

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA PAULA DE SOUZA MERNICK

**A terapia fotodinâmica na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos
T no tecido periodontal.**

São Paulo – SP

2015

ANA PAULA DE SOUZA MERNICK

**A terapia fotodinâmica na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos
T no tecido periodontal**

**Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho, para
obtenção do título de Mestre em
Biofotônica**

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane
Miranda França

Co-orientador: Prof. Dr. Renato
Araujo Prates

São Paulo – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Mernick, Ana Paula de Souza.

A Terapia fotodinâmica na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T no tecido periodontal. / Ana Paula de Souza Mernick. 2014.

53 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

Orientador (a): Profa. Dra. Cristiane Miranda França.

São Paulo, 16 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): ANA PAULA DE SOUZA MERNICK

Título da Dissertação: "A TERAPIA FOTODINÂMICA NA QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS E LINFÓCITOS T NO TECIDO PERIODONTAL"

Presidente: PROFA. DRA. CRISTIANE MIRANDA FRANÇA 

Membro: PROF. DR. ADJACI UCHOA FERNANDES 

Membro: PROF. DR. MARCELO TAVARES DE OLIVEIRA 

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e ao meu namorado que sempre me apoiaram e me incentivaram nos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter conseguindo concluir este trabalho com muita força e determinação.

Aos meus pais William, Janete e ao meu irmão Marcelo, pelo incentivo, carinho e dedicação comigo.

Ao meu namorado Rodrigo que esteve sempre ao meu lado, acreditando e me apoiando para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Cristiane Miranda França, que foi uma grande mestra, me ensinando desde a graduação até o mestrado, com muito carinho, paciência, respeito e dedicação. Agradeço por ter acreditado em mim e pela colaboração na minha vida profissional e acadêmica, se tornando uma amiga, um exemplo de pessoa e de profissional.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Renato Araujo Prates, que me passou grandes conhecimentos e assim, colaborou muito para o meu crescimento profissional, sempre muito paciente e dedicado ao nosso estudo, um exemplo de mestre para mim.

A todos meus colegas do mestrado, em especial minha grande amiga Érika que sempre esteve ao meu lado.

À Profa. Dra. Verônica Franco de Carvalho e o Prof. Dr. Marcelo Tavares de Oliveira, que me ajudaram para a realização deste trabalho e participaram do meu crescimento acadêmico.

À aluna de Iniciação científica Amanda, pela atenção e a disponibilidade em ajudar na realização da imunohistoquímica deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicado às Ciências da Saúde.

À Universidade Nove de Julho pela oportunidade e pela bolsa de estudos no programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicado às Ciências da Saúde.

RESUMO

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dos dentes e conseqüentemente à perda do elemento dental. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao processo inflamatório periodontal e têm como função fagocitose e liberação de citocinas. Após alguns dias os neutrófilos vão sendo gradualmente substituídos por linfócitos, que dão o caráter crônico da periodontite. O tratamento estabelecido para a periodontite é a orientação de higiene oral, raspagem e alisamento radicular e em casos mais avançados, pode haver a necessidade de antibioticoterapia sistêmica. No sentido de reduzir a prescrição de antibióticos, tem-se pesquisando o uso da terapia fotodinâmica (PDT) como intervenção antimicrobiana, com ótimos resultados. Assim, o objetivo deste trabalho é verificar se a PDT interfere na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T no tecido periodontal. Para tal, foram alocados 05 pacientes que passaram por tratamento periodontal prévio com boa higiene oral e presença de bolsas periodontais residuais com indicação cirúrgica. A PDT foi aplicada nos seguintes parâmetros: azul de metileno (50 µg/mL) aplicado no fundo da bolsa periodontal e após 5 minutos foi irradiado via transmucosa com laser de diodo, 660 nm, P= 100 mW, t= 90 s por ponto, 9 J/ponto, densidade de energia: 22 J/cm², densidade de potência: 250 mW/cm². Uma semana após a PDT foi realizada remoção cirúrgica das bolsas e as amostras encaminhadas para processamento histológico de rotina e imunohistoquímica para detecção de neutrófilos e linfócitos T. As amostras foram fotografadas e as células positivas contadas com auxílio do software ImageJ. Os dados foram avaliados estatisticamente e não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney p= 0,5). Conclui-se que a PDT não interfere na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T no tecido periodontal após 7 dias.

Palavras-chave: Periodontite, terapia fotodinâmica, neutrófilos, linfócitos T, citocinas.

ABSTRACT

Periodontitis is an infectious disease characterized by the destruction of the supporting tissues of the teeth and therefore the dental loss. Neutrophils are the first cells to arrive in periodontal inflammation and have as function phagocytosis and cytokine release. After a few days, the neutrophils are replaced by lymphocytes, which give the chronic nature of periodontitis. The established treatment for periodontitis is oral hygiene care, scaling and root planing, and in more advanced cases, there may be the need for systemic antibiotics. In order to reduce the prescription of antibiotics, it has been researched the use of photodynamic therapy (PDT) as antimicrobial intervention, with great results. The objective of this work is to verify if the PDT interferes with the chemotaxis of neutrophils and T lymphocytes into the periodontal tissue. For such, 05 patients who had undergone prior treatment with periodontal good oral hygiene and periodontal pockets with residual surgical indication were allocated. PDT was applied under the following parameters: methylene blue (50 µg/ml) was applied to the bottom of the periodontal pocket and after 5 minutes, via transmucosal, was irradiated with diode laser 660 nm, P = 100 mW, t = 90 s per point 9 J/point, energy density: 22 J/cm², power density: 250 mW/cm². One week after PDT, the surgical removal of the periodontal pockets was performed and the samples sent for routine histology and immunohistochemistry for detection of neutrophil and lymphocyte. The samples were photographed and positive cells counted with the aid of ImageJ software. The data were evaluated statistically and no significant difference between groups (Mann-Whitney p = 0.5). It was concluded that PDT did not interfere with the chemotaxis of neutrophils and T lymphocytes in the periodontal tissue after 7 days.

Key words: Periodontitis, photodynamic therapy, neutrophils, T lymphocytes and cytokines.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. Contextualização | 13 |
| 1.1 Doença periodontal | 13 |
| 1.2 Tratamento periodontal | 16 |
| 1.3 Terapia fotodinâmica | 17 |
| 1.4 Terapia fotodinâmica e doença periodontal | 18 |
| 2. Objetivos | 23 |
| H1 e H0 | 23 |
| 3. Material e métodos | 24 |
| 3.1 Critérios de inclusão | 24 |
| 3.2 Critérios de exclusão | 24 |
| 3.3 Grupos experimentais e desenho do estudo | 25 |
| 3.4 Exame periodontal | 25 |
| 3.5 Tratamento periodontal | 26 |
| 3.6 Terapia fotodinâmica | 28 |
| 3.7 Cirurgia Periodontal | 30 |
| 3.8 Processamento das amostras e imunohistoquímica | 31 |
| 3.9 Análise dos dados | 33 |
| 4. Resultados | 34 |
| 4.1 Artigo 1 | 34 |
| 5. Considerações Finais | 35 |
| 6. Referências Bibliográficas | 36 |
| Anexo 1 – Artigo Submetido | 42 |
| Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética | 51 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sondagem da bolsa periodontal _____26

Figura 2: Orientação de higiene oral, uso do fio dental _____26

Figura 3: Raspagem subgengival na bolsa periodontal _____27

Figura 4: Fotossensibilizador sendo aplicado na bolsa periodontal __29

Figura 5: Fotossensibilizador na bolsa periodontal _____29

Figura 6: Aplicação do laser na região da bolsa periodontal _____30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|---|
| AAP | Academia Americana de Periodontia |
| aPDT | do inglês – <i>antimicrobial photodynamic therapy</i> - terapia fotodinâmica antimicrobiana |
| ELAM 1 | do inglês – <i>endothelium leukocyte adhesion molecule 1</i> – molécula1 de adesão do leucócito ao endotélio |
| FS | Fotossensibilizador |
| FGF2 | do inglês – <i>fibroblast growth factor 2</i> - fator de crescimento de fibroblastos 2 |
| GM-CSF | do inglês – <i>granulocyte macrophage – colony stimulatling factor</i> - fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos |
| ICAM 1 | do inglês – <i>intercellular cell adhesion molecule 1</i> - molécula 1 de adesão intercelular |
| IFN-γ | Interferon- γ |
| IL | Interleucina |
| IS | Índice de sangramento à sondagem |
| IPV | Índice de placa visível |
| MMP 13 | do inglês – <i>matrix metaloprotease 13</i> - Metaloproteinase de matriz 13 |
| NCI | Nível clínico de inserção |
| Nm | Nanometros |
| OPG | Osteoprotegerina |
| PCS | Profundidade clínica de sondagem |
| PMNs | Polimorfonucleares neutrófilos |
| PDT | Do inglês – <i>photodynamic therapy</i> – terapia fotodinâmica |
| RANK | do inglês – <i>receptor activator of the nuclear kappa-beta factor</i> - ativador do receptor de fator nuclear kappa-beta |
| RNA | do inglês – <i>rybonucleic acid</i> - ácido ribonucléico |
| TGF-β | do inglês – <i>transforming growth factor beta</i> - fator de crescimento transformador beta |
| TNF-α | do inglês – <i>tumoral necrosis factor alpha</i> – fator de necrose tumoral alfa |

1. Contextualização

1.1 Doença Periodontal

A doença periodontal é uma enfermidade que acomete os tecidos de suporte dos dentes, que são: o ligamento periodontal, cemento radicular e o osso alveolar. Ela começa através do acúmulo de biofilme na superfície dos dentes, que é uma substância clara à amarela – acinzentada, composta por bactérias em uma matriz de glicoproteínas salivares e polissacarídeos extracelulares, de consistência amolecida, e sua remoção é feita através da escovação e do uso do fio dental. Inicialmente esse biofilme pode vir a causar uma gengivite, que é uma inflamação dos tecidos de proteção dos dentes, esse biofilme se não for bem controlado, evolui para o cálculo dental, que é justamente a sua mineralização, e esse acúmulo de cálculo na superfície dental pode levar a uma periodontite. (LINDHE et al., 2005; CARRANZA et al., 2012).

A periodontite é uma doença inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes, leva à perda de inserção, reabsorção óssea e consequentemente perda do elemento dental, sendo considerada uma das principais causas de perda dental em adultos. Sua etiologia está relacionada à ação de bactérias anaeróbias, falta de higienização bucal, e alguns fatores de risco como o tabagismo e o diabetes, que podem contribuir para o avanço da doença (GOKHALE et al., 2010 ; AZARPAZHOOH et al., 2010).

Dentre, as principais características da progressão da doença periodontal, estão o desafio microbiano, já que a periodontite possui microrganismos específicos, o processo inflamatório e a destruição dos tecidos de suporte do

dente, onde ocorre a formação da bolsa periodontal, que é um espaço formado entre a gengiva e o dente que ultrapassa de 3 mm de profundidade. A periodontite pode ser classificada em dois tipos: periodontite crônica e agressiva. A periodontite agressiva está relacionada a fatores genéticos, acomete pacientes mais jovens e sua progressão é muito rápida. A periodontite crônica é a mais prevalente entre os pacientes, afeta normalmente pacientes acima de 35 anos e seu processo inflamatório e perda de inserção acontecem de forma lenta, sendo considerada localizada quando afeta até 30% dos sítios periodontais (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY - AAP, 2001; CARRANZA et al., 2012)

Os principais patógenos envolvidos na periodontite são bactérias anaeróbias Gram negativas como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* (PETELIN et al., 2014).

No estágio inicial da inflamação periodontal ocorrem alterações vasculares como a vasodilatação, as proteínas exsudativas e os fluidos causam o edema nos tecidos, ocorrendo o influxo de células inflamatórias, incluindo principalmente os neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Os neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares, são as primeiras células a chegarem no processo inflamatório e têm como função proteger os tecidos do hospedeiro, fagocitando as bactérias presentes e provocando a liberação de enzimas nocivas contra os microrganismos e também ao hospedeiro (BHANSALI, et al., 2013; LINDHE et al., 2005).

Os neutrófilos predominam na região sulcular e o recrutamento dessas células dos tecidos para o sulco gengival acontece através de substâncias quimiotáticas, como a interleucina 8 (IL-8), o sub produto C5a do sistema

complemento, o leucotrieno B₄ e moléculas de adesão como (ICAM-1- molécula 1 de adesão intercelular), (ELAM-1 - molécula 1 de adesão do leucócito ao endotélio) que também irão promover o recrutamento de novos neutrófilos e demais células de defesa, como linfócitos e macrófagos, perpetuando o processo inflamatório (SÉGUIER et al., 2010; LIU et al., 2001; LINDHE et al., 2005)

Estudos histopatológicos de lesões periodontais indicam que os neutrófilos formam uma barreira protetora entre o epitélio juncional e a placa dentária, demonstrando sua grande importância no tratamento da periodontite (SCOTT et al., 2012).

Os linfócitos expressam receptores (CD44) que permitem a adesão celular em estruturas do tecido conjuntivo. Eles são divididos em linfócitos B que atuam na produção de anticorpos e linfócitos T, que tem como principal função matar células reconhecidas como infectadas ou por induzir a apoptose. Existem dois tipos de linfócitos T, o T CD4⁺ conhecidos como células T auxiliares, eles ajudam os linfócitos B a produzir anticorpos e auxiliam os fagócitos a destruir os microorganismos, produzem citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, interferon- γ – IFN- γ , fator de necrose tumoral - TNF- α) que apresentam várias funções, como a ativação das células T citotóxicas ou linfócitos T CD8⁺, onde eles matam as células que abrigam intracelularmente os microrganismos. Os linfócitos juntamente com os neutrófilos são células de defesa do nosso organismo que agem destruindo os microrganismos, são muito importantes para a modulação do processo inflamatório e para o reparo do tecido periodontal (HOGAN et al., 2014; ABBAS et al., 2003; LINDHE, et al., 2005).

No avanço do processo inflamatório, há predominância de linfócitos e plasmócitos, ocorrendo à destruição de componentes estruturais como (colágeno

e matriz extracelular) além da perda do osso alveolar e migração apical do epitélio juncional, com isso ocorre a formação da bolsa periodontal e algumas citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 α , IL-1b e o TNF- α participam desse processo destrutivo estimulando a reabsorção óssea (PAGE, 1991; LINDHE et al., 2005).

1.2 Tratamento periodontal

Segundo as diretrizes da Academia Americana de Periodontia, seguidas pelo Brasil, o tratamento padrão para as periodontites é a raspagem, alisamento radicular, orientação de higiene bucal e em casos mais avançados a terapia cirúrgica e antibioticoterapia. O objetivo do tratamento é restabelecer a saúde e promover o reparo do tecido periodontal, aumentando a longevidade dos dentes e preservando os tecidos de suporte. Estes procedimentos apresentam limitações como, dificuldade de acesso em áreas de furcas, bolsas muito profundas, regiões distais de molares. Além disso, o uso constante de antibióticos para minimizar a infecção pode causar resistência bacteriana. (AAP, 2011; PINHEIRO et al., 2010; BALATA et al., 2010; ATIEH, 2010).

Após o tratamento inicial, onde são realizados os procedimentos não cirúrgicos como raspagem, alisamento radicular e orientação da higiene oral, é feita a reavaliação periodontal, que tem o objetivo de avaliar os resultados obtidos na terapia não cirúrgica, observando as condições gengivais como, profundidade de bolsa, sangramento à sondagem, mobilidade e nível clínico de inserção. Em alguns casos, o paciente tem um bom controle do biofilme, mas ainda existem bolsas residuais, que são bolsas periodontais observadas após o tratamento, e essas bolsas são classificadas em: ausência de bolsa periodontal

(1-3 mm), bolsa rasa, (4-6 mm) ou bolsa profunda (igual ou maior que 7 mm) (LINDHE et al., 2005).

As bolsas rasas são tratadas com raspagem e alisamento radicular e as bolsas profundas podem ser indicadas para o tratamento cirúrgico. A cirurgia periodontal permite uma melhor visualização e acesso às superfícies radiculares e também permite remover o tecido de granulação periodontal (LINDHE et al., 2005; CAPPUYNS et al., 2012).

1.3 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT – do inglês *photodynamic therapy*) é uma modalidade terapêutica utilizada para causar morte celular baseada no uso de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras e a aplicação de uma fonte de luz com comprimento de onda adequado. Os primeiros relatos sobre a terapia fotodinâmica foram por volta de 1900, onde Oscar Raab e Hermann Von Tappeiner descobriram que a acridina vermelha associada à luz ambiente poderia causar efeito tóxico sobre culturas de protozoários. Pouco tempo depois foi relatada a participação essencial da luz e oxigênio nesse processo, estabelecendo o termo “fotodinâmico”. Por muitos anos, as pesquisas envolvendo a terapia fotodinâmica foram relacionadas ao tratamento contra o câncer. A partir das décadas de 80 e 90 os estudos começaram ampliar suas áreas de atuação e atualmente a terapia fotodinâmica é muito utilizada na área médica e odontológica (ACKROYD et al., 2001; JORI et al., 2006).

No processo fotodinâmico a molécula do fotossensibilizador (FS) é excitada para o seu estado singleto como resultado da absorção da luz. Após

sofrer decaimento para o estado tripleto via cruzamento intersistemas, o FS pode transferir energia para o oxigênio molecular (reação do tipo II) ou pode participar de um processo de transferência de elétrons que leva à formação de radicais (reação do tipo I). Estas transferências resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como radicais superóxido, radical hidroxila e oxigênio singleto, que possuem efeitos citotóxicos e podem levar à morte de microrganismos (BETSY et al., 2014 ; BRAUN et al., 2008; LUI et al., 2011).

1.4 Terapia fotodinâmica e doença periodontal

A terapia fotodinâmica vem sendo bastante estudada no tratamento periodontal como tratamento adjunto ao convencional e mais recentemente como monoterapia. Por ser um método não invasivo, não apresentar efeitos adversos e, especialmente pelo seu efeito antimicrobiano, por isso com potencial de modular o processo inflamatório, isso ocorre porque A PDT causa morte celular e isso ativa o processo inflamatório através dos neutrófilos que irão ativar o sistema complemento, melhora a apresentação de antígenos e a produção de citocinas. O uso da PDT também reduz o uso de antibióticos na terapia periodontal, evitando a resistência microbiana (ANDRADE et al., 2013; KOLBE et al., 2014; LIU et al., 2011; CASTANHO et al., 2006).

Estudos *in vitro* mostraram que a terapia fotodinâmica tem efeitos positivos contra as bactérias peridontopatogênicas e principalmente ação antimicrobiana em biofilmes organizados contra *Porphyromonas gingivalis* (OLIVEIRA et al., 2011) .

BRAHAM et al., 2009, investigaram o efeito citotóxico da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em *Porphyromonas gingivalis* e seu papel na destruição da protease associada à virulência desse microrganismo, bem como na inativação de citocinas como o TNF- α e IL-1 β . Como resultado os autores observaram que houve um aumento da morte bacteriana, diminuição dos fatores de virulência e das citocinas do hospedeiro que prejudicam a reparo periodontal.

Em um estudo com animais, comparou-se o efeito da PDT com a terapia convencional (raspagem, alisamento e polimento radicular – RAP) contra bactérias da doença periodontal. Foi utilizado um laser de diodo com comprimento de onda de 635 nm e azul de metileno como fotossensibilizador. Em ambas as terapias houve redução significativa da população bacteriana, redução nos sinais da inflamação, como vermelhidão, sangramento à sondagem e infiltração de células inflamatórias, mostrando que as duas terapias podem realizar uma eficácia maior, quando trabalhando as concomitantemente, sendo a terapia fotodinâmica uma adjuvante importante ao tratamento periodontal (QIN et al., 2008),

CHONDROS et.al., 2009, avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da terapia fotodinâmica como tratamento adjuvante não cirúrgico da periodontite, onde foram utilizados 24 pacientes com periodontite crônica e aleatoriamente divididos em dois grupos: raspagem, alisamento radicular e sessão única de PDT utilizando um laser de diodo com comprimento de onda de 670 nm e um fotossensibilizador com base em cloreto de fenotiazina (HELBO Blue), e grupo controle com raspagem e alisamento radicular apenas. Foram avaliados os parâmetros principais da periodontite como: índice de placa, profundidade de sondagem, recessão gengival, sangramento e nível clínico de inserção. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, quanto à

profundidade clínica de sondagem, recessão gengival e nível clínico de inserção. Mas houve uma melhoria em relação ao sangramento no grupo com a terapia fotodinâmica.

Estudos experimentais com ratos e cães mostraram que a PDT associada ao tratamento periodontal reduziu a perda óssea e os sinais clínicos de inflamação. Um estudo experimental histomorfométrico e microbiológico realizado pelo nosso grupo de estudo verificou que os animais tratados com PDT apresentaram uma regeneração periodontal melhor, medida pela organização do colágeno, infiltrado inflamatório e perda óssea (PRATES et al., 2011).

KASHEFIMEHR et al., 2014, compararam o efeito da terapia fotodinâmica com a terapia periodontal convencional utilizando vinte e dois pacientes com periodontite crônica. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: raspagem e alisamento radicular (terapia convencional) e uma aplicação de terapia fotodinâmica associada ao tratamento convencional, para a PDT foi utilizado um laser de 638nm e azul de toluidina. Foram avaliados: profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, nível clínico de inserção, recessão gengival, IL 1-beta, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), metaloproteinase-8 e 9 e quantidade de polimorfonucleares (PMNs) antes e três meses após o tratamento. Os resultados demonstraram que houve melhorias significativas para todas as variáveis em ambos grupos concluindo que a PDT não forneceu qualquer benefício adicional ao tratamento convencional em termos de parâmetros clínicos ou marcadores inflamatórios.

Souza et al., 2013, avaliaram o efeito adjunto de terapia fotodinâmica com a raspagem e alisamento radicular. O nível de TGF-b (fator de crescimento transformante beta 1) no fluido gengival e observaram que a terapia fotodinâmica

promoveu um aumento nos níveis de TGF- β no fluido gengival, ajudando no processo de reparação da periodontite,

O efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica está sendo estudado em muitas áreas da Odontologia e Medicina, em um estudo analisando bactérias presentes em artrites, mostrou que após a terapia fotodinâmica, os neutrófilos foram rapidamente acumulados na articulação e o crescimento bacteriano foi suprimido e o inibindo a infecção (TANAKA et al., 2012).

TANAKA et al., 2012, estudaram a dosimetria de luz, a fim de maximizar a morte bacteriana de *Staphylococcus aureus* e minimizar a morte de neutrófilos, em um modelo animal com artrite, no qual foi injetado 1 μ g de Photofrine® e utilizado laser de diodo 635 nm. Foi observado um maior acúmulo de neutrófilos na articulação infectada após a terapia fotodinâmica, com uma fluência de 20 J cm^2 em comparação com fluências de 5 ou 70 J cm^2 .

Até o momento, poucos estudos avaliaram o efeito da PDT na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T no tecido periodontal de bolsas residuais. A terapia fotodinâmica é muito utilizada nas doenças periodontais devido ao seu efeito antimicrobiano, já que existem muitos trabalhos positivos mostrando seus efeitos contra os patógenos da periodontite. Os neutrófilos e os linfócitos são células de defesa muito importantes, eles agem combatendo os agressores, com isso nosso estudo busca demonstrar se a PDT pode modular as interações do sistema imune.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T na doença periodontal.

H1: A terapia fotodinâmica associada ao tratamento periodontal convencional aumenta a quantidade de neutrófilos e linfócitos T nas paredes das bolsas periodontais residuais.

H0: A terapia fotodinâmica associada ao tratamento periodontal convencional não aumenta a quantidade de neutrófilos e linfócitos T nas paredes das bolsas periodontais residuais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo clínico transversal, no qual foram recrutados pacientes oriundos do ambulatório de Periodontia da Universidade Nove de Julho.

A assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foi solicitada aos pacientes que preencheram os critérios de inclusão e não estiveram nos critérios de exclusão descritos a seguir.

3.1. Critérios de inclusão

- a- Indivíduos hígidos acima de 18 anos;
- b- Apresentar periodontite crônica;
- c- Presença de bolsas residuais;
- d- apresentar no mínimo 10 dentes e pelo menos 4 dentes com sangramento à sondagem e profundidade maior que 5 mm, com indicação cirúrgica para remoção da bolsa periodontal bilateral.

3.2. Critérios de exclusão

- a- Pacientes diabéticos não controlados;
- b- Pacientes fumantes ou que foram fumantes até um ano antes do tratamento;
- c- Pacientes com anemia;
- d- Pacientes com câncer ativo;
- e- Pacientes gestantes;

- f- Pacientes com história de antibioticoterapia no últimos 30 dias;
- g- Pacientes com terapia antiinflamatória nos últimos 30 dias;
- h- Pacientes com distúrbio de coagulação, tais como anti-coagulantes, hepatopatas, plaquetopênicos e imunossuprimidos;
- i- Pacientes em tratamento ortodôntico.

3.3 Grupos experimentais e desenho do estudo

Foram recrutados pacientes da Clínica de Periodontia da Universidade Nove de Julho, que estejam em tratamento e tenham indicação para remoção cirúrgica de bolsas periodontais residuais bilaterais. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho (680.045)

3.4. Exame periodontal

O exame clínico periodontal foi realizado por um único avaliador, especialista em periodontia, que avaliou seis sítios de cada dente com sonda milimetrada de 15 mm modelo Carolina do Norte (Hu-Firedy, Chicago, IL, USA). (Figura 1). Os parâmetros clínicos analisados foram: índice de placa visível (IPV) (AINAMO & BAY, 1975), índice de sangramento a sondagem (IS) (GREENSTEIN et al., 1981), profundidade clínica de sondagem (PCS), nível clínico de inserção (NCI). A calibração foi realizada antes do início do estudo.



Figura 1: Sondagem da bolsa periodontal, realizada com a cureta periodontal introduzida no sulco gengival.

3.5 Tratamento periodontal

O tratamento periodontal consistiu em instrução de higiene oral, por orientação monitorada de técnicas de escovação e uso diário de fio dental (Figura 2).

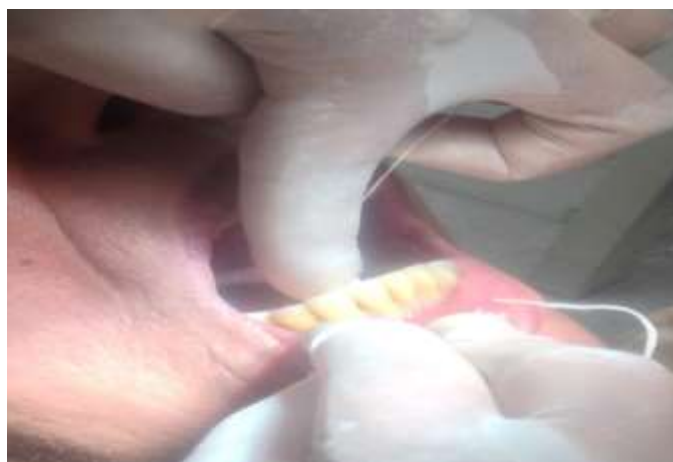


Figura 2: Orientação de higiene oral sendo feita junto com o paciente, com o uso do fio dental.

Também foi realizada raspagem e alisamento supra e subgengival manual e ultrassônica, conforme o preconizado pela Academia Americana de Periodontia (AAP, 2001). Este foi realizado de duas a quatro sessões de uma hora cada, com uso de anestesia local (tipicamente mepivacaína a 2% com 1:100,000 de noradrenalina). Foram utilizadas curetas periodontais do tipo Gracey (números 3/4,5/6,7/8, 11/12 e 13/14) para remoção do cálculo dental (Figura 3).



Figura 3: Raspagem subgengival na bolsa periodontal para remoção do cálculo dental.

Os outros fatores retentivos de biofilme, como lesões de cárie, dentes condenados, restaurações mal adaptadas, foram removidos nessas sessões de tratamento periodontal.

Com a sondagem se obtém a medida da profundidade de bolsa de cada sítio por dente. Bolsas consideradas rasas (< ou iguais a 4 mm) receberão o tratamento periodontal convencional não cirúrgico descrito acima. A cirurgia é preconizada para as bolsas moderadas (5 a 7 mm) e profundas (acima de 7 mm). Dessa forma, para o presente estudo, uma bolsa moderada/profunda recebeu a

terapia periodontal e remoção cirúrgica, enquanto outra recebeu a terapia periodontal, terapia fotodinâmica e remoção cirúrgica.

3.6 Terapia fotodinâmica

Para o grupo PDT a mesma foi aplicada ao final da sessão de raspagem, nos sítios periodontais com profundidades maiores ou iguais a 5 mm foi utilizado um laser de diodo (Therapy XT, DMC , São Carlos, Brasil) emitindo comprimento de onda de 660 nm, com potência de 100 mW, tempo de irradiação de 90 segundos por ponto (9J por ponto). Cada ponto de irradiação tem aproximadamente 0,4 cm², densidade de energia por ponto de 22 J/cm² e densidade de potência de 250 mW/cm². O medicamento (Chimiolux, 0,005%, DMC, São Carlos, Brasil) foi utilizado como fotossensibilizador, o que tem como princípio ativo o azul de metileno na concentração de 50 µg/mL, ou seja 160 mM. O fotossensibilizador foi depositado em cada bolsa periodontal com uma seringa aplicadora (Figura 4), com a aplicação do fundo da bolsa em direção coronal e um tempo de 5 minutos será respeitado antes da irradiação para que o medicamento tenha tempo de corar todo o biofilme microbiano (Figura 5).



Figura 4: Fotossensibilizador sendo aplicado na bolsa periodontal.



Figura 5: Fotossensibilizador na bolsa periodontal

O laser foi aplicado na mucosa, sobre o epitélio oral que reveste a bolsa periodontal (figura 6). Após a irradiação os excessos foram removidos com jato de água.



Figura 6: Aplicação do laser na região da bolsa periodontal, durante 90 segundos.

Devido à possível perda de energia e com intuito de padronizar a quantidade de energia aplicada nos sítios estudados, foi usado um medidor de energia (Laser Check) a cada sessão antes do uso do aparelho.

3.7 Cirurgia Periodontal

Após sete dias as bolsas periodontais foram removidas cirurgicamente de acordo com a técnica de Widman modificada. Brevemente, o retalho de Widman modificado foi realizado a partir da anestesia local, incisão intra-sulcular com bisturi, confecção do retalho total alguns milímetros além da crista óssea alveolar, debridamento do tecido de granulação, raspagem corono-radicular e suturas nas regiões interproximais para uma adaptação adequada dos retalhos aos dentes. O paciente foi reavaliado no pós-operatório uma semana após o ato cirúrgico.

3.8 Processamento das amostras e imunohistoquímica

Após a cirurgia periodontal para remoção das bolsas, as amostras dos periodontos foram coletadas, fixadas em formaldeído a 10% tamponado e processadas rotineiramente para inclusão em parafina e imunohistoquímica.

Para inclusão do material em parafina e confecção dos cortes histológicos, primeiramente a parafina foi colocada em estufa a 60 °C. Os cassetes contendo as amostras passaram por banhos crescentes de álcool, a temperatura ambiente (TA) até a desidratação completa, a saber: dois banhos de álcool 50%, 70%, 95% por 20 minutos cada, três banhos de álcool absoluto por meia hora cada. Então, foram dados dois banhos de xilol por 15 min cada. Em estufa a 60 °C, as amostras passaram por banho de xilol/parafina 1:1 por 45 min, dois banhos xilol/parafina 1:2 por 30 min e um banho de parafina pura por 3 horas. Então o material foi incluído em blocos de parafina, resfriado por 16 horas a 4°C e cortado no micrótomo LEICA. Os cortes foram distendidos em banho-maria a 45 °C e estendidos em lâminas de vidro silanizadas.

Dos mesmos blocos de tecido, espécimes foram cortados na espessura de 5 micra e dispostos em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silano cat A3648-100ML- Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). As lâminas silanizadas ficaram na estufa a 60 °C por uma hora e passaram por um processo de desparafinização em xilol e cadeia decrescente de soluções de etanol. Na sequência, os cortes passaram pelo procedimento de bloqueio da peroxidase endógena que constituem banhos de: (1) 15 min em solução de metanol absoluto e peróxido de hidrogênio 6% (1:1); (2) lavagem em água destilada; (3) imersão em tampão fosfato (PBS) por 10 min; (4) imersão em tampão PBS/ BSA 2% por 20 e (5) imersão em tampão PBS por 10 minutos.

Após as etapas descritas, as lâminas foram incubadas na presença de anticorpo primário (anti-elastase e anti-CD3, ABCAM, Cambridge, UK) por 16 horas (*overnight*).

Ao término do período de incubação, as lâminas foram lavadas com tampão PBS por 10 minutos e incubadas com anticorpo de ligação conjugado a peroxidase HRP do Kit DakoCytomation LSAB plus System HRP (Dako Corporation, CA, USA) por 30 min. Ao final desta incubação, foi realizada uma nova lavagem com tampão PBS por 10 min e incubação com o anticorpo ligado à enzima (deste mesmo kit) por 30 min. Retirado o anticorpo, as lâminas passaram por uma lavagem final com PBS. Em seguida foi realizada a detecção com solução cromógena, contendo 0,03% de 3-3'-diaminobenzidina em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4 com peróxido de hidrogênio a 0,3% (DAB, Dako). Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Mayer, durante 10 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem em água destilada.

A seguir as lâminas passaram pelo processo de desidratação em cadeia de concentração ascendente de etanol (etanol 50% a etanol absoluto), diafanização em xilol e, finalmente, a montagem em meio sintético (Erv-Mount, Erviegas, São Paulo, SP, Brasil).

Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos. No controle negativo os anticorpos primários foram substituídos por soro não reagente (Abcam) diluído em PBS.

As imagens foram digitalizadas sempre com o mesmo aumento, as células foram contadas a partir da área de maior concentração (*hot spot*) e em 5 campos

consecutivos com auxílio do software ImageJ 1.45 (NIH, Bethesda, Maryland, EUA).

3.9 Análise dos dados

Os dados obtidos foram computados e submetidos à análise estatística utilizando o programa estatístico Bioestat (domínio público). Foram comparadas as quantidades dos neutrófilos e linfócitos T presentes nas bolsas teste e controle. A comparação entre os sítios e teste controle, com relação às citocinas foi feita por meio de teste Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Artigo 1

Immuno-inflammatory responses of periodontal residual pockets after photodynamic therapy – series of cases.

Ana Paula de Souza Mernick¹, Renato Araujo Prates^{1,2}, Amanda Pires de Souza¹, Verônica Franco de Carvalho², Daniela de Fátima Teixeira Silva¹, Sandra Kalil Bussadori¹, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari¹, Kristianne Porta Santos Fernandes¹, Cristiane Miranda França^{1*} **Submetido ao Journal of Dentistry.**

Os resultados descritos nesse artigo foram que aPDT aplicada no final do tratamento em bolsas periodontais residuais não afetou a quantidade de neutrófilos ou linfócitos T no tecido periodontal.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu concluir que a terapia fotodinâmica associada ao tratamento convencional, para o tratamento de bolsas residuais em pacientes com periodontite crônica, não aumenta a quantidade de neutrófilos e linfócitos T nas paredes das bolsas periodontais residuais, e que ainda há necessidade de novos estudos e novos protocolos de terapia fotodinâmica no tratamento da periodontite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; CASTRO, A.D. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imune*. Levinter, 2003.

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 74(5): 656–669, 2001.

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*.25(4):229-235,1975.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Treatment of Plaque- Induced Gingivitis , Chronic Periodontitis, and Other Clinical Conditions. *J Periodontol*. 72 : 1790-1800, 2001

ANDRADE, P.F.; GARLET, G.P.; SILVA, J.S.; FERNANDES, P.G.; MILANEZI,C.; NOVAES, A.B.JR.; PALIOTO, D.B.; GRISI, M.F.M.; TABA, M.JR.; SOUZA, S.L.S. Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to an association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression: A human study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 126: 119–125, 2013.

ATIEH, M.A. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 25:605–613, 2010.

AZARPAZHOOH, A.; SHAH, P.S.; TENENBAUM, H.C.; GOLDBERG, M.B. The Effect of Photodynamic Therapy for Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis . *J Periodontol*. Jan;81(1):4, 2010

BALATA, M.L.; RIBEIRO, E.D.P.; BITTENCOURT, S.; TUNES, U.R. Terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico. Rev. Periodontia .Vol. 20 ,pag. 02, 2010.

BETSY, J.; PRASANTH, C.S.; BAIJU, K.V.; SUBHASH,N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. J ClinPeriodontol. 41: 573–581, 2014.

BHANSALI, R.K.; RAHUL, S.; YELTIWAR, K.G; BHAT. Assessment of peripheral neutrophil functions in patients with localized aggressive periodontitis in the Indian population. Journal of Indian Society of Periodontology. Vol. 17, pages 731-736, 2013.

BRAHAM, P.; HERRON,C.; STREET, C.; DARVEAU, R.; Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. J Periodontol. 80(11):1790-8 ,2009.

BRAUN, A.; DEHN, C.; KRAUSE, F. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. J ClinPeriodontol. 35: 877–884, 2008.

CAPPUYNS, I.; C IONCA, N.; WICK, P.; GIANNOPOULOU, C.; MOMBELLI, A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy,diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. Lasers Med Sci. 27:979–986 ,2012.

CARRANZA, A.F.; KLOKKEVOLD, R.P.; NEWMAN, G.M. Periodontia Clínica. Levinter, 2012.

CASTANHO, AP.; MROZ, P; HAMBLIN, MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev cancer*, ;6(7):535-45, 2006.

CHONDROS, P.; NIKOLIDAKIS, D.; CHRISTODOULIDES, N.; RÖSSLER, R.; GUTKNECHT, N.; SCULEAN, A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers MedSci*. 24(5):681-8, 2009.

GREENSTEIN,G.; CATON, J.; POLSON, A.M. Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. *J Periodontol*. Aug;52(8):420-5, 1981.

GOKHALE,S.R.;SUMANTH,S.;PADHYE,A.M.Evaluation of blood parameters in patients with chronic periodontitis for signs of anemia. *J Periodontol*. 81(8):1202-6, 2010.

HOGAN, T.; KADOLSKY, U.; TUNG, S.; SEDDON, B.; YATES, A.Spatial Heterogeneity and Peptide Availability Determine CTL Killing Efficiency In Vivo. *PLoS Comput Biol*. 18;10(9):e1003805, 2014.

JORI, G.;FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; CAPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers in Surgery and Medicine* 38:468–481, 2006.

KASHEFIMEHR, A.; RAHMANPOUR, N.; BABALOO, Z.; KISHEN, A.; TENENBAUM, H.C.; AZARPAZHOOH, A. Effects of Photodynamic Therapy on the Clinical and Gingival Crevicular Fluid Inflammatory Biomarkers in Chronic

Periodontitis: A Split-Mouth Randomized Clinical Trial. J Periodontol. 85(9):1222-9. 2014.

KOLBE, M.F.; RIBEIRO, F.V.; LUCHESE, V.H.; CASSARIN, R.C.; SALLUM E.A.; JUNIOR, F.H.N.; AMBROSANO, G.M.B.; CIRANO, F.R.; PIMENTEL, S.P.; CASATI, M.Z. Photodynamic Therapy During Supportive Periodontal Care: Clinical, Microbiological, Immunoinflammatory, and Patient-centered Performance in a Split-mouth RCT. Journal of Periodontology. 85(8):e277-86, 2014.

LINDHE, J. ; KARRING, T.; LANG, N.P. tratado de periodontia clínica e e implantologia oral, 4.^a edição, Guanabara, 2005.

LIU, R, K. CAO, C. F.; MENG, H. X.; GAO, Y; .Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. Journal of periodontology. Vol. 72, No. 11, Pages 1545-1553, 2001.

LUI, J.; CORBET, E.F.; JIN, L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. J Periodont Res. 46:89–96, 2011.

OLIVEIRA, R.R.; NOVAES, A.B. JR.; GARLET, G.P.; SOUZA, R.F.; TABA, JR. M.; SATO, S.; SOUZA, S.L.S.; PALIOTO, D.B.; GRISI, M.; FERES, M. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. Lasers Med. Sci. 26(3):359-67, 2011.

PAGE, R.C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal. *J Periodont Res.* 26: 230-242, 1991.

PETELIN, M.; PERKIČ, K.; SEME, K.; GAŠPIRC B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci.* 0103-014-1632-2, 2014.

PINHEIRO, S.L.; DONEGÁ, J.M.; SEABRA, L.M.S.; ADABO, M.D.; LOPES, T.; DIAS, T.H.; CAGNOLI, M.R.; BERTOLINI, P.F.R. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci.* 25:87–91, 2010.

PRATES, R.A.; YAMADA, A.M.; SUZUKI, L.C.; FRANÇA, C.M.; CAI, S.; MAYER, M.P.; RIBEIRO, A.C.; RIBEIRO, M.S. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg.* 29(12):835-44, 2011.

QIN, Y.L.; LUAN, X.L.; BI, L.J.; SHENG, Y.Q.; ZHOU, C.N.; ZHANG, Z.G. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2008

SCOTT, D.; KRAUSS, L. J. Neutrophils in periodontal inflammation. *Front Oral Biol.* Vol. 15, pag. 56-83, 2012.

SÉGUIER, S.; SOUZA, S. L.; SVERZUT, A. C.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; BODINEAU, A.; CORRÊA, V. M.; COULOMB, B.; TEDESCO, A. C. Impacto f photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* Vol. 101, p. 348-354, 2010.

SOUZA, S.L.; ANDRADE, P.F.; SILVA, J.; TRISTÃO, F.S.M ,ROCHA, F.A.; PALIOTO, D.B.; GRISI, M.F.; TABA, M.; NOVAES A. B. Effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy on Transforming Growth Factor- β 1 Levels in the Gingival Crevicular Fluid. *Photomedicine and Laser Surgery*. Feb;31(2):65-71,2013.

TANAKA, M.; MROZ, P.; DAI, T.; HUANG, L.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S.; HAMBLIN, M. Photodynamic Therapy using intra- Articular Photofrin For Murine MRSA Arthritis: Biphasic Light Dose Response For Neutrophil- Mediated Antibacterial Effect. *Lasers Surg Med*. 43(3):221-9,2011.

TANAKA, M.; MROZ, P.; DAI, T.; HUANG, L.; SHINOMIYA, N, SEKI, S.; HAMBLIN, M. Photodynamic Therapy Can Induce a Protective Innate Immune Response Against Murine Bacterial Arthritis Via Neutrophil Accumulation. *PLoS One*. 7(6):e39823, 2012.

ANEXO 1 – ARTIGO SUBMETIDO

The screenshot shows the 'Journal of Dentistry' submission portal. The page title is 'Submissions Being Processed for Author Cristiane Miranda Franca, PhD'. It indicates 'Page 1 of 1 (1 total submission(s))' and 'Display 10 results per page'. A table lists the submission details:

| B Action | Manuscript Number | Title | Initial Date Submitted | Status Date | Current Status |
|---------------------------|-------------------|--|------------------------|-------------|----------------------|
| Add Links | A7 | Immuno-inflammatory response of periodontal residual pockets after photodynamic therapy - writer of text | 05 Nov 2014 | 05 Nov 2014 | Submitted to Journal |

Below the table, it says 'Page 1 of 1 (1 total submission(s))' and 'Display 10 results per page'. There is a button labeled 'Go to Author Main Menu'.

At the bottom of the page, there is a copyright notice: 'Copyright © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved. Content not to be used for any other purpose without permission from the publisher.' and a 'View Full' link.

Immuno-inflammatory responses of periodontal residual pockets after photodynamic therapy – series of cases.

Ana Paula de Souza Mernick¹, Renato Araujo Prates^{1,2}, Amanda Pires de Souza¹, Verônica Franco de Carvalho², Daniela de Fátima Teixeira Silva¹, Sandra Kalil Bussadori¹, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari¹, Kristianne Porta Santos Fernandes¹, Cristiane Miranda França^{1*}

¹ Post Graduation Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil.

²Periodontal Department, School of Dentistry, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil.

***Correspondence author**

Cristiane Miranda França

Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 948 apto 93 – Vila Mariana

São Paulo, SP

Brazil

CEP 04014-002

Abstract:

Background: Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) may also elicit immune responses.

Objectives: To investigate the immune-inflammatory cells in early responses of periodontal soft tissues treated with aPDT.

Methods: Chronic periodontitis patients received non-surgical periodontal treatment: scaling root planing and oral hygiene instruction for four weeks. Those with good oral hygiene and at least two residual periodontal pockets (RPP) with surgical indication were included. One of the RPP received methylene blue (0,005%) and then was irradiated by a diode laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $P = 100 \text{ mW}$, $D = 22 \text{ J/cm}^2$; $T = 90 \text{ s}$). A RPP in the same patient was designated as control and did not receive methylene blue neither irradiation. One week following aPDT, both RPP were surgically removed and then routinely processed for immunohistochemistry against neutrophils, macrophages, T lymphocytes, active T lymphocytes, and plasma cells. Positive cells were counted by a blinded examiner. Statistical analysis was performed.

Results: aPDT in residual periodontal pockets does not affect the number of absolute inflammatory/immune cells. A strong positive correlation was found in the control group between T lymphocytes and activated T lymphocytes, whereas in the aPDT group the correlation was between T lymphocytes and macrophages.

Conclusions: aPDT with methylene blue does not change the count of the absolute number of immune cells but may modulate immune responses in the periodontal tissue related to T lymphocytes and macrophages interactions.

Clinical significance: aPDT elicits modulation of the immune response in residual periodontal pockets, which may aid in an improved means of remodeling the periodontal soft tissue.

Keywords: Antimicrobial photodynamic inactivation; antimicrobial photodynamic chemotherapy; periodontitis; periodontal disease; photosensitizer; red laser

Background

Periodontal disease is a chronic inflammatory condition caused by microbial infection of multi-specie bacterial biofilm that may compromise the supporting structures of the teeth [1]. The current treatment for periodontitis is the mechanical removal of dental plaque with scaling rootplaning (SRP) [1]. In an attempt to increase the efficacy and efficiency of bacterial elimination, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been proposed as a promising alternative [2-6]. Recent studies showed that (aPDT) may also elicit an immune response [7]. The role of PDT activated/stimulated neutrophils and macrophages in tumoral targets is well known, but its relevance in aPTD remains unclear.

Aims:

The objective of this work was to investigate the immune-inflammatory cells in early responses of periodontal soft tissues treated with methylene blue mediated aPDT.

Methods

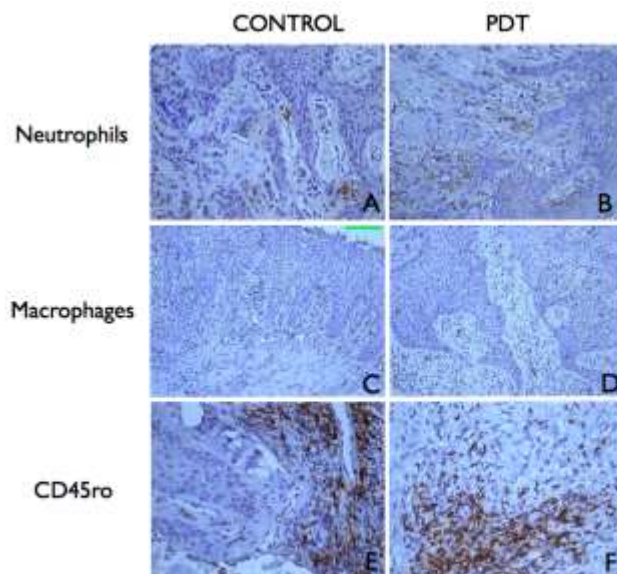
This is a transversal study of patients with chronic periodontitis. The patients that met the inclusion criteria received non-surgical periodontal treatment that included SRP and oral hygiene instruction [8]. After four weeks, the subjects were examined by a professional and data regarding patient's surgical needs was recorded. Five patients who had good oral hygiene and at least two residual periodontal pockets (RPP) with 5 to 7 mm of depth on probing and surgical indication were included in the study. The affected sites were

treated with methylene blue and then irradiated by a diode laser (Therapy XT-DMC, São Carlos, Brazil) emitting in wavelength= 660 nm, P= 100 mW, D= 22 J/cm²; T= 90 s, and E= 9 J/point. The photosensitizer was placed into the RPP with a syringe, left for 5 minutes and the transmucosal irradiation was performed throughout the pocket extension. Each surgical site had a non-irradiated site designated as control. One week following aPDT, both RPP were surgically removed and then routinely processed for immunohistochemistry against neutrophils, macrophages, T lymphocytes, active T lymphocytes, and plasma cells.

Ten consecutive microscope fields (magnification: 400 x) were photographed (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). An experienced pathologist, blinded to the allocation of the samples, performed the analysis of the images with the aid of the ImageJ 1.45 program (free software, NIH, Bethesda, Maryland, USA), using the “cell counter” plugin. The data from the positive cells in the samples was analyzed with Origin 8.0 software.

Results

All specimens showed gingival epithelia, junctional epithelia and a connective tissue with diffuse, moderate inflammatory infiltrate with predominating mononuclear cells (Figure 1).



Data from the positive cells was normalized and then a comparison was made of each cell group (neutrophils, macrophages, T Lymphocytes, active T lymphocytes, and plasma cells) between the control and PDT groups using Pearson's correlation. No statistical difference was found (Figure 2).

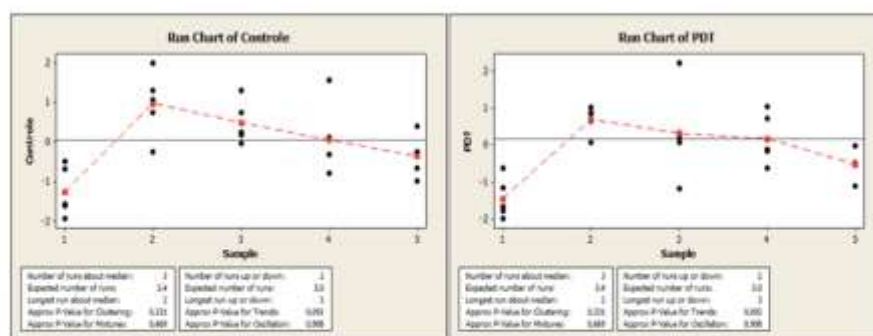


Figure legend: Run chart of the immune responses of control and PDT residual pockets. Note that control has a correlation between T lymphocytes (CD3+) and activated lymphocytes (CD45ro). PDT group showed a correlation between T lymphocytes (CD3+) and macrophages (CD68+).

[1= Elastase; 2= CD3; 3=CD45RO; 4= CD68; 5= CD138]

Inflammatory response is a dynamic process, with crucial interactions among the cells, and interestingly, when we searched for a correlation of the groups of cells, a strong positive correlation was found in the control group between T lymphocytes and activated T lymphocytes. In the aPDT group, we found a strong correlation between T lymphocytes and macrophages (Figure 3). This means that between the control and aPDT groups there is no difference in absolute cell numbers, but the aPDT makes the inflammatory cells correlate differently.

Discussion

The present study indicates that additional aPDT in residual periodontal pockets does not interfere with the number of absolute inflammatory cells. This includes the innate immunity cells, like neutrophils and CD68+ macrophages, and the adaptative immune cells such as T lymphocytes, activated T lymphocytes and plasma cells. However, there is a modulation of the inflammatory process, from inflammation (mediated by activated T lymphocytes) trending to remodeling (mediated by macrophages) and aPDT stimulates a cross-talk between T lymphocytes and macrophages.

The RPP removal was conducted seven days after aPDT. This is because after one week the effects on the population of T cells, activated T cells and plasma cells that are recruited indicate the direction of the wound healing: a cellular response (triggered by T cells), an humoral response (triggered by plasma cells) or remodeling (conducted by macrophages).

Previous studies have suggested that aPDT provides benefits in the

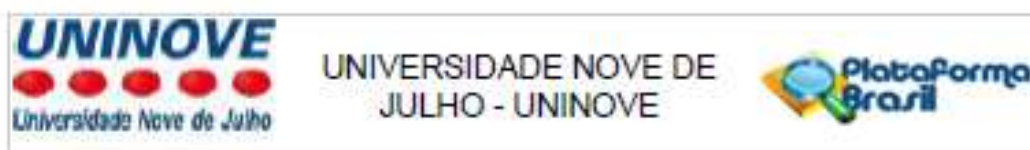
treatment of residual periodontal pockets, probably due to the antimicrobial effect of PDT and a low-level energy photobiomodulation in reducing inflammation [9,10,11]. However, other studies have not demonstrated the clinical improvements of the use of aPDT in chronic periodontitis or in RPP [12]. Most studies search for cytokines, and few studies clearly demonstrate the immune cells in the tissue [10-12].

These results are promising and a randomized clinical trial is being conducted to pursue the finding that aPDT may modulate the interactions between T lymphocytes and macrophages in periodontal tissue. Maybe other parameters related to periodontal healing or bone related cells may be improved by the use of aPDT.

Conclusion

aPDT with methylene blue may modulate immune responses in periodontal tissue related to the interactions of T lymphocytes and macrophages, but the absolute number of immune cells does not change.

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O efeito da terapia fotodinâmica na quimiotaxia de neutrófilos na bolsa periodontal.

Pesquisador: Cristiane Miranda França

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31649314.6.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 680.045

Data da Relatoria: 09/06/2014

Apresentação do Projeto:

Resumo:

O efeito terapia fotodinâmica na quimiotaxia de neutrófilos na bolsa periodontal: A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dos dentes, que leva à perda de inserção, reabsorção óssea e consequentemente a perda do elemento dental. Ela é considerada uma das principais causas de perda dental em adultos, sua etiologia está relacionada a bactérias anaeróbicas e a falta de higienização bucal. As principais características da progressão da doença periodontal estão relacionado com a estimulação bacteriana, destruição dos tecidos de suporte e a produção de citocinas que estimulam o processo inflamatório. Nesse processo inflamatório os microrganismos do biofilme dental fazem com que os neutrófilos liberem quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão, as quais irão promover o recrutamento de novos neutrófilos e células de defesa, iniciando o processo inflamatório. O tratamento estabelecido para a periodontite é a orientação de higiene oral, raspagem e alisamento radicular, e em casos mais avançados, pode haver a necessidade de antibioticoterapia sistêmica.

Endereço: VERDEIRO nº 235/049

Bairro: LIBERDADE

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

CEP: 01.504-001

E-mail: comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 680.045

tratamento peridontal não cirúrgico para as bolsas rasas e cirúrgico para bolsas moderadas e profundas. Nas condições normais de atendimento na clínica da Universidade, o tratamento cirúrgico não é realizado por se tratar de procedimento complexo para um aluno de graduação, sendo que o paciente precisa procurar outro profissional para ser atendido. Aqui ele receberá todo o tratamento e gratuitamente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa extremamente relevante, pois reduz a utilização de antibioticoterapia para doenças periodontais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE, segue todas as normas do COEP.

Recomendações:

Projeto bem elaborado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 09 de Junho de 2014

Assinado por:
Stella Regina Zamuner
(Coordenador)