratamento pode ser clinicamente viável como adjuvante do tratamento periodontal.

2 JUSTIFICATIVA

A doença periodontal, possui uma alta prevalência na população, e que se não tratado corretamente pode levar até a perda dentária, sendo de grande interesse que se obtenha novos métodos que auxiliem no reparo periodontal.

3 OBJETIVOS

Objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do tecido ósseo durante o processo de reparo da doença periodontal induzida em ratos com e sem aplicação de fototerapia a 940 nm.

4 METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos a apreciação e aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina, sob o protocolo CEUA nº 8182.2015.89.

4.1 Animais e grupos experimentais

Ratos Wistar, aproximadamente 350 gramas, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no biotério de experimentação animal do departamento de Histologia/CCB/UEL. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, alimentados com ração e água potável à vontade. O ambiente foi mantido a aproximadamente numa temperaturas de 25°C, em regime de luz/escuridão de 12 horas.

Foram utilizados 12 ratos Wistar e divididos em 3 grupos:

Grupos experimentais:

- Grupo Periodontite- P (n=2): animais submetidos à periodontite experimental e eutanasiados após 14 dias.
- Grupo Raspagem- PR (n=5): animais submetidos à periodontite experimental durante 14 dias, raspagem e eutanasiados após 28 dias.
- Grupo Raspagem + LEDterapia- PRL (n=5): animais submetidos à periodontite experimental durante 14 dias, raspagem e LEDterapia e eutanasiados após 28 dias.

4.2 Sedação, anestesia

Os animais dos grupos P, PR e PRL foram anestesiados com solução de cloridrato de quetamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/Kg), via intramuscular, na região de intraperitoneal. Após a sedação e anestesia, foi realizado a amarra dos primeiros molares superiores direito e esquerdo, com fio ortodôntico 0.20mm. O fio foi passado pelo espaço interproximal entre o primeiro e segundo molar e trançado na face

mesial do primeiro molar sendo inserido na região subgengival utilizando sonda clínica número 5, à fim de induzir uma reação inflamatória associada ao acúmulo de placa no periodonto de inserção dos molares superiores. O fio permaneceu em posição durante 14 dias. Após este período, os animais foram novamente anestesiados para remoção do fio de amarração, procedimentos de raspagem periodontal e/ou aplicação de LEDterapia (fototerapia).

4.3 Raspagem Periodontal

O procedimento de raspagem foi realizado com o uso de micro curetas Gracey (número 13 e 14) nos grupos PR e PRL, inserindo a ponta ativa da microcureta nas faces mesial, distal, vestibular e lingual dos primeiros molares superiores. Foram realizados 10 movimentos de raspagem contra a superfície radicular, sem realizar compressão no sentido apical. O procedimento foi realizado em uma única sessão, após a remoção da amarração, com os animais anestesiados.

4.4 Fototerapia

Foi utilizado um aparelho protótipo confeccionado com LED desenvolvido pelo laboratório de Óptica e Opticoeletrônica do Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina, que consiste de um dispositivo com seis diodos emissores de luz com 16.6mW de potência, a área irradiada foi de 1cm², com intensidade de 4J/cm², densidade de 9,5 mW/cm. A fototerapia foi aplicada imediatamente após a remoção da amarração e raspagem do grupo PRL (14 dias), com a fonte emissora de luz posicionada perpendicularmente sobre o primeiro molar superior direito e esquerdo, a uma distância de 1 cm², durante 4 minutos em cada lado. O comprimento de onda utilizado foi de 940nm.

4.5 Eutanásia

A indução da eutanásia ocorreu 14 dias após a remoção da amarração do grupo P, e 28 dias depois nos grupos PR e PRL, por injeção intramuscular de sobredosagem de solução anestésica de cloridrato de quetamina e xilazina), via intramuscular, na região de intraperitoneal. (2ml/kg). Imediatamente após a avaliação do estado de

inconsciência do animal (ausência de reflexos motores ao estímulo mecânico nas patas traseiras). Após a constatação do óbito do animal (ausência de reflexos motores e parada cardiorrespiratória) amostras de maxila foi imediatamente coletada.

4.6 Avaliação Microtomográfica

As maxilas esquerdas foram removidas e mantidas em formalina tamponada durante 24h e depois colocadas em álcool 70% até a realização da microtomografia. A tomografia do osso alveolar maxilar foi realizada como descrito por Park (2007) (Park *et al.*, 2007). Uma varredura de micro CT - scanner num plano para sagital aproximado através dos dentes foi completada para cada amostra, produzindo uma vista bucal para lingual da maxila de rato que se assemelha a vista habitualmente obtida em radiografias periapicais. 10 imagens uniformemente espaçadas foram capturadas da raiz e do osso alveolar entre molares. As imagens de micro-CT dos ratos foram usadas para a técnica de sobreposição usando software comercial de análise de imagens médicas 3D (Ratoc, Ratoc System Engineering, Tóquio, Japão). Os índices medidos determinaram a localização e volume da perda mineral.

4.7 Análise Estatística

A distribuição de normalidade dos dados foi avaliada por meio de teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados com distribuição paramétrica foram comparados com o teste ANOVA e pos hoc de Tukey. Para dados com distribuição não-paramétrica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pos hoc de Dunn. Diferenças entre grupos foram consideradas significantes se $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

Após 14 dias, dois animais foram sacrificados para avaliação da presença de doença periodontal, grupo P (figura 1). A imagem microtomográfica revelou a presença de bolsas periodontais nas regiões distal, mesial e faces livres dos primeiros molares (figura 2 e 3). A região de escolha para realização da microtomografia do tecido ósseo foi a cortical óssea distal, devido a presença de bolsas mais profundas nestas regiões.

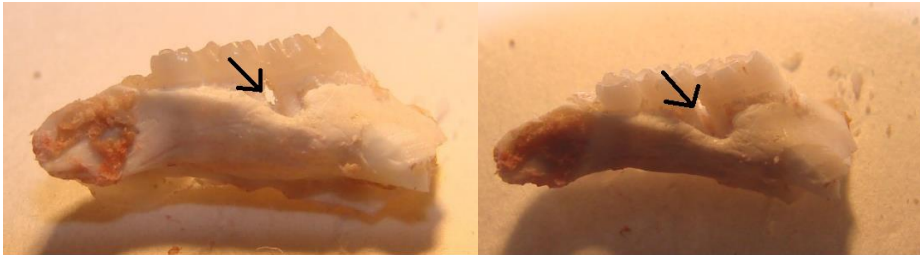


Figura 1. Vista vestibular e palatina de molares superiores de rato Wistar submetidos a amarraria para indução de doença periodontal. Presença de bolsa intraóssea na cortical óssea distal (seta).

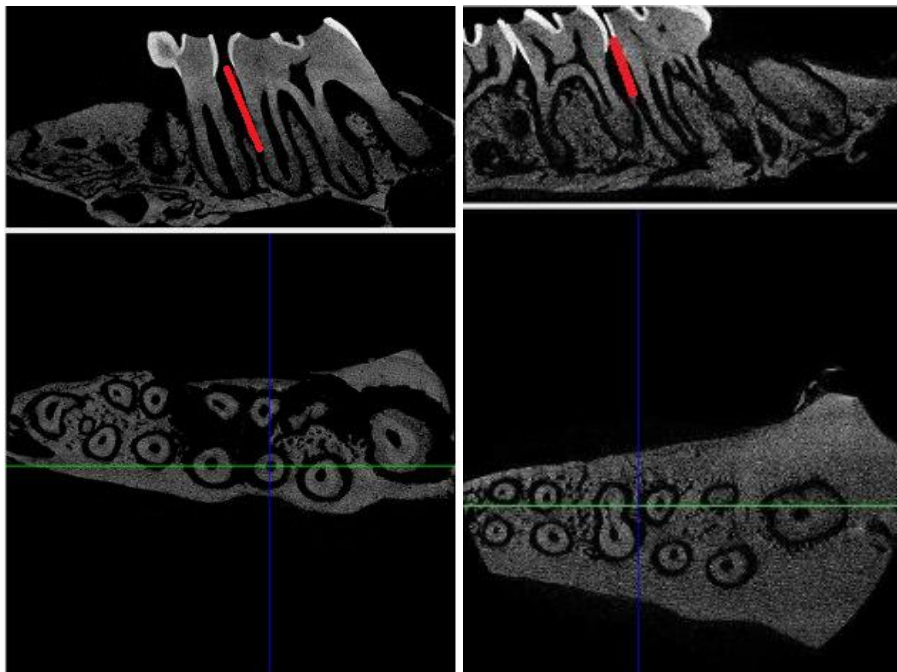


Fig 2.

Fig 3.

Figura 2. Análise microtomográfica do primeiro molar superior esquerdo de rato Wistar submetido a amarraria para indução experimental da doença periodontal,

durante 14 dias, raspagem e eutanasiados após 28 dias. A imagem demonstra cortes no plano oclusal, disto mesial e vestibulo palatina. Áreas de reabsorção óssea (linha vermelha) puderam ser identificadas na cortical óssea distal.

Figura 3. Análise microtomográfica do primeiro molar superior esquerdo de rato Wistar submetido a amarraria para indução experimental da doença durante 14 dias, raspagem e LEDterapia e eutanasiados após 28 dias. A imagem demonstra cortes no plano oclusal, disto- mesial e vestibulo palatina. Áreas de reabsorção óssea (linha vermelha) puderam ser identificadas na cortical óssea distal, sendo menor do que a encontrada no grupo periodontite e raspagem.

Os animais dos grupos PR e PRL foram sacrificados 28 dias após a indução da periodontite. A análise microtomográfica demonstrou que não houve diferenças significativas no volume de matriz óssea mineralizada por área de tecido ósseo (Teste T de Student, $P > 0.05$) entre os grupos irradiados e não irradiados (figura 4).

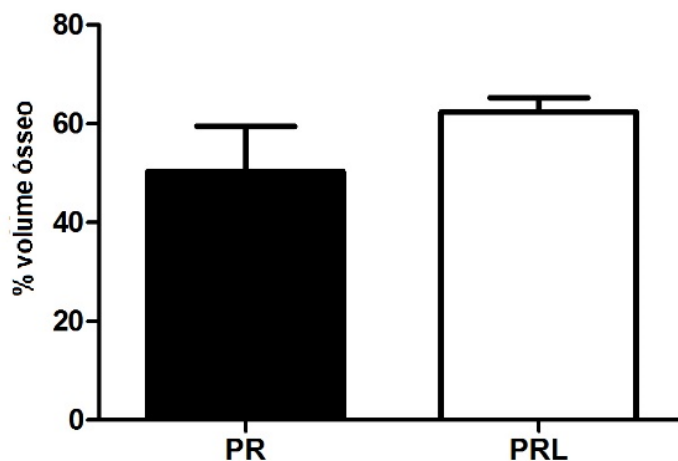


Figura 4. Avaliação microtomográfica da porcentagem de osso na região de base da bolsa periodontal distal de ratos submetidos a periodontite experimental e raspagem (PR n=5) e raspagem com LEDterapia (PRL n=5). Teste T de Student ($P > 0.05$).

No entanto, a LEDterapia promoveu o aumento da área de superfície de matriz óssea mineralizada ($P < 0.05$, Teste T de Student), sugerindo que a

LEDterapia possa estar promovendo uma aceleração no processo de formação de centros de calcificação (figura 5).

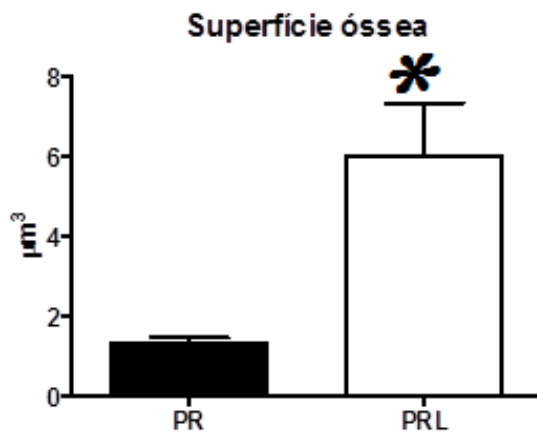


Figura 5. Avaliação microtomográfica das áreas de superfície ósseas em calcificação na região de base da bolsa periodontal distal de ratos submetidos a periodontite experimental e raspagem (PR n=5) e raspagem com LEDterapia (PRL n=5). Teste T de Student ($P < 0.05$).

DISCUSSÃO

A partir do presente estudo foi observado que a LEDterapia a 940nm aplicada durante o processo de reparo da doença periodontal não promoveu aumento da densidade óssea, observado pelo volume ósseo total. No entanto, o rastreamento das áreas de superfície óssea por volume de tecido periodontal investigado indicam formação de mais centros de ossificação no grupo de animais irradiados.

De acordo com Giordano, 2001 a fototerapia é provavelmente absorvida na cadeia respiratória mitocondrial, aumentando o metabolismo celular, podendo ocasionar aumento da transdução de sinais e outras regiões celulares, e estimulando o reparo tecidual ósseo.

A LEDterapia adjunta a doença periodontal tem sido estudada por vários autores que comprovam sua eficácia, promovendo o reparo dos tecidos periodontais e regeneração óssea (ZARE, D *et al.*,2014; SOTO-BARRERAS, U. *et al.*,2013; PRATES A. R. *et al.*,2012).

Theodoro, 2015 realizou um estudo demonstrando que a administração de laserterapia (808nm, 10J) promoveu uma redução significativa do infiltrado inflamatório e número de osteoclastos, além de aumento da área de osso neoformado e deposição de colágeno, em lesões de furca induzidas experimentalmente.

Diamantino, 2010 em uma pesquisa de Mestrado, avaliou que a terapia a laser em defeitos ósseos promovidos cirurgicamente em fêmur de ratos resultou em reparo ósseo, maior quantidade de tecido neoformado, arquitetura óssea e maturação mais avançada na área de reparo, não havendo significância na densidade óssea. O mesmo foi observado no presente estudo.

Outro estudo semelhante realizado por Nicolau, 2003 onde avaliou quantitativamente os efeitos do laser (660 nm) sobre a exposição do fêmur perfurado com broca cirúrgica. Os resultados indicaram que o volume do osso, volume osteóide, número de osteoclastos foi maior no grupo irradiado, indicando aumento das atividade nas células ósseas em torno do local da lesão. Porém não houve alterações significativas na espessura trabecular, número trabécula e separação trabecular, nem na arquitetura óssea. Entretanto no presente trabalho, a espessura trabecular houve alterações significativas. Podendo sugerir que a quantidade de

energia utilizada no presente trabalho, possa ter levado ao aumento do trabeculado, porém mais estudos devem ser realizados.

Pires, 2009 determinou a ação do laser (904 nm) na reparação óssea da tíbia de ratos. Observando a aceleração do processo de reparação de fraturas, especialmente na fase inicial da regeneração óssea. O desenvolvimento de novas técnicas para acelerar o processo de reparação óssea tem proporcionado significativo avanço no tratamento sobre os efeitos bioestimulantes no osso.

Karu, 1995 descreveu que o benefício da aplicação da LEDterapia no processo de maturação óssea se dá nos estágios iniciais de reparo ósseo, estando relacionado a secreção de matriz colágena, proliferação e diferenciação celular. No entanto, o curto prazo de reparo ósseo observado no presente estudo pode não ter sido suficiente para observar alterações significativas no volume total de tecido calcificado.

CONCLUSÃO

Baseado nos parâmetros empregados e nos resultados obtidos pode-se concluir que a LEDterapia a 940 nm pode proporcionar um efeito reparador no tecido ósseo, aumentar a síntese de matriz calcificada de osso, acelerando o processo de reparo periodontal.

REFERÊNCIAS

ALJEHANI, Y. A. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. **Int J Dent**, v. 2014, p. 182513, 2014.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec 1999.

ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 34, p. 9-21, 2004.

BENAKANAKERE, M. KINANE, D. F. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. **Front Oral Biol**, v. 15, p. 41-55, 2012.

BEHLING, E. B. *et al.* Flavonóide Quercetina:Aspectos Gerais e ações biológicas. **Alim Nutri** , Araraquara. v.15, n. 3, p 285-292, 2004

BOUVET-GERBETTAZ, S. *et al.* Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. **Lasers Surg Med**, v. 41, n. 4, p. 291-7, Apr 2009

CHANG P. C. *et al.* Irradiation by light-emitting diode light as an adjunct to facilitate healing of experimental periodontitis in vivo. **Journal of periodontal research** ,v. 48 , n. 2, p.135 -143,2003.

CHENG, W. C. *et al.* Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontal research** v. 45 , n. 6, p. 788 -795, 2010.

DIAMANTINO A. G. Efeito da terapia com LED(945 +- 20 nm) sobre o processo de reparo ósseo em ratos. **Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em Engenharia Biomédica**. Instituto de pesquisa e desenvolvimento.Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos,2010.

EKE, P. I. *et al.* Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. **J Periodontol**, v. 86, n. 5, p. 611-22, May 2015.

EL-BESHBISHY, H. A. MARIA, R. A.; BARDI, F. A. Biochemical and C-reactive protein alterations in myocardial infarction periodontitis patients. **Am J Med Sci**, v. 348, n. 3, p. 181-5, Sep 2014.

FERNANDES, P. A. **Aplicação da microtomografia computadorizada para a análise morfométrica bi e tridimensional na avaliação da perda óssea experimental em ratos.** Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão . Área de concentração: Periodontia, 2014.

GARCIA, V. G. *et al.* Treatment of experimental periodontal disease by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 with scaling and root planing (SRP); **Inflammopharmacology**, v.18, p. 293 -301. Dec 2010.

GENCO, R. J. BORGNACKE, W. S. Risk factors for periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 62, n. 1, p. 59-94, Jun 2013.

GIORDANO M; K NACKFUSS, I. G. Fatores de crescimento e diferenciação ósseos. Efeito sobre o processo de consolidação de fraturas: Presente e Futuro. **Revista Brasileira de Medicina**, v.57, n. 9, p.14-20, 2000.

GURGEL, B. C. V *et al.* Influência da resposta do hospedeiro e sua modulação na patogênese e terapia periodontal. **Rev Int Periodontia Clin 2005**; v.2, n.4, p.38-44.

HAYASHIDA, H. *et al.* Association of periodontitis with carotid artery intima-media thickness and arterial stiffness in community-dwelling people in Japan: the Nagasaki Islands study. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 1, p. 186-91, Jul 2013.

HIRSCHFELD, J. *et al.* Neutrophil extracellular trap formation in supragingival biofilms. **Int J Med Microbiol**, v. 305 n.4, pg. 453 -463 Apr 2015.

KARU, T. I. TIFLOVA, O. A. Effect of low-intensity monochromatic visible light on the growth of *Escherichia coli* cultures. **Mikrobiologiya**, v. 56, n. 4, p. 626-30, Jul 1987.

KARU, T. I. PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 27, n. 3, p. 219-23, 1995.

LIU, Y.F. *et al.* Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats ; **Journal of periodontal research** ,v.45 ,p. 714 -719,Dec 2010.

LOPES, C. L. *et al.* Infrared laser photobiomodulation 830 nm on bone tissue around dental implants:A Raman Spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits.**Photomedicine and laser Surgery**,v.25,n. 2,p. 96-101,2007.

LOOZEN, G. *et al.* Inter-bacterial correlations in subgingival biofilms: a large-scale survey. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 1, p. 1-10, Jan 2014.

NAVARRO, V. P. *et al.* A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal .**Revista de odontologia da UNESP**,v.35,n. 4,p. 233-238,2006.

NICOLAU, R. A. *et al.* Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity:An experimental animal study.**Lasers Med Sci**,v.18, n.2, p.89-94,Jan 2003.

PARK, C. H. *et al.* Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 2, p. 273-81, Feb 2007.

PETER, K. P. *et al.* Prevalence of periodontal disease and characterization of its extent and severity in an adult population - an observational study. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 12, p. ZC04-7, Dec 2014.

PINHEIRO, A. L. B *et al.* Effect of low level laser therapy of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz dentist** ,v.14,n. 3,2003.

PIRES, D. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med Sci** v. 26, n. 1, p. 85–94, 2011.

POLLANEN, M. T. *et al.* Host-bacteria crosstalk at the dentogingival junction. **Int J Dent**, v. 2012, p. 821383, 2012.

PRATES A. R. *et al.*Terapia laser de baixa potência na periodontia. **Laser de baixa potência princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia** .ed Elsevier 2012, capt 18 p.168-173.

SAITO, C. T. *et al.* Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. **Dent Traumatol**, v. 27, n. 1, p. 30-9, Feb 2011.

SERAFIM, K. G. *et al.* Effects of 940 nm light-emitting diode (led) on sciatic nerve regeneration in rats. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 113 -119,2012.

SETTEM, R. P. *et al.* Fusobacterium nucleatum and Tannerella forsythia induce synergistic alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. **Infect Immun**, v. 80, n. 7, p. 2436-43, Jul 2012.

SILVA, E. C. Radiação laser. In RODRIGUES, E. M. (Ed.). **Manual de recursos terapêuticos**. Rio de Janeiro: Revinter, p. 17-35, 1998.

SOTO-BARRERAS, U. *et al.* Peripheral arterial disease associated with caries and periodontal disease. **J Periodontol**, v. 84, n. 4, p. 486-94, Apr 2013.

ROSS, M. H; ROMRELL, L. J. *Histologia texto e atlas* São Paulo. Panamericana Ross 1993, p. 141-180 .

TELES, F. R. *et al.* Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. **J Periodontal Res**, v. 47, n. 1, p. 95-104, Feb 2012.

THEODORO, L. H. *et al.* Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 4, p. 1209-18, May 2015.

TRELLES M. A. MAYAYO, Z. Bone fracture consolidates faster with low power laser. **Lasers Surg Med**. v. 7, p. 36-45, 1987.

VINCK, E. M, Cagnie B. J, Cornelissen M. J, Declercq H. A, Cambier Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci** v. 18, n. 2, p. 95–99 Dec 2003.

YANG, D *et al.* Temporal expression of metalloproteinase-8 and -13 and their relationships with extracellular matrix metalloproteinase inducer in the development of ligature-induced periodontitis in rats; **Journal of periodontal research**, v. 48, p. 411 -419, Aug 2013.

WHELAN, H. T *et al.* Effect of NASA light – Emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, n. 2, p. 67-74, 2003.

ZARE, D *et al.* Evaluation of the Effects of Diode (980 Nm) Laser on Gingival Inflammation after Nonsurgical Periodontal Therapy, **Journal of Lasers in Medical Sciences** , v. 5, p. 27 -31, June 2014.

ANEXOS



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 185/2015

Londrina, 30 de Setembro de 2015.

Prezada Pesquisadora,

Certificamos que o projeto intitulado "**Estudo experimental dos efeitos da fototerapia sobre o tratamento periodontal**", protocolo CEUA nº **8182.2015.89**, sob a responsabilidade de **Solange de Paula Ramos**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **16/06/2015**.

O projeto tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação da fototerapia no reparo do tecido periodontal e em marcadores sistêmicos e teciduais de risco cardiovascular de ratos com periodontite induzida. Os animais serão anestesiados e será realizada a amarra subgingival dos primeiros molares superiores direito e esquerdo com fios de amarra ortodôntica, que será mantido durante 14 dias. Após esse período, a amarra será removida e os procedimentos de raspagem e LEDterapia serão realizados. As maxilas do lado direito serão utilizadas para análise histológica de áreas de inflamação e presença de lesões periodontais, osteoclastos e células imunomarcadas para IL-1beta, TNF-alfa, RANK e RANKL. Os níveis de proteína C reativa em sangue e o risco de lesão vascular serão avaliados por ensaio bioquímico e função contrátil e relaxante da aorta isolada, respectivamente. As diferenças entre os grupos experimentais serão avaliadas pela função de ANOVA (pós-teste de Turkey) para dados com distribuição normal, ou teste de Kruskal Wallis (pós-teste de Dunn).

Vigência do Projeto	01/08/2015 a 31/08/2017
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	Indeterminado
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Maxila, aorta e sangue

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Aparecido Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu/Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Solange de Paula Ramos

Coordenadora do Projeto

Departamento de Histologia / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para André Junior da Conceição (Chefe da DP-IC/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Histologia e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>

