



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Paulo Eduardo Ferraz Bottura Filho

**EFEITOS DA LASERTERAPIA E TERAPIA
FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA
DOENÇA PERIODONTAL EM ANIMAIS
IMUNODEPRIMIDOS COM TACROLIMO**

São José do Rio Preto
2012

Paulo Eduardo Ferraz Bottura Filho

**Efeitos da Laserterapia e terapia fotodinâmica no
tratamento da doença periodontal em animais
imunodeprimidos com tacrolimo**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de
Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área
de Concentração: Medicina e Ciências
Correlatas.

**Orientador: Profa. Dra. Maria Alice Sperto Ferreira
Baptista**

**São José do Rio Preto
2012**

Ferraz Bottura Filho, Paulo Eduardo

Efeitos da Lesarterapia e terapia fotodinâmica no tratamento da
doença periodontal em animais imunodeprimidos com tacrolimo /

Paulo Eduardo Ferraz Bottura Filho

São José do Rio Preto, 2012.

72 p; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Profa. Dra. Maria Alice Sperto Ferreira Baptista

1. Tacrolimo; 2. Periodontite; 3. Terapia Fotodinâmica; 4. Lasers.

Paulo Eduardo Ferraz Bottura Filho

Efeitos da Laserterapia e terapia fotodinâmica no
tratamento da doença periodontal em animais
imunodeprimidos com tacrolimo

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Maria Alice Sperto Ferreira Baptista

2º Examinador: Prof. Dr. Emerson Quintino De Lima

3º Examinador: Prof. Dr. Albanir Gabriel Borrasca

Suplentes: Profa. Dra. Solange Correa Garcia Pires D`Ávila

Profa. Dra. Jane Lopes Bonilha

Prof. Dr. Afonso Augusto Carvalho Loureiro

Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli

Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas

Profa. Dra. Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

Profa. Dra. Maria Goloni Bertollo

São José do Rio Preto, 13/Abril/2012.

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	viii
Resumo.....	x
Abstract	xi
1. Introdução	02
2. Materiais e Métodos	08
2.1. Animais.....	08
2.2. Protocolo Experimental.....	08
2.2.1. Grupos Experimentais	08
2.2.2. Períodos Experimentais.....	09
2.2.3. Sedação e Anestesia	10
2.2.4. Indução da Doença Periodontal.....	10
2.2.5. Droga Utilizada	11
2.2.6. Modo de Administração da Droga Imunossupressora e da Solução Salina	11
2.2.7. Tratamento da Doença Periodontal	11
2.2.8. Terapia Fotodinâmica.....	12
2.2.9. Protocolo de Aplicação do Laser.....	12

2.2.10.	Processamento Histológico	13
2.2.11.	Análise Estatística	14
3.	Resultados.....	16
3.1.	Resultados Sorológicos	16
3.2.	Resultados Histológicos	16
3.3.	Resultados Histomorfométricos	23
3.4.	Resultados Estatísticos	23
4.	Discussão.....	26
5.	Conclusões	32
6.	Referências Bibliográficas.....	34
7.	Anexos.....	45

Aos meus pais Paulo e Conceição

À minha irmã Aline

A Minha Esposa Lidiani

Aos meus filhos Leonardo e Julia

Pelo amor, compreensão e apoio constante.

Agradecimentos

- ✓ A **Deus** primeiramente, por ter de me dado oportunidades tão especiais quanto a essa de realizar um curso tão importante.
- ✓ À **Faculdade de Medicina da São José do Rio Preto – FAMERP**, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior**, pelo apoio sempre presente.
- ✓ À **Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME**, na pessoa do Diretor Administrativo **Dr. Jorge Fares** e do Diretor Executivo **Dr. Horácio José Ramalho**, pela cooperação.
- ✓ Ao **Curso de Pós-graduação da FAMERP**, na pessoa do **Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile**, que proporcionou a realização deste trabalho.
- ✓ À **Profa. Dra. Maria Alice Sperto Ferreira Baptista**, pela amizade, orientação, apoio inestimável e estímulos dados durante a realização deste trabalho.
- ✓ Ao **Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia**, pela valiosa orientação, a execução deste trabalho e por ceder seu laboratório na **FOA UNESP (Faculdade de Odontologia de Araçatuba)**.
- ✓ Ao **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, pela paciência e valiosa colaboração.
- ✓ Ao **Prof. Dr. Leandro de Araújo Fernandes**, pela grande colaboração na parte histológica deste trabalho.
- ✓ Ao **Prof. Dr. Mário Abbud Filho**, por me acolher em seu laboratório e pela confiança.
- ✓ À **Prof. Dra. Heloisa Cristina Caldas**, pela dedicação e importante participação na parte experimental e em todos os processos deste trabalho.
- ✓ Ao **Prof. Dr. Reinaldo Azoubel**, pela leitura e revisão deste trabalho.

- ✓ A **Prof. Dra. Neide A. Michelli Domingos**, também pela revisão e considerações sobre este trabalho.
- ✓ Ao **Prof. Dr. José Antônio Cordeiro**, pelo auxílio na análise estatística.
- ✓ Aos **funcionários da Pós-Graduação**, pela dedicação e eficiência.
- ✓ A todos os colegas do **LITEX**, agradeço pela amizade, apoio e colaboração de todos.
- ✓ Aos **funcionários da Biblioteca**, em especial a **Zélia Regina** pela presteza e eficiência com que ajudam a todos os alunos.
- ✓ A todos do **Biotério da FAMERP**, pela ajuda na obtenção e acesso aos animais.
- ✓ A **todos** que desinteressadamente auxiliaram e possibilitaram a realização deste trabalho.

*A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento:
são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de
uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido
pela ciência.*

Charles Darwin

Figura 1	Fotografia ilustrando os frascos de Cloridrato de quetamina e o Cloridrato de xilasina	10
Figura 2	Fotografia ilustrando o azul de toluidina depositado ao redor do dente molar do rato e a aplicação do laser..	12
Figura 3	Fotografia do equipamento emissor de laser utilizado nos procedimentos	13
Figura 4	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 1 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	16
Figura 5	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 1 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	17
Figura 6	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 1 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	17
Figura 7	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 2 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	18
Figura 8	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 2 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	18
Figura 9	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 2 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	18
Figura 10	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 3 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	19
Figura 11	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 3 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	19

Figura 12	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 3 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	20
Figura 13	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 4 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	20
Figura 14	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 4 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	21
Figura 15	Imagem microscópica da área de furca do Grupo 4 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	21
Figura 16	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 5 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	22
Figura 17	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 5 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	22
Figura 18	Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 5 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X	22
Figura 19	Em Y estão contidos mm ² de perda óssea e em X estão os períodos (dias) em que os animais sofreram a eutanásia.....	24

Tabela 1	Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histomorfométricos da área da perda óssea alveolar (mm ²) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental induzida, de acordo com cada grupo/subgrupo e período.....	23
-----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cm ²	Centímetro quadrado
CSa	- Ciclosporina
dL	- Decilitro
DP	Desvio padrão
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FK 506	Tacrolimo
g	- Grama
GaAlAs	Laser de Gálio, Alumínio e Arsênio.
H.E	- Hematoxilina e Eosina
InGaAlP	- Laser de Índio, Gálio, Alumínio, Phosphide
J	- Joule
Kg	Kilograma
Laser	- Acrônimo de <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Luz Amplificada pela Emissão Estimulada de Radiação).
LPS	Lipopolissacarídeo.
M	- Média
µm	Micrômetro

mL	-	Mililitro
mm ²	-	Milímetro quadrado.
mW	-	Mili Watt
ng	-	Nanograma
nm	-	Nanômetro.
PDT	-	<i>Photo dynamic therapy</i> (Terapia foto-dinâmica)
RAR		Raspagem e alisamento corono-radicular.
RNAm		Ácido ribonucléico mensageiro.
S	-	Segundo.
TBO	-	Azul de toluidina O.

Introdução: A doença periodontal está frequentemente associada a doenças sistêmicas e caracteriza-se pela destruição dos tecidos de suporte dos dentes. Pacientes que usam medicamentos imunossupressores como o tacrolimo, estão entre os que sofrem com esse problema. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do laser e da Terapia Fotodinâmica (PDT) (tratamentos não cirúrgicos) como tratamento adjunto a raspagem e alisamento coronaradicular (RAR) sobre a periodontite induzida em ratos imunodeprimidos com tacrolimo. **Materiais e métodos:** Cada grupo continha 6 ratos. **Grupo 1**, grupo controle, recebeu apenas solução salina através do período estudado de 42 dias e não recebeu tratamento periodontal; **Grupo 2**, recebeu solução salina e RAR; **Grupo 3**, recebeu tacrolimo (1 mg/kg/d) e foi tratado com RAR; **Grupo 4**, os animais foram tratados identicamente ao grupo 3 e então administrado tratamento com laser; e o **Grupo 5**, os animais foram tratados identicamente ao grupo 3 e então foi administrado a PDT. **Resultados:** A análise estatística indicou decréscimo da perda óssea com a progressão do tempo ($p < 0,005$). Não há diferenças significativas na perda óssea associada conforme o tipo de tratamento entre os grupos 1, 2 e 3 ($p > 0,9$) e também entre os grupos 4 e 5 ($p > 0,6$). As análises também demonstraram que a imunossupressão não foi um fator determinante para a perda óssea. **Conclusão:** O laser e a PDT foram efetivos como tratamento adjunto a RAR na redução da perda óssea causada pela periodontite experimental induzida em animais tratados com tacrolimo.

Palavras-chave: 1. Tacrolimo; 2. Periodontite; 3. Terapia Fotodinâmica; 4. Lasers.

Background: Periodontal disease is often associated with systemic diseases and is characterized by destruction of the tissues supporting the teeth. Patients using immunosuppressive drugs such as tacrolimus are among those who suffer from tissue destruction. **Objective:** To evaluate the effects of laser and photodynamic therapies (PDT) (nonsurgical) as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of corona-induced periodontitis in rats immunosuppressed with tacrolimus (Prograf®). **Materials and methods:** The animals were divided into five groups. Each group had 6 rats. **Group 1**, the control group, received only saline solution throughout the study period of 42 days and did not receive periodontal treatment; **Group 2**, received saline solution and scaling and root planing (SRP); **Group 3**, received tacrolimus (1 mg/kg/day) and was treated with SRP; **Group 4**, animals were treated identically to group 3 and then administered laser treatment; and in **Group 5**, the animals were treated identically to group 3 and then administered photodynamic therapy. **Results:** Statistical analysis indicated decreased bone loss with the progression of time ($p < 0.005$). There was no significant difference between the bone loss associated with the types of treatment administered to groups 1, 2 and 3 ($p > 0.9$) and groups 4 and 5 ($p > 0.6$). The analysis also indicated that immunosuppression was not a bone loss-determining factor. **Conclusion:** Laser and PDT therapies were effective as an adjunctive treatment to SRP in reducing bone loss caused by experimental periodontitis induced in animals being treated systemically with tacrolimus.

Key words: 1. Tacrolimus; 2. Periodontitis; 3. Photodynamic Therapy; 4. Lasers.

1. INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A realização de transplantes de órgãos é cada vez mais comum na prática médica, pois com o advento de técnicas cirúrgicas modernas bem como o entendimento de como funcionam os mecanismos de rejeição dos transplantes, a genética e a imunologia do organismo humano com seus produtos e suas funções, tal procedimento tornou-se muito seguro.⁽¹⁾

Concomitantemente aos transplantes há a necessidade da utilização de drogas imunossupressoras no combate a rejeição aguda dos órgãos transplantados. Várias drogas imunossupressoras foram desenvolvidas nas últimas décadas e ainda muito utilizadas são os esteróides, micofenolato mofetil, sirolimus (rapamicina), ciclosporina (Csa) e tacrolimo (FK 506), além de drogas utilizadas como indução.⁽²⁻⁴⁾

Desde sua descoberta, a ciclosporina foi a droga de eleição para os casos em que há a necessidade de se recorrer a imunossupressão devido a sua seletividade, pela prevenção das rejeições aos enxertos de tecidos e transplantes de órgãos. A ciclosporina ainda pode ser utilizada em outros tipos de patologias como: psoríase e esclerose múltipla além de glomerulopatias. No entanto, sua aplicação está limitada a diversos efeitos colaterais como a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hipertensão, aumento do risco de linfomas e o aumento de tecido gengival.⁽⁵⁻⁷⁾

Em 1984 foi descoberto no Japão o tacrolimo (FK506), um macrolídeo policíclico produzido pela fermentação do *Streptomyces tsukubaensis*, usado pela primeira vez em 1989. Esta droga inibe os genes precoces de ativação das células T bloqueando a expressão do RNAm de várias citocinas levando a inibição da formação de linfócitos-T citotóxicos, maiores responsáveis pela rejeição de enxertos. FK 506 inibe as vias

bioquímicas intracelulares dependentes do íon cálcio e de suas interações com o receptor citoplasmático, a proteína acopladora do tacrolimo, da família das imunofilinas.⁽⁸⁻¹²⁾

Estudos apresentam o tacrolimo como um eficaz medicamento para o tratamento de artrite reumatóide, glomerulopatia e prevenção à rejeição de tecidos transplantados renais e cardíacos, apresentando-o como ótimo substituto a ciclosporina com potência e eficácia superior e efeitos colaterais diminutos se comparado a outras drogas similares.⁽¹³⁻¹⁵⁾ Tacrolimo e Ciclosporina demonstram diferenças em suas estruturas químicas, mas possuem muitas ações em comum e até similaridades quanto aos efeitos colaterais, no entanto, alguns estudos sugerem ser menor o efeito do tacrolimo para os tecidos periodontais, mas que ainda não são bem conclusivos.^(16, 5)

Sabe-se que o uso prolongado de alguns antiinflamatórios e imunossupressores podem alterar os tecidos periodontais causando além de crescimento gengival como efeito colateral mais comum, ulceração gengival, migração do epitélio juncional e a perda do ligamento das fibras transeptais que em conjunto com a instalação de uma periodontite podem ser exacerbadas.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

A doença periodontal ou periodontite é uma manifestação muito comum em indivíduos adultos com prevalência entre 5% a 30%. É um processo inflamatório e infeccioso causado principalmente por microorganismos periodontopatogênicos que promovem o colapso das estruturas de suporte ao redor dos dentes. Estes microorganismos liberam substâncias que promovem injúria aos tecidos, tendo como principal reação a reabsorção óssea alveolar, destruição do ligamento periodontal, cemento e inflamação do tecido gengival devido à resposta biológica que acontece no local afetado podendo, se não tratado, levar a perda dos dentes. Inúmeras espécies de

microorganismos habitam a cavidade bucal sendo alguns patógenos de maior importância para etiologia da doença periodontal, como: *A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* e *B.forsythus*.⁽²⁰⁻²²⁾

Doenças sistêmicas e outros fatores podem ser associados à severidade e a rapidez com que a doença periodontal progride entre elas estão a diabetes, estresse e o uso do tabaco.⁽²³⁾

O tratamento da doença periodontal consiste na remoção e/ou supressão dos microorganismos periodontopatogênicos, através de métodos já consagrados como a raspagem e o alisamento da superfície radicular, de forma cirúrgica ou não. Em muitos casos a terapia convencional deve vir associada de terapias de suporte como o uso de desinfetantes locais e antibióticos sistêmicos ou locais que não estão livres de efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais que em pacientes imunossuprimidos podem ser exacerbados.⁽²⁴⁾

O método convencional de eliminação do biofilme dentário, raspagem e alisamento corono-radicular (RAR), e os métodos de suporte como a antibioticoterapia e os desinfetantes locais promovem um efeito satisfatório ao exame clínico, no entanto, em áreas de difícil acesso, como áreas de furca dos molares, invaginações profundas e concavidades, esse tipo de terapia pode falhar ao não conseguir remover todos os periodontopatógenos irritantes. Sabe-se ainda que o biofilme dentário contém muitas espécies resistentes que podem não ser eliminadas, somente com esses tipos de tratamentos, dando início novamente a doença periodontal. Também o uso inadequado e indiscriminado de antibióticos pode conferir resistência a esses microorganismos o que dificulta ainda mais o tratamento e podem alterar o processo de reparo dos tecidos periodontais.⁽²⁵⁻²⁷⁾

As várias limitações dos tratamentos adjuntos a raspagem e alisamento radicular têm chamado a atenção dos pesquisadores. A literatura mostra inúmeras pesquisas que demonstram a seleção e resistência de bactérias pelo uso abusivo de antimicrobianos sistêmicos no tratamento periodontal.⁽²⁷⁾

Por todas essas dificuldades descritas, houve a necessidade de se desenvolver técnicas alternativas para atenuar esses problemas. Surge então como uma potencial alternativa a Terapia Fotodinâmica (PDT), um novo método não invasivo de terapia com a capacidade de atuar na morte de microorganismos. A Terapia Fotodinâmica é composta do uso de um laser de baixa potência com comprimento de onda apropriado a matar microorganismos previamente tratados com uma droga fotossensibilizante. Estudos tanto *in vitro* como *in vivos* vem demonstrando resultados satisfatórios desse método. A morte dos microorganismos ocorre pela fotoatividade entre o fotossensibilizante e a luz que promove uma reação fotooxidativa que induz alterações bioquímicas e morfológicas nas células alvos. Quando a molécula da droga fotossensibilizante absorve a luz de uma energia ressonante, alterações irreversíveis podem ocorrer na membrana celular, nas proteínas da membrana plasmática, ao DNA, a cadeia respiratória e alterações ao ácido nucléico causados pela liberação do oxigênio livre.^(23, 28-30)

Vantagens como terapia específica a células alvo, ausência de efeitos colaterais, início das atividades somente quando se expõe a luz e não induzir bactérias à formação de cepas resistentes como acontecem com os antibióticos, faz da PDT um método eficaz de alta elegibilidade como coadjuvante no tratamento da doença periodontal.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo a avaliação histológica e histomorfométrica dos seguintes parâmetros:

- 1- Efeitos do Laser e da Terapia Fotodinâmica (PDT) sobre o tratamento da doença periodontal induzida em ratos tratados com imunossupressor tacrolimo;
- 2- Possível efeito do tacrolimo (Prograf®) sobre o grau de reabsorção óssea;
- 3- Diferentes formas de tratamento periodontal não cirúrgico sobre a doença periodontal induzida em ratos imunodeprimidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2-MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-Animais

O experimento foi conduzido de acordo com as normas e princípios da ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Os procedimentos experimentais foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP sob o número de protocolo 6912/2007 (Anexo 1). Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo três animais cada, separados de acordo com o grupo experimental e alimentados com ração e água *ad libitum*.

2.2-Protocolo Experimental

No presente estudo, foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 200g a 300g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, os quais foram divididos em 5 grupos contendo 6 animais cada. Os animais apresentaram-se saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios.

2.2.1-Grupos Experimentais:

Grupo 1 (Controle n=6): Os animais do grupo 1, considerados como grupo controle, receberam solução salina em todo o período estudado (42 dias) e não foram submetidos à raspagem e alisamento corono-radicular. A eutanásia de 2 animais ocorreu nos períodos de 7, 14 e 28 dias após a remoção da ligadura.

Grupo 2 (Controle n=6): Os animais do grupo 2, também considerados como grupo controle, receberam solução salina em todo o período estudado (42 dias) e foram submetidos à raspagem e alisamento corono-radicular. A eutanásia de 2 animais ocorreu nos períodos de 7, 14 e 28 dias após a remoção da ligadura.

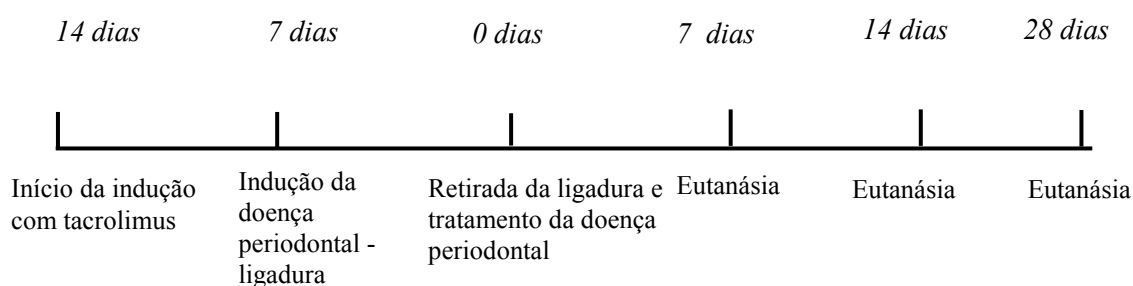
Grupo 3 (n=6): Os animais desse grupo receberam tacrolimo na dose de 1mg/kg/dia para a indução da imunossupressão durante todo o estudo e foram tratados com raspagem e alisamento corono-radicular. A eutanásia de 2 animais ocorreu nos períodos de 7, 14 e 28 dias após a remoção da ligadura.

Grupo 4 (n=6): Os animais desse grupo foram tratados de forma idêntica aos do Grupo 3 seguido do tratamento com laser. A eutanásia de 2 animais ocorreu nos períodos de 7, 14 e 28 dias após a remoção da ligadura.

Grupo 5 (n=6): Os animais desse grupo foram tratados de forma idêntica aos do Grupo 3 seguido da Terapia Fotodinâmica. A eutanásia de 2 animais ocorreu nos períodos de 7, 14 e 28 dias após a remoção da ligadura.

2.2.2-Períodos Experimentais

Nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-tratamento (RAR, Laser e PDT), 2 ratos de cada grupo experimental foram eutanasiados por meio de superdosagem anestésica. Logo após, a mandíbula de cada animal foi removida e separada em duas partes, para fixação em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 48 horas.



2.2.3-Sedação e Anestesia

Inicialmente os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrada e receberam anestesia geral, obtida pela associação de 50 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA) e 10 mg/Kg de cloridrato de xilasina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil), aplicados intraperitoneal (Figura 1). Nos casos em que não se obteve o necessário efeito do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.



Figura 1: Fotografia ilustrando os frascos de Cloridrato de quetamina e o Cloridrato de xilasina.

2.2.4-Indução da Doença Periodontal

Após anestesia geral, todos animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma sonda e pinça modificada, foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº 10; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores distribuído randomicamente entre o lado direito e esquerdo, ao nível do sulco gengival e mantido

por meio de nós cirúrgicos. Esta ligadura atuou como irritante gengival favorecendo o acúmulo de placa bacteriana. Os lados contralaterais dos dentes que tiveram a ligadura serviram como controle negativo em todos os grupos e períodos experimentais.

2.2.5-Droga Utilizada

A droga utilizada foi o tacrolimo (Prograf® - Janssen Cilag, Brasil). A dose utilizada foi semelhante à dose de uso clínico, o equivalente a 1,0mg/kg/dia. A cada período de eutanásia, foi escolhido randomicamente um rato imunodeprimido por tacrolimo para avaliação sorológica da quantidade da droga no sangue e o valor da creatinina.

2.2.6-Modo de Administração da Droga Imunossupressora e da Solução Salina

A administração da solução fisiológica de cloreto de sódio e do tacrolimo teve início 7 dias antes da instalação da ligadura, por injeção subcutânea diária e foi mantida durante todo período experimental. Os horários de administração foram sempre no período da manhã e idênticos para todos os grupos que foram pesados semanalmente para ajustar a dosagem da droga.

2.2.7-Tratamento da Doença Periodontal

O tratamento com laser e raspagem corono-radicular foram realizados após 7 dias da indução da doença periodontal imediatamente após remoção da ligadura. Foram utilizadas curetas manuais modificadas (Gracey 1 – 2. – Millenium, Golgran – São Paulo – Brasil).

2.2.8-Terapia Fotodinâmica

No grupo 5 foi utilizado o azul de toluidina (TBO), na dosagem de 100 microgramas/mL, depositando topicamente por meio de uma seringa de insulina, 1 mL da droga fotossensibilizadora sobre o primeiro molar inferior esquerdo, tomando o cuidado de depositar a droga de forma lenta e deixar a ponta ativa da agulha no espaço dente/tecido gengival por 60 segundos. Após aplicação da droga, aguardou-se 60 segundos para a aplicação do laser em 3 pontos na vestibular e 3 pontos na lingual (porção mesial, central e distal), realizando desta forma a terapia fotodinâmica (PDT) (Figura 2).



Figura 2: Fotografia ilustrando o azul de toluidina depositado ao redor do dente molar do rato e a aplicação do laser.

2.2.9-Protocolo de Aplicação do Laser

O laser utilizado no presente estudo é o Thera Lase[®] (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, São Paulo, Brasil) que apresenta as seguintes características: Emissores InGaAlP e GaAlAs, 685 e 830nm de comprimento de onda, potência útil de 35mW e

100mW, emissão contínua e pulsada com diâmetro de fibra ótica de 600 micras (Figura 2).

Os animais dos grupos 4 e 5 foram tratados com o laser respeitando o seguinte protocolo:

Comprimento de onda: 685nm (visível)

Potência: 35mW

Modo de aplicação: Laser contato pontual.

Tempo de exposição: 5 s / ponto

Fluência: 6 J/cm²



Figura 3: Fotografia do equipamento emissor de laser utilizado nos procedimentos.

2.2.10-Processamento Histológico

Após fixação das peças em formol a 10% por um período mínimo de 48 horas estas foram lavadas em água corrente por 12 horas para remoção do formol e foram

desmineralizadas em uma solução de partes iguais de 50% de ácido fórmico e 20% de citrato de sódio por 15 dias.

Estando as peças suficientemente descalcificadas, estas foram aparadas, lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, com a face vestibular paralela ao plano de corte.

Após a inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados de 6 µm foram obtidos no sentido mesio-distal e corados com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram analisados através de um microscópio óptico para estabelecer a perda óssea e as características do ligamento periodontal na região de furca do primeiro molar. A área de perda óssea na região de furca foi histomorfometricamente determinada utilizando um sistema de análise de imagem (Image Tool, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA). Após a exclusão da primeira e da última secção onde a região da furca foi evidente, cinco secções equidistantes de cada amostra de bloco foram selecionadas e capturadas por uma câmera digital conectada ao microscópio. Os valores médios foram calculados e comparados estatisticamente.⁽²³⁾

2.2.11-Análise Estatística

Os resultados estatísticos foram obtidos através da análise de variância de 2 critérios (ANOVA) testando os escores entre todos os grupos e todos os períodos de 7, 14 e 28 dias com nível de significância de 0,005. Quando os grupos foram testados dois a dois, o nível de significância foi de 0,05.

Para a análise dos escores foi utilizado o programa computacional Biostat 5.0 (Bioestat, Indústria Brasileira, Belém do Pará, PA, Brasil).

3. RESULTADOS

3-RESULTADOS

3.1-Resultados Sorológicos:

Os resultados dos sangues coletados aleatoriamente dos animais tratados com tacrolimo, foram muito semelhantes em todos os ratos testados, na média de 9ng/mL de tacrolimo e 0,7mg/dL de creatinina.

3.2-Resultados Histológicos

Grupo 1

Nos animais do grupo 1, aos 7 dias, observou-se tecido conjuntivo com elevado número de polimorfonucleares, neutrófilos em degeneração e pequena quantidade de trabéculas ósseas pouco organizadas (Fig. 4 A-B).

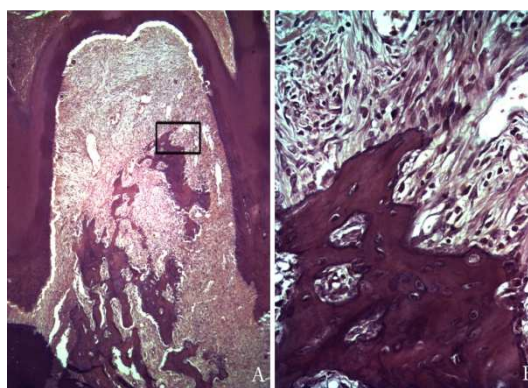


Figura 4: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 1 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

Aos 14 e 28 dias, o tecido conjuntivo apresentou pequeno número de fibroblastos e vasos sanguíneos e fragmentos de tecido ósseo necrótico (Figs. 5 A-B e 6 A-B).

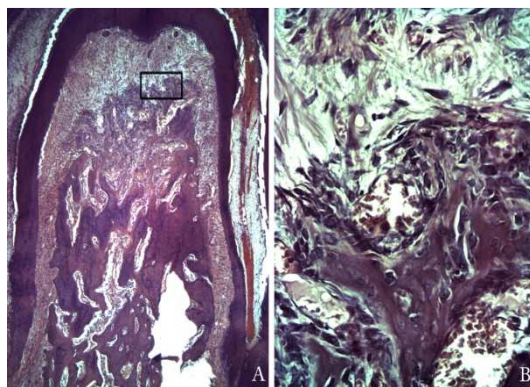


Figura 5: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 1 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

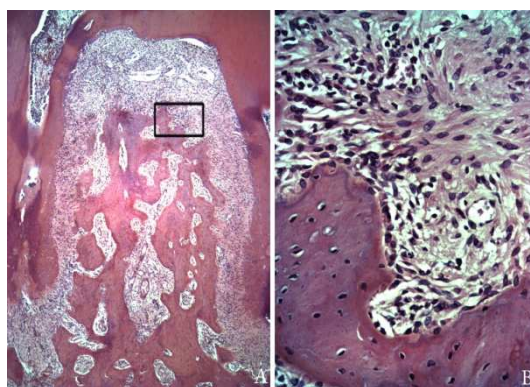


Figura 6: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 1 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

Grupo 2

Nos animais do grupo 2, aos 7 e 28 dias, notou-se a presença de tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. Tecido ósseo bem desenvolvido e ligamento periodontal com integridade (Figs. 7 A-B e 8 A-B). Aos 14 dias, porém, o tecido conjuntivo exibiu número moderado de fibroblastos e discreta vascularização (Fig. 9 A-B).

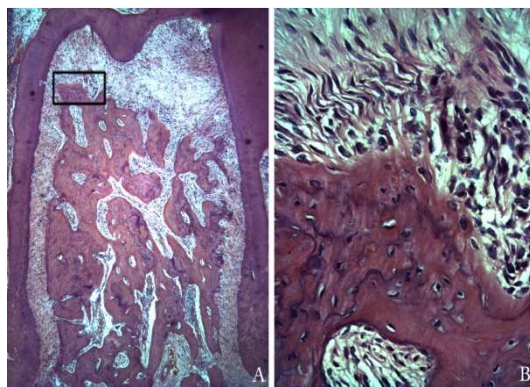


Figura 7: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 2 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

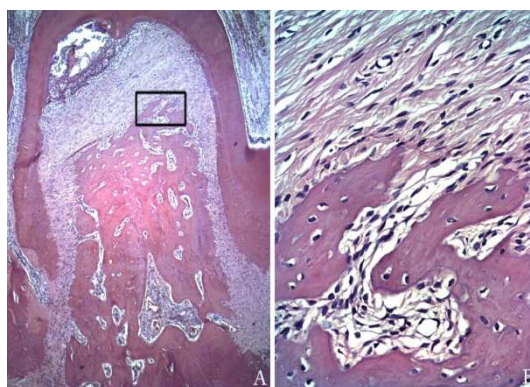


Figura 8: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 2 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

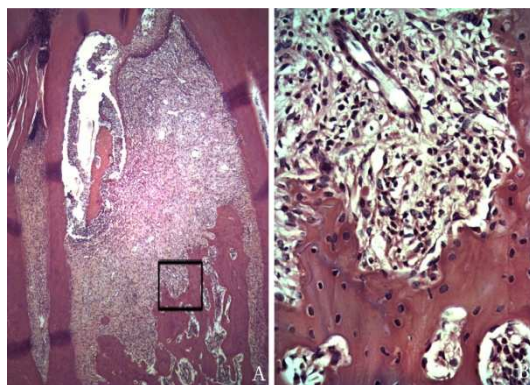


Figura 9: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 2 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

Grupo 3

Nos animais do grupo 3 em todos os períodos experimentais, o tecido conjuntivo apresentou extensas áreas ocupadas por polimorfonucleares, neutrófilos em degeneração e tecido conjuntivo pouco organizado com discreto número de fibroblastos. Mais em direção ao fundo do alvéolo, as trabéculas ósseas eram pouco organizadas (Figs. 10,11 e 12 A-B)

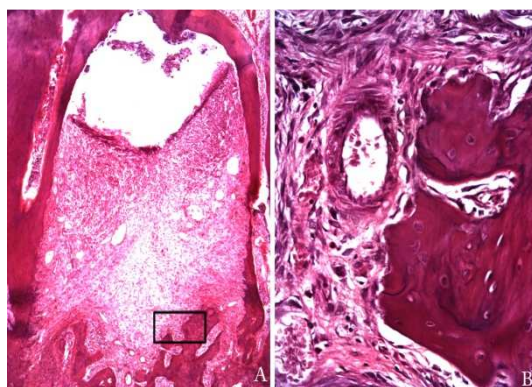


Figura 10: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 3 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

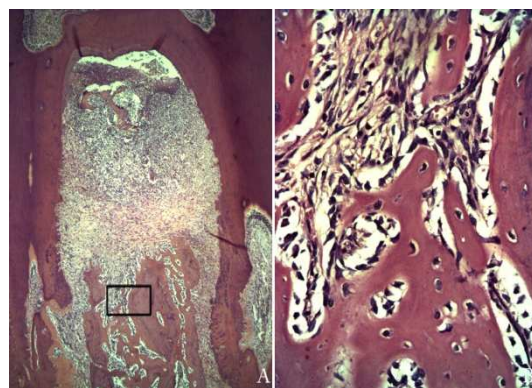


Figura 11: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 3 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

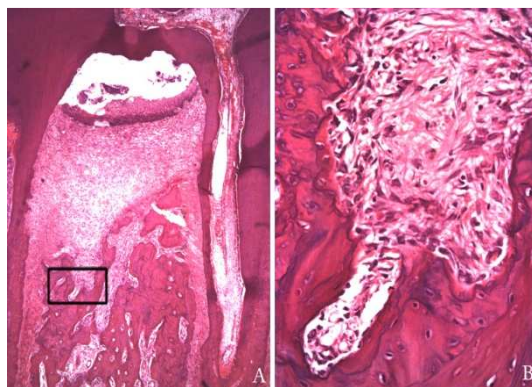


Figura 12: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 3 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

Grupo 4

Nos animais do grupo 4, aos 7 dias, apresentou tecido conjuntivo com moderado número de fibroblastos e tecido ósseo bem desenvolvido (Fig. 13 A-B). Já aos 14 e 28 dias, o tecido conjuntivo apresentou-se bem diferenciado, rico em fibras colágenas e com discreto número de fibroblastos. Evidenciou-se ao nível da bifurcação, estreita faixa entre a superfície radicular e o tecido ósseo, sendo este bem diferenciado e desenvolvido. Notou-se ainda nesta área uma pequena faixa de tecido epitelial (Figs. 14 e 15 A-B).

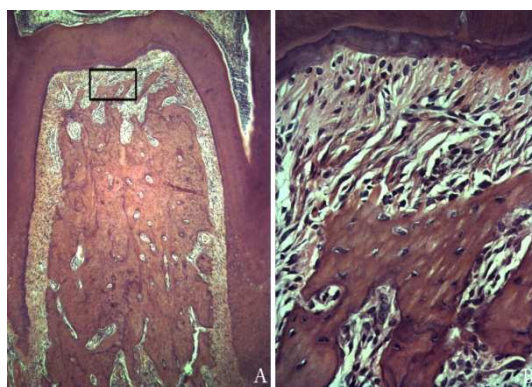


Figura 13: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 4 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

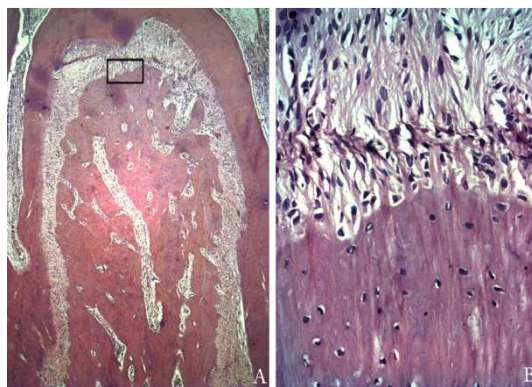


Figura 14: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 4 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

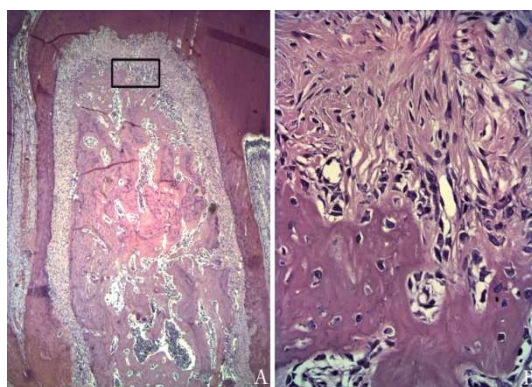


Figura 15: Imagem microscópica da área de furca do Grupo 4 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

Grupo 5

Nos animais do grupo 5, em todos os períodos experimentais, notou-se estreita faixa de tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos e discreta vascularização. O cimento e dentina mostraram-se íntegros. O tecido ósseo foi caracterizado por trabéculas ósseas espessas e bem diferenciadas em toda a extensão inter-radicular (Figs. 16,17 e 18 A-B).

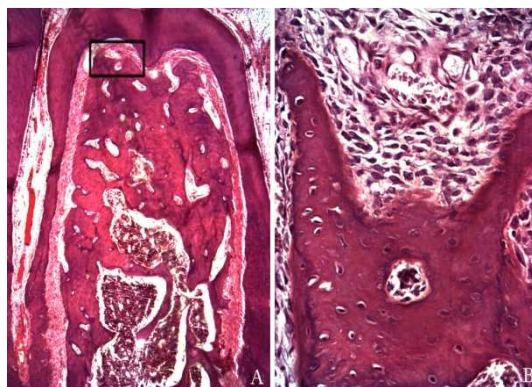


Figura 16. Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 5 aos 7 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.



Figura 17: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 5 aos 14 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

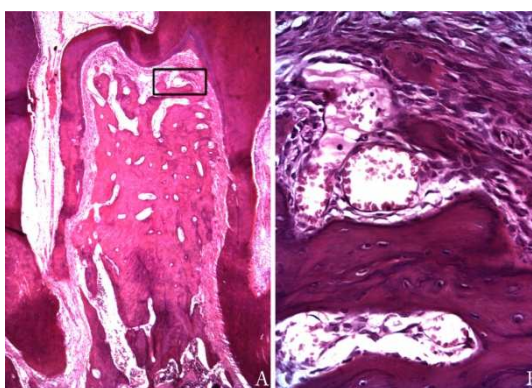


Figura 18: Imagem microscópica da área de Furca do Grupo 5 aos 28 dias: A- aumento de 12,5X; B- aumento de 40X.

3.3- Resultados Histomorfométricos

Os resultados histomorfométricos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histomorfométricos da perda óssea alveolar (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental induzida, de acordo com cada grupo/subgrupo e período.

Grupos	7 dias	14 dias	28 dias
G1	3,79±0,899	2,72±1,07	1,54±0,42
G2	3,50±0,38	2,63±1,44	2,14±0,38
G3	3,81±0,38	1,84±0,75	2,29±0,30
G4	0,54±0,02	1,11±0,14	0,80±0,01
G5	0,47±0,12	0,51±0,03	0,86±0,35

3.4- Resultados Estatísticos

Na análise dos resultados, houve evidências de que tanto o PDT quanto o laser foram efetivos como coadjuvantes a RAR nos ratos tratados com tacrolimo ($p < 0,005$)

Com o passar do tempo a análise estatística demonstrou que houve uma diminuição da área de perda óssea ($p < 0,005$). Como os grupos G1, G2 e G3 não mostraram diferenças significativas ($p > 0,9$) entre si e nem os grupos G4 quando se comparado ao G5 ($p > 0,6$), por mostrarem comportamentos semelhantes. Os grupos, G1, G2 e G3 e os grupos G4 e G5 foram agrupados em dois grupos para otimizar a análise estatística onde se comprovou que o laser associado ou não ao azul de toluidina foi um fator preponderante para que a perda óssea fosse menor nos grupos em que foi utilizado ($p < 0,05$).

O gráfico abaixo obtido das médias das áreas de perda óssea dos grupos de acordo com os períodos demonstra a tendência da diminuição da área de perda óssea com o

passar do tempo e a efetividade do laser e da PDT como terapias coadjuvantes ao tratamento da doença periodontal.

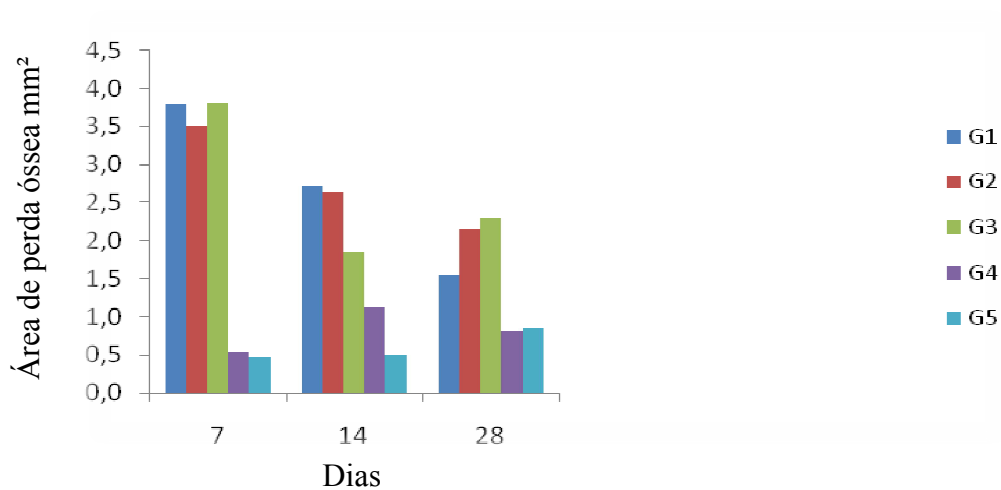


Figura 19: Em Y estão contidos mm² de perda óssea e em X estão os períodos (dias) em que os animais sofreram a eutanásia.

4. DISCUSSÃO

4-Discussão

O presente estudo avaliou a influência do Laser e da PDT como terapias coadjuvantes ao tratamento periodontal convencional em ratos tratados ou não sistemicamente com tacrolimo, submetidos à indução da doença periodontal experimental.

A escolha do rato como modelo animal experimental baseou-se nos estudos de Klausen.⁽³¹⁾ Segundo este autor, o rato é favorável como modelo experimental para o desenvolvimento e estudo da doença periodontal, pois o seu periodonto é semelhante ao do homem, tendo como divergência apenas a presença da queratinização do epitélio sulcular. O uso do fio de algodão adaptado ao redor do primeiro molar, como descrito por Johnson,⁽³²⁾ foi eficiente na indução da doença periodontal experimental. Esta ligadura favoreceu a formação de placa bacteriana e indução de uma resposta inflamatória. No presente estudo, a doença periodontal foi caracterizada pelos sinais clínicos de inflamação gengival, como edema, vermelhidão e perda da aderência do tecido gengival ao dente. Nos animais tratados sistemicamente com tacrolimo, os sinais clínicos de inflamação gengival foram exacerbados e ocorreu menor adesão do tecido gengival ao dente.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os animais tratados com tacrolimo e submetidos somente à raspagem e alisamento corono-radicular (G3), apresentaram perda óssea semelhantes na região de furca comparado aos grupos não submetidos à imunodepressão, mas histologicamente apresentou tecido conjuntivo mais desorganizado, com discreto número de fibroblastos, quando comparados aos animais dos outros grupos. Essas alterações foram descritas em outros trabalhos que também avaliaram os efeitos de drogas imunossupressoras nos tecidos periodontais.^(33, 19)

O uso de imunossupressores ocasiona diminuição do número e da atividade dos osteoblastos e aumento da função dos osteoclastos.⁽¹⁸⁾ Ocorre também uma redução da absorção gastrintestinal do cálcio e aumento da sua excreção urinária, diminuindo seus níveis sanguíneos, fato que desencadeará o estímulo do paratormônio, com consequente reabsorção óssea.⁽³⁴⁾

Os imunossupressores podem provocar atraso no processo de cicatrização⁽³⁵⁻³⁷⁾ pela diminuição da angiogênese e proliferação capilar que reduz o fluxo sanguíneo.⁽³⁸⁻⁴¹⁾ Interferem também na fagocitose e digestão dos antígenos por inibir a migração de macrófagos e estabilizar lisossomos, impedindo a liberação de enzimas proteolíticas. Além disso, alteram as funções dos fibroblastos, retardando a sua migração, prejudicando a síntese de pro-colágeno tipo I e tipo II por alterar a síntese de RNAm e atividade mitótica.^(42, 43)

Algumas pesquisas recentes^(35, 44) demonstraram, em animais tratados sistemicamente com drogas imunossupressoras, diminuição do infiltrado inflamatório, maior diferenciação epitelial, processo de reparo mais diferenciado, com maior deposição de colágeno em feridas cutâneas irradiadas com laser em baixa intensidade, porém com parâmetros distintos do presente estudo. Com relação ao uso do Laser e da PDT sobre o reparo tecidual em animais tratados com drogas imunossupressoras, raros são os trabalhos descritos na literatura, mas os seus resultados demonstraram que estes métodos de tratamento reduziram a perda óssea e favoreceram o reparo ósseo de tecidos que sofreram alterações por altas doses de imunossupressores.^(23, 44, 45)

O número de pesquisas relacionadas aos efeitos antimicrobianos da PDT tem aumentado. Essa terapia consiste na associação de um agente fotossensibilizador com uma fonte de luz, sendo inicialmente utilizada para tratamento oncológico. Estudos têm

mostrado resultados favoráveis utilizando os princípios da PDT contra microrganismos envolvidos com a doença periodontal e peri-implantar.^(21, 46-50)

Um grande número de estudos *in vitro* tem avaliado o efeito antimicrobiano da PDT com diferentes agentes fotossensibilizadores, como azul de metileno, azul de toluidina O, verde de malaquita, fitalocianina disulfonada, porfirinas, fenotiazinas, cianinas, acridinas, corantes fitoterápicos e as clorinas.⁽⁵¹⁾ Alguns estudos recentes têm avaliado a utilização da PDT no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal *in vivo*, tanto em animais^(21, 52) como em humanos.^(48, 25, 53) Porém, o uso do azul de toluidina O como droga fotossensibilizadora na PDT, tem sido pouco avaliado *in vivo* no tratamento da periodontite⁽⁵⁰⁾ e no tratamento da Peri-implantite.^(49, 54)

A PDT promove a sensibilização letal bacteriana de forma mais efetiva sobre bactérias Gram-positivas, enquanto as bactérias Gram-negativas são mais dificilmente sensibilizadas,⁽⁵⁴⁾ além de apresentarem baixa permeabilidade da membrana celular bacteriana aos compostos externos de antibióticos.⁽⁵⁵⁾ No presente estudo foi utilizado o TBO devido ao fato de interagir de forma mais significativa com lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana celular de bactérias gram-negativas, quando comparado ao azul de metileno.^(56, 57)

O efeito benéfico da PDT coadjuvante ao tratamento convencional da doença periodontal, nos animais do grupo 5, provavelmente se deve aos efeitos foto-destrutivos sobre as diferentes espécies bacterianas, presentes nas áreas de doença periodontal induzida, mediados pela reação tipo I (iniciada por superóxidos, hidroxilas aniônicas ou radicais livres) ou pela reação tipo II (iniciada pelo oxigênio singleto).^(51, 58)

A atividade fotodinâmica dos fotossensibilizantes está baseada nas reações foto-oxidativas que promovem alterações bioquímicas e morfológicas nas células alvo.⁽⁵⁹⁾

Quando a molécula da droga fotossensibilizadora absorve os fótons de uma fonte luz ressonante à banda de absorbância, ela passa do estado fundamental para o estado de excitação simples. Dependendo da estrutura de sua molécula e do ambiente, pode perder sua energia por processo eletrônico ou físico e retornar ao estado fundamental, ou pode passar a uma transição para o estado de excitação triplo (estado tripleto). Nesse estágio, as moléculas podem novamente sofrer um decaimento eletrônico e retornarem ao estado fundamental, podem sofrer reações redox com seu ambiente (Reação tipo I), ou sua energia de excitação podem ser transferida para a molécula de oxigênio, permitindo a formação de oxigênio singleto (Reação tipo II). Estas espécies de oxigênio reativo são responsáveis por danos irreversíveis à membrana citoplasmática bacteriana, incluindo modificação protéica, na cadeia respiratória e nos ácidos nucléicos.⁽⁵¹⁾

Alguns fatores podem influenciar na PDT, como o coeficiente de absorção do corante, energia de fonte de luz, a concentração do fotossensibilizador e o tempo de duração do estado tripleto da molécula.^(51, 60-62) Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com estudos na literatura que demonstraram a efetividade da PDT na evolução da doença periodontal em animais,^(21, 52) no tratamento da periodontite em humanos^(25, 53) e na peri-implantite.^(49, 50)

Ficou também evidenciado no presente estudo, que os animais do grupo G4, apresentaram menor perda óssea comparado aos animais dos grupos G1, G2 e G3. Estudos têm relatado que a utilização do laser de baixa intensidade inibe a produção de mediadores inflamatórios por células do ligamento periodontal,^(63, 64) favorece a quimiotaxia celular,⁽⁶⁵⁾ promove vasodilatação e angiogênese local e desta forma poderia haver um aumento na difusão de oxigênio no tecido,^(66, 67, 68) favorecendo o processo de reparo, pois, a secreção do colágeno pelos fibroblastos no espaço

extracelular ocorre somente na presença de altas taxas de pressão de oxigênio.⁽⁶⁹⁾ Além disto, um recente estudo demonstrou que o laser de baixa intensidade associado á raspagem e alisamento radicular, diminui significativamente a perda óssea na região de furca em ratos imunossuprimidos com dexametasona.⁽⁴⁵⁾

O uso de corticóides e de imunossupressores sistêmicos tem sido indicado em baixas e altas doses para vários tratamentos como doenças mucocutâneas,⁽⁷⁰⁾ respiratórias, tendinites, bursites, artrites e cistos em geral.⁽⁷¹⁾ Um dos efeitos colaterais dessas drogas é o aumento do risco a infecções devido aos efeitos inibitórios da imunidade celular,⁽⁷²⁾ podendo ocasionar maiores danos periodontais^(18, 19) como demonstrado neste estudo.

Na análise dos resultados histomorfométricos, os animais dos grupos G4 e G5 que receberam o tratamento com o Laser e a PDT, apresentaram menor perda óssea quando comparado aos animais dos demais grupos em todos os períodos.

Diante destes fatos, o uso de terapias periodontais alternativas ou coadjuvantes ao tratamento convencional de RAR, como o uso de antibióticos sistêmicos, poderia ser indicado, porém com a desvantagem de aumentar a resistência de cepas bacterianas.^(21, 51, 56, 73, 74) Desta forma o uso de agentes bactericidas locais seria a alternativa coadjuvante de escolha para o tratamento da periodontite.

5. CONCLUSÕES

5-Conclusões

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que:

1- Tanto o Laser quanto a PDT foram efetivos como tratamentos coadjuvantes a RAR na redução da perda óssea em periodontite experimental induzida em animais imunodeprimidos com tacrolimo.

2- Estatisticamente, não ficou claro que o imunossupressor tacrolimo utilizado em doses usualmente clínicas promove o aumento do nível de perda óssea em periodontite induzida, mas a análise histológica sugere que sim.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Spolidorio LC, Spolidorio DM, Nassar PO, Nassar CA, Holzhausen M, Almeida OP. Influence of age on combined effects of cyclosporin and nifedipine on rat alveolar bone. *J. Periodontol.* 2004;75(2):268-72.
- 2- Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation.. *Drugs.* 2001;61(13):1957-2016.
- 3- van Mourik ID, Kelly DA. Immunosuppressive drugs in pediatric liver transplantation. *Paediatr Drugs.* 2001;3(1):43-60.
- 4- Mengarelli A, Iori AP, Romano A, Cerretti R, Cerilli L, De Propriis MS, et al. One-year cyclosporine prophylaxis reduces the risk of developing extensive chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica.* 2003 Mar;88(3):315-23.
- 5- Hernández G, Arriba L, Frías MC, de la Macorra JC, de Vicente JC, Jiménez C, et al. Conversion from Cyclosporin A to Tacrolimus as a non-surgical alternative to reduce gingival enlargement: a preliminary case series. *J Periodontol.* 2003 Dec;74(12):1816-23.
- 6- Prabhu A, Mehta DS.. A morphologic comparison of gingival changes influenced by Cyclosporin end Tacrolimus in rats: an experimental study. *J Periodontol.* 2006 Feb;77(2):265-70.
- 7- Spolidorio LC, Spolidorio DM, Massucato EM, Neppelenbroek KH, Campanha NH, Sanches MH. Oral health in renal transplant recipients administered cyclosporin A or tacrolimus. *Oral Dis.* 2006 May;12(3):309-14.

- 8- Bader G, Lejeune S, Messner M. Reduction of cyclosporine-induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient. *J Periodontol.* 1998 Jun;69(6):729-32.
- 9- Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faulds D. Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs.* 1993 Oct;46(4):746-94.
- 10- Spencer C.M, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs.* 1997 Dec;54(6):925-75.
- 11- Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 2000 Feb;59(2):323-89.
- 12- Oettinger-Barak O, Barak S, Machtei EE, Ardekian L, Baruch Y, Peled M. Periodontal changes in liver cirrhosis and post-transplantation patients. I: clinical findings.: Clinical findings. *J Periodontol.* 2001 Sep;72(9):1236-40.
- 13- Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res.* 2005 Jan;54(1):1-9.
- 14- Sasakawa T, Sasakawa Y, Masunaga T, Fujitsu T, Hirayama Y, Ohkubo Y, et al. FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor alpha secretion from peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 2005 Jan 21;29(2):67-71.
- 15- Guimarães MR, Nassar PO, Andia DC, Nassar CA, Spolidorio DM, Rossa C Jr, et al.. Protective effects of tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2007 Sep;52(9):882-8. Epub 2007 Mar 23.

-
- 16- James JA, Jamal S, Hull PS, Macfarlane TV, Campbell BA, Johnson RW, et al. Tacrolimus is not associated with gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Clin Periodontol*. 2001 Sep;28(9):848-52.
- 17- Seymour, RA. Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* 2000. 2006, 40:120-9.
- 18- Lipari WA, Blake LC, Zipkin I. Preferential response of the periodontal apparatus and epiphyseal plate to hydrocortisone and fluoride in the rat. *J Periodontol*. 1974 Dec;45(12):879-90.
- 19- Cavagni J, Soletti AC, Gaio EG, Rosing CK. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Pesqui Odontol Bras* 2005;19:290-294.
- 20- Miyazaki H, Pilot T, Leclercq MH, Barmes DE. Profiles of periodontal conditions in adults measured by CPITN. *Int Dent J*. 1991 Apr;41(2):74-80.
- 21- Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photossensitization in as animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Mar;47(3):932-40.
- 22- Hayek RR, Araújo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, Ribeiro MS.. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol*. 2005 Aug;76(8):1275-81.
- 23- Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by

- photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol.* 2009 Mar;36(3):219-28.
- 24- Pallasch T J. Antibiotic resistance. *Dent Clin North Am.* 2003 Oct;47(4):623-39.
- 25- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Study. *J Periodontol.* 2007 Jun;78(6):965-73.
- 26- Nichols WW, Evans MJ, Slack MPE, Walmsley HL. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol.* 1989 May;135(5):1291-303.
- 27- Feres M, Haffagee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001 Jul;28(7):597-609.
- 28- Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* *in vitro*. *Photochem Photobiol.* 1997 Jun;65(6):1026-31.
- 29- Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low power Laser. *Arch Oral Biol.* 1992 Nov;37(11):883-7.
- 30- Henry CA, Judy M, Dyer B, Wagner M, Matthews JL. Sensitivity of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in liquid media to argon laser. *Photochem Photobiol.* 1995 Apr;61(4):410-3.
- 31- Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991;62:59-73.

-
- 32- Johnson JH. Effects of local irritation and dextran and sulfat administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res* 1975; 10:332 - 345.
- 33- Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 2004;74:103-106.
- 34- Pierce AM, Lindskog S. Early responses by osteoclasts in vivo and dentinoclasts in vitro to corticosteroids. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1989;21:501-508.
- 35- Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg* 2004;22:199-204.
- 36- Bondan EF, Lallo MA, Baz1EI, Sinhorini IL, Graça DL. Estudo ultra-estrutural do processo remielinizante pós-injeção de brometo de etídio no tronco encefálico de ratos imunossuprimidos com dexametasona. *Arq Neuropsiquiatr* 2004;62:131-138.
- 37- Tenius FP, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. Effects of chronic use of dexamethasone on cutaneous wound healing in rats. *An Bras Dermatol* 2007;82:141-149.
- 38- Ehrlich HP, Hunt TK. The effects of cortisone and anabolic steroids on the tensile strength of healing wounds. *Ann Surg.* 1969 Aug;170(2):203-6.
- 39- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975;78:71-100.
- 40- Fässler R, Sasaki T, Timpl R, Chu ML, Werner S. Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing normal and glucocorticoid-treated mice. *Exp Cell Res* 1996;222:111-116.

-
- 41- Durmus M, Karaaslan E, Ozturk E, Gulec M, Iraz M, Edali N, Ersoy MO. The effects of single-dose dexamethasone on wound healing in rats. *Anesth Analg* 2003;97:1377-1380.
- 42- Autio P, Oikarinen A, Melkko J, Risteli J, Risteli L. Systemic glucocorticoids decrease the synthesis of type I and type III collagen in human skin in vivo, whereas isotretinoin treatment has little effect. *Br J Dermatol*. 1994 Nov;131(5):660-3.
- 43- Salmela K. Comparison of the effects of methylprednisolone and hydrocortisone on granulation tissue development: a experimental study in rat. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1981;15(2):87-91.
- 44- Nóbrega FJO. Estudo histológico da ação do laser e da terapia fotodinâmica no processo de reparação de feridas cutâneas em ratos tratados com corticóide. Araçatuba, 2005, 153f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- 45- Garcia VG, Fernandes LA, de Almeida JM, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, Okamoto T, Theodoro LH. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. *Lasers Med Sci*. 2010 Mar;25(2):197-206. Epub 2009 May 14
- 46- Tomaselli F, Maier A, Sankin O, Anegg U, Stranzl U, Pinter H, et al. Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer – a clinical pilot study. *Lasers Surg Med* 2001;28:399 -403.

- 47- Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun d Kadir T. Effect of Galium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbial and clinical study *Lasers Surg Med.* 2002;30(1):60-6.
- 48- Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol.* 2005 Jul;76(7):1100-5.
- 49- Shibli JA, Martins MC, Nociti FH Jr, Garcia VG, Marcantonio E Jr. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: A preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol.* 2003 Mar;74(3):338-45.
- 50- Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Jr, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun;17(3):273-81.
- 51- Wainwright M.. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT).. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jul;42(1):13-28.
- 52- de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):566-75.
- 53- Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *Clin Dent* 2007;18:34-38.

- 54- Malik Z, Hanania J, Nitzan Z. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990; 5:281-93.
- 55- Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of anti-microbial resistance. *Antimicrob Agent Chemother* 1989;33:1831-1836.
- 56- Usacheva M, Teicher TMC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29:165-173.
- 57- Usacheva M, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Laser Surg Med* 2003; 33:311-319.
- 58- Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1997;39: 1-18.
- 59- Prates RA, Yamada Jr AM, Suzuki LC et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *actinobacillus actinomycetemcomitans* *J Photochem Photobiol B* 2007;86; 70-76.
- 60- Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Laser Med Sci* 2007;22:83-91.
- 61- Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol* 2002; 75:51-57.
- 62- Olerud JE, Odland GF, Burgess EM, Wyss CR, Fisher LD, Matsen FA 3rd. A model for the study of wounds in normal elderly adults and patients with peripheral vascular disease or diabetes mellitus. *J Surg Res* 1995;59:349-360.

-
- 63- Saito S, Ngan P, Rosol T, Saito M, Shimizu H, Shinjo N, Shanfeld J, Davidovitch Z. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. *J Dent Res* 1991;70: 27-33.
- 64- Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1995;74:1382-1388.
- 65- Houreld N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomed Laser Surg* 2007;25:78-84.
- 66- Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE, Belkin M. Effect of low-level energy laser on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers Surg Med* 1983;2:267-274.
- 67- Basford JR. Low energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum? *Mayo Clin Proc* 1986;61:671-675.
- 68- Al-Watban FAH, Zhang XY. Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15:209-215.
- 69- Reenstra WR, Veves A, Orlow D et al. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetics versus non diabetic sibling controls. *Acad Emerg Med* 2001;8:519.
- 70- Academy Report. Position paper: oral features of mucocutaneous disorders. *J Periodontol* 2003;74:1545-56.
- 71- Lech O, Severo AL, Silva LHP, Marcolan AM, Lütkemeyer E, Kim JH. Efeito do uso de corticóide em tendões previamente traumatizados: estudo experimental *Rev Bras Ortop* 1996;31:187-192.

- 72- Wannmacher L, Ferreira, MBC. Farmacologia clínica para dentistas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan,1999,346p.
- 73- Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. J.Clin Periodontol 1999;26:347-351.
- 74- Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. Antimicrobial Agents Chemother 2004;48:2173-2178.

7-ANEXOS

Anexo 1- Aprovação da Comissão de Ética Animal.



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA


FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/

DELIBERAÇÃO CEEA Nº 002/2011

A Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEEA/FAMERP, em reunião extraordinária, analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Influência do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal em ratos tratados com Tacrolimo: estudo histológico, imunohistoquímico e histomorfométrico**” (Protocolo FAMERP nº 6912/2007), sob responsabilidade da Dr.^a Maria Alice Sperto Ferreira Baptista, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi **aprovado** por essa Comissão.

Atenção: Ao final do estudo o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final e enviar ao CEEA.

São José do Rio Preto, 06 de abril de 2011.



Prof. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari
Presidente da CEEA
FAMERP

Anexo 2- Submissão do Artigo encaminhado para a revista Transplantation Proceedings

----- **Original Message** -----

From: "Barry D. Kahan, PhD, MD" bkahan@transplantation-proceedings.org

To: m_alice@terra.com.br

Cc:

Sent: Dom 20/03/11 23:37

Subject: Fwd: Submission Confirmation and Article Type Verification for Non-surgical periodontal therapy combined with laser and photodynamic therapies for periodontal disease in immunosuppressed rats

Mar 21 2011 2:36:59

Dear Dr BAPTISTA,

RE: Original Works or Clinical Submission

"Non-surgical periodontal therapy combined with laser and photodynamic therapies for periodontal disease in immunosuppressed rats"

Thank you for submitting your article to Transplantation Proceedings
for consideration for publication.

You selected Original Works or Clinical Submission for this submission. Your article will be considered for publication in one of our dedicated issues as an original work, NOT associated with a congress or meeting.

Please remember that if your original works manuscript is accepted you will be billed US \$99.95 per SUBMITTED manuscript page, table, and figure. Note that 3 pages are

complimentary. If you are unwilling or unable to pay for your manuscript pages please withdraw your article from consideration.

The page charges are assessed according to the number of pages SUBMITTED and NOT the number of pages PRINTED.

Your manuscript has been given Submission Number TRANSPROC-S-11-00222

Your manuscript will undergo a full peer review within the next few weeks after which you will be notified of the outcome by e-mail.

Sincerely,

Bernadette Johnson

Managing Editor

Transplantation Proceedings

Anexo 3- Artigo (*Paper*) na integra publicado pela revista Transplantation Proceedings:



Nonsurgical Periodontal Therapy Combined with Laser and Photodynamic Therapies for Periodontal Disease in Immunosuppressed Rats

P.E. Bottura, J. Milanezi, L.A. Fernandes, H.C. Caldas, M. Abbud-Filho, V.G. Garcia, and M.A.S.F. Baptista

ABSTRACT

Background. Periodontal disease is often associated with systemic diseases and is characterized by destruction of the tissues supporting the teeth. Patients using immunosuppressive drugs such as tacrolimus are among those who suffer from tissue destruction.

Objective. We sought to evaluate the effects of laser and photodynamic therapies (PDT; nonsurgical) as an adjunct to scaling and rootplaning (SRP) in the treatment of corona-induced periodontitis in rats immunosuppressed with tacrolimus (Prograf).

Materials and Methods. The animals were divided into 5 groups. Each groups had 6 rats. Group I, the control group, received only saline solution throughout the study period of 42 days and did not receive periodontal treatment; group II received saline solution and SRP; group III received tacrolimus (1 mg/kg per day) and was treated with SRP; group IV animals were treated identically to group III and then administered laser treatment; and in group V, the animals were treated identically to group III and then administered PDT.

Results. Statistical analysis indicated decreased bone loss with the progression of time ($P = .035$). There was no difference between the bone loss associated with the types of treatment administered to groups I, II, and III ($P > .9$) or groups IV and V ($P > .6$). The analysis also indicated that immunosuppression was not a bone loss-determining factor.

Conclusion. Laser and PDT therapies were effective as an adjunctive treatment to SRP in reducing bone loss caused by experimental periodontitis induced in animals being treated systemically with tacrolimus.

PROLONGED use of some anti-inflammatory and immunosuppressive drugs can alter the periodontal tissues, causing gingival overgrowth, gingival ulceration, migration of the junctional epithelium, and loss of transseptal ligament fibers. Combined with periodontitis, all these pathologies may be exacerbated.¹⁻³ Renal transplant recipients, for example, constitute a high-risk group for oral diseases because they are immunosuppressed.⁴

Studies show that even modern and widely used drugs such as tacrolimus (FK506) can also cause undesirable side effects, particularly to the periodontal tissues, as found with the use of cyclosporine A, even at smaller doses.⁵⁻⁷

Periodontal disease or periodontitis (PD) is mainly caused by periodontopathogenic microorganisms that promote the collapse of supporting structures around the teeth. As a result of the biological responses that occur at affected

sites, patients can suffer alveolar bone loss, destruction of the periodontal ligament, and root cementum and inflammation of gum tissue, all of which may, if untreated, lead to tooth loss.⁸ Systemic diseases such as diabetes, stress, and

From the Department of Medicine, Medical School and Experimental Transplantation & Immunology Laboratory (LITEX, FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; GEPL0, Group of Study and Research on Laser in Dentistry, Division of Periodontics, Department of Surgery and Integrated Clinic, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brazil.

Address correspondence to Dr Maria Alice Sperto Ferreira Baptista, Hospital De Base De São José Do Rio Preto, Nephrology Avenida Brigadeiro Faria Lima 5544, Bairro São Pedro, São José Do Rio Preto, São Paulo, Brazil. E-mail: m_alice@terra.com.br

tobacco use may also be associated with the severity and progression of periodontal disease.⁹

To treat PD, periodontopathic microorganisms are removed or eliminated by well-established methods, such as mechanical scaling and root planing (SRP) that may or may not be aided by surgery. SRP can be associated with adjunctive therapies, such as topical disinfectants and antibiotics that are not free from side effects.^{10–13} Because of the difficulties described, there was a need to develop alternative techniques to mitigate these problems. Photodynamic therapy (PDT), a new noninvasive method of therapy with the ability to kill microorganisms, presents a potential alternative. PDT consists of using a low-power laser to generate an appropriate wavelength that kills microorganisms previously treated with a photosensitizing drug. Studies have demonstrated satisfactory results using this method. Microorganisms die because of light striking an administered photoactive agent and promoting a photo-oxidative reaction that induces biochemical and morphologic changes in target cells.^{9,14–16}

The choice of rats as experimental animal model was based on the work of Klausen.¹⁷ According to Klausen, the rat is useful as an experimental model in the development and study of periodontal disease because the rat periodontium is similar to that of humans, with the only difference being the keratinization of sulcular epithelium. The use of cotton yarn adapted around the first molar, as described by Johnson,¹⁸ was effective in the induction of experimental periodontal disease. This ligation favored the formation of plaque and the induction of an inflammatory response.

This study sought to evaluate the effects of laser therapy and PDT on the treatment of periodontal disease induced in rat treated with the immunosuppressant tacrolimus.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animal procedures were performed in accordance with protocols approved by Institutional Animal Care and Use Committee of Medical School and FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Thirty adult male Wistar rats (250–300 g) were used for this study. All animals were kept in plastic cages with access to food and water ad libitum. Before the operative procedures, all animals were allowed to acclimatize to the laboratory environment for a period of 5 days.

Periodontal Disease Model

An experimental periodontal model, as previously described by Klausen and et al,¹⁷ was used. After general anesthesia, induced with ketamine hydrochloride (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) applied intraperitoneally, all animals received a cotton ligature around the first molars randomly distributed between the left or right molar at the level of the gingival sulcus and maintained for 7 days to produce periodontitis.¹⁸ The contralateral sides of the teeth that had ligations served as negative control in all groups.

Drugs

Tacrolimus (Prograf, Fujisawa Healthcare, Inc.) was injected subcutaneously into the rats daily. The dose used was similar to

clinically used doses, equivalent to 1 mg/kg per day.¹⁹ The subcutaneous injections were initiated 7 days before the experimental induction of periodontitis. After each euthanasia period, an immunosuppressed animal was chosen randomly and serologically tested to evaluate drugs in the blood and creatinine values.

Study Design

Each group was composed of 6 animals. Euthanasia occurred at 7, 14, and 28 days after the removal of the ligature and respective treatment. The experimental groups were divided into the following groups:

Group 1: control, the animals received saline solution throughout the study period and were not submitted to SRP; group 2: the animals received saline solution throughout the study period and underwent SRP; group 3: the animals received tacrolimus (1 mg/kg per day) for the induction of immunosuppression throughout the study and were treated with SRP; group 4: the animals were treated identically to group 3 and then administered laser treatment; and group 5: the animals were treated identically to group 3 and then administered PDT. Laser treatment, PDT, and SRP were performed 7 days after the induction of periodontal disease. All 3 treatments were administered immediately after the removal of the ligature.

Experimental Protocol

SRP. The left molars were subjected to SRP using manual modified Gracey 1–2 curettes (Millenium, Golgran, São Paulo, Brazil) through 10 distal-mesial traction movements in the buccal and lingual aspects. The furcation and interproximal areas were scaled with the same curettes through cervico-occlusal traction movements. The SRP was performed by the same experienced operator.

Laser Treatment. The low-intensity laser used in this study was a Thera Lase (DMC Equipamentos Ltda, Sao Carlos, Sao Paulo, Brazil) with the following characteristics: emitters InGaAlP and GaAlAs, a wavelength of 685–830 nm, useful Power between 35 and 100 mW, continued and pulsed emission with a 600- μ m diameter optical fiber. After SRP and saline solution deposition in the periodontal pocket, the low-intensity laser was used on 3 equidistant points at each buccal and lingual aspect of the first mandibular molar in contact with the tissue. The laser treatment was released with a power of 35 mW 5 s/point, a power density of 0.428 W/cm², and energy of 6 J/point (57.14 J/cm²/point). The treated areas received a total energy of 24 J.

PDT. Without using a bevel, toluidine blue-O was slowly deposited into the periodontal pocket using a syringe (1 mL) and an insulin needle (13 \times 0.45 mm Becton Dickinson Ind. Ltd., Curitiba, PR, Brazil). After 1 minute, the region was then subjected to low-intensity laser treatment.

Experimental Periods

Seven, 14, and 28 days posttreatment (SRP, laser, and PDT), 2 rats in each experimental group were humanely killed by overdose of anesthesia. Immediately thereafter, the mandible of each animal was removed and separated into 2 parts. The parts were then fixed in buffered formalin 10% for a minimum of 48 hours.

Laboratory Procedures

After securing the mandible components in 10% formalin for a minimum of 48 hours, they were washed in water for 12 hours to

remove the formalin and were demineralized in a solution with equal parts of 50% formic acid and 20% sodium citrate for 15 days.⁹ Serial sections obtained from paraffin (6 μ m) in the mesiodistal direction were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Histologic and Histometric Analysis

The sections dyed by H&E were analyzed with light microscopy to establish bone loss and characteristics of periodontal ligament in the furcation region of the first molars. The bone loss area in the furcation region was histometrically determined using an image analysis system (Image Tool, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Tex). After excluding the first and the last sections where the furcation region was evident, 5 equidistant sections of each specimen block were selected and captured by a digital camera connected to a light microscope. The mean values were averaged and compared statistically.

RESULTS

The tacrolimus and creatinine levels in the blood were tested randomly in 1 rat from each group on the day of killing and the values reported in the testing were very similar in all tested rats, being around 9 and 0.7 mg/dL, respectively.

Histologic and Histometric Analyses

Group 1. At day 7, the connective tissue contained a large number of degenerate polymorphonuclear neutrophils and small amounts of poorly organized bone trabeculae. At 14 and 28 days, the tissue contained a small number of fibroblasts, blood vessels, and fragments of necrotic bone tissue (Fig 1A, B).

Group 2. At days 7 and 28, well-developed tissue with a moderate number of fibroblasts and some blood vessels is still present. Well-developed bone is present, and the

periodontal ligament has integrity. At 14 days, however, the tissue exhibits a moderate number of fibroblasts and mild vascularization (Fig 2A, B).

Group 3. In all experimental periods, the extensive tissue areas were occupied by degenerate polymorphonuclear neutrophils or poorly organized connective tissue with a discrete number of fibroblasts. Toward the bottom of the alveoli, the bone trabeculae are poorly organized (Fig 3A, B).

Group 4. At day 7, connective tissue with a moderate number of fibroblasts and well-developed bone is visible. At 14 and 28 days, the tissue was well-differentiated, rich in collagen fibers, and there is a discrete number of fibroblasts. A narrow strip between the root surface and bone tissue is well-differentiated and developed, evidence of the level of bifurcation. Note also in this area a small band of epithelial tissue (Fig 4A, B).

Group 5. In all experimental periods, we found a narrow strip of tissue, well developed, with a moderate number of fibroblasts and mild vascularization. The cementum and dentin are intact. The bone tissue is characterized by thick and well-differentiated trabeculae across the inter-root length (Fig 5). The histometric results are summarized in Table 1.

Statistical Analysis

Statistical results were obtained by analysis of variance with 2-criteria of all groups and periods. The treatment groups were tested using Bioestat 5.0 software (Bioestat; Brazilian Industry, Belém do Pará, PA, Brazil). There were significant difference between the groups based on the type of treatment ($P < .0005$). Statistical analysis showed decreased bone loss with the progression of time ($P < .05$). There was no significant difference in bone loss area based on treatment between groups 1, 2, and 3 ($P > .9$) or

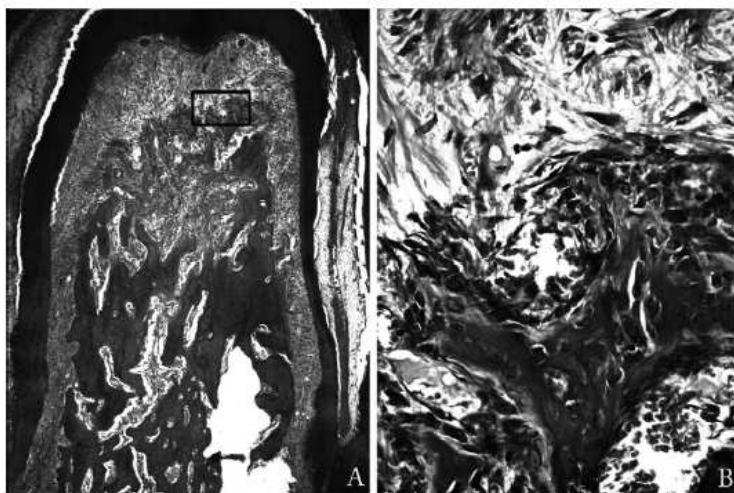
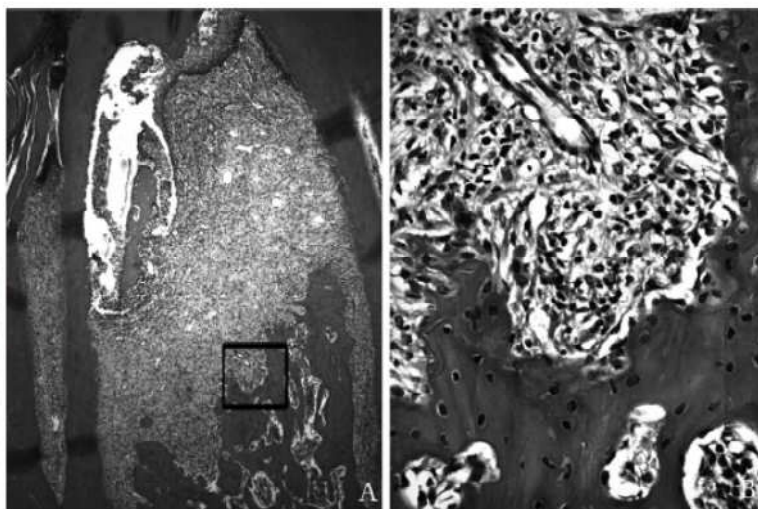


Fig 1. Photomicrograph of the periodontal ligament area and bone loss in the furcation region of the mandibular first molar in group 1 (no treatment) at 14 days, apical third into the furcation region. The areas of bone resorption with thin bone trabeculae and necrotic bone tissue are visible (stain: hematoxylin and eosin; original magnification: A, $\times 12.5$; B, $\times 40$).

Fig 2. Photomicrograph of the periodontal ligament area and bone loss in the furcation region of the mandibular first molar in group 2 (SRP) at 14 days, apical third into the furcation region. Areas of bone resorption with thin bone trabeculae and mild vascularization are visible (stain: hematoxylin and eosin; original magnification: A, $\times 12.5$; B, $\times 40$). SRP, scaling and root planing.



between groups 4 and 5 ($P > .6$). The statistical results indicate that immunosuppression was not a determining factor in the level of bone loss in the groups.

Because of the similarity in bone loss, the groups were rearranged to optimize the statistical analysis: Groups 1, 2, and 3 into a single group and groups 4 and 5 into another. The use of a laser, with or without toluidine blue, was a main factor in bone loss. Bone loss was lower in the groups treated with by laser ($P < .005$; Fig 6).

DISCUSSION

This study evaluated the potential of laser therapy and PDT as adjuvants to conventional periodontal treatments in rats

suffering from induced experimental periodontal disease and treated systemically with tacrolimus. For this study, periodontal disease was characterized by clinical signs of gingival inflammation, such as edema, redness, and loss of adhesion of the gingival tissue to the tooth. In animals treated systemically with tacrolimus, the clinical signs of gingival inflammation were exaggerated, and there was less adhesion of gingival tissue to the tooth.

The results of this study demonstrate that animals treated with tacrolimus and SRP (group 3) showed greater bone loss in the furcation and histologically a more disorganized tissue space, with a discrete number of fibroblasts compared with the animals of the other groups. These changes have

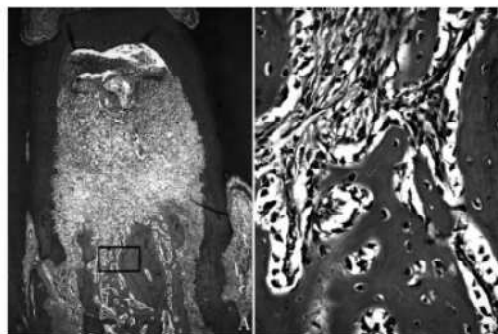


Fig 3. Photomicrograph of the periodontal ligament area and bone loss in the furcation region of the mandibular first molar in group 3 (tacrolimus and SRP) at 14 days, apical third into the furcation region. Areas of bone resorption with thin bone trabeculae and disorganized connective tissue are visible (stain: hematoxylin and eosin; original magnification: A, $\times 12.5$; B, $\times 40$). SRP, scaling and root planing.

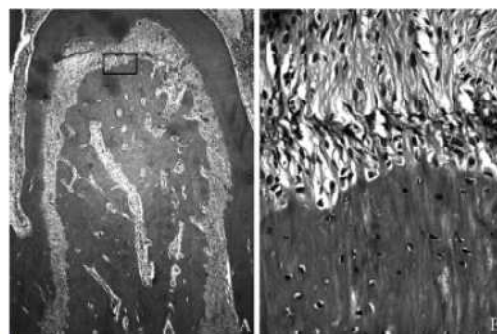


Fig 4. Photomicrograph of the periodontal ligament area and bone loss in the furcation region of the mandibular first molar in group 4 (tacrolimus and laser) at 14 days, coronary third into the furcation region. Thick bone trabeculae with minimum signs of resorption are visible (stain: hematoxylin and eosin; original magnification: A, $\times 12.5$; B, $\times 40$).

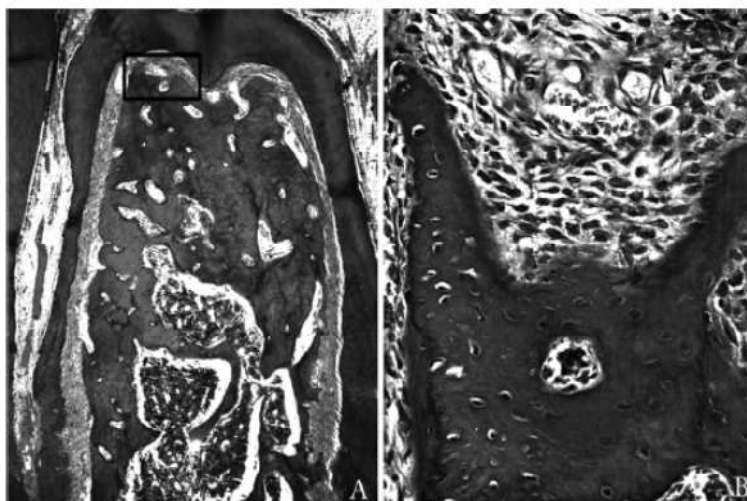


Fig 5. Photomicrograph of the periodontal ligament area and bone loss in the furcation region of the mandibular first molar in group 5 (tacrolimus and PDT) at 14 days, coronary third into the furcation region. Thick bone trabeculae without signs of resorption are visible (stain: hematoxylin and eosin; original magnification: A, $\times 12.5$; B, $\times 40$). PDT, photodynamic therapy.

been described in other studies that also evaluated the effects of immunosuppressive drugs in periodontal tissues.^{3,20}

The use of immunosuppressive therapy causes a decrease in the number and activity of osteoblasts and increased function of osteoclasts.² There is also a reduction in gastrointestinal absorption of calcium and increased urinary excretion, decreasing blood levels, a condition that triggers the stimulation of parathyroid hormone and subsequent bone reabsorption.²¹ Immunosuppressive drugs may cause delays in healing²²⁻²⁴ via decreased angiogenesis and blood flow-reducing vascular proliferation.²⁵⁻²⁸ The drugs also interfere in the phagocytosis and digestion of antigens by inhibiting the migration of macrophages and stabilizing lysosomes, preventing the release of proteolytic enzymes. Furthermore, immunosuppressive drugs alter the functions of fibroblasts, delaying their migration and affect the synthesis of pro-collagen types I and II by altering the synthesis of mRNA and mitotic activity.^{29,30}

Some recent research^{22,31} in animals treated with systemic immunosuppressive drugs and with wounds irradiated with a low-intensity laser has demonstrated reduced inflammatory infiltration, increased epithelial differentiation, a

more differentiated repair process, and more collagen deposition in the wounds. However, the parameters of that study were different than those of the current study. Studies regarding the use of laser therapy and PDT on wound healing in animals treated with immunosuppressive drugs are rare in the literature, but those that do exist indicate that the laser therapy and PDT reduced bone loss and promoted the repair of bone tissue that had previously been altered by high doses of immunosuppressive drugs.^{9,32}

The amount of research related to the antimicrobial effects of PDT has increased. PDT involves the combination of a photosensitizing agent and a light source. It was initially used to treat cancer. Studies have shown favorable results using the principles of PDT against microorganisms involved in periodontal disease and peri-implant diseases.³³⁻³⁸

Table 1. Mean Values and Standard Deviations (M \pm SD) of Alveolar Bone Loss (mm²) Histometric Data in the Furcation of the First Molar with Experimentally Induced Periodontitis

Group	7 Days	14 Days	28 Days
1	3.79 \pm 0.899	2.72 \pm 1.07	1.54 \pm 0.42
2	3.50 \pm 0.38	2.63 \pm 1.44	2.14 \pm 0.38
3	3.81 \pm 0.38	1.84 \pm 0.75	2.29 \pm 0.30
4	0.54 \pm 0.02	1.11 \pm 0.14	0.80 \pm 0.01
5	0.47 \pm 0.12	0.51 \pm 0.03	0.86 \pm 0.35

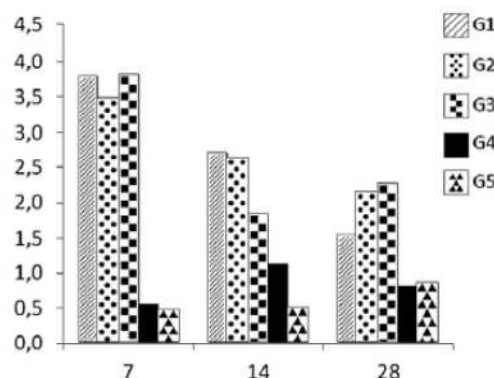


Fig 6. Y-axis is area (mm²) of bone loss and X-axis is period (days) on which the animals were humanely killed.

In the present study, histometric analysis indicated that animals in groups 4 and 5, which received treatment with laser therapy and PDT, demonstrated less bone loss when compared with animals from other groups in all periods.

A large number of *in vitro* studies have evaluated the antimicrobial effects of PDT with different photosensitizers used, such as methylene blue, toluidine blue-O, malachite green, fitalocianinadisulfonada, porphyrins, phenothiazines, cyanine, acridines, herbal dyes, and chlorins.³⁹ Some recent studies have evaluated the use of PDT in the nonsurgical treatment of periodontal disease *in vivo*, both in animals^{33,40} and in humans.^{11,36,41} However, the use of toluidine blue as the photosensitizing drug in PDT has received little *in vivo* evaluation in the treatment of periodontitis and treatment of peri-implantitis.^{37,38,42}

PDT promotes the killing of gram-positive bacteria more effectively than the killing of gram-negative bacteria owing to differences in sensitization ability⁴² and gram-negative bacteria having a low permeability of the bacterial cell to compounds and external antibiotics.⁴³ In this study, we used toluidine blue O because it interacts more meaningfully with the lipopolysaccharides present in the cell membrane of gram-negative bacteria, compared with blue metileno.^{44,45}

The beneficial effects of PDT adjunct to conventional treatment of periodontal disease in group 5 are probably due to the photodestructive effect on the different bacterial species present in the areas of induced periodontal disease mediated by type I (initiated by superoxide, hydroxyl radicals or anionic) or type II reactions (initiated by singlet oxygen).^{39,46}

The photodynamic activity of photosensitizers is based on photo-oxidative reactions that promote morphologic and biochemical changes in target cells.⁴⁷ When the photosensitizing drug molecule absorbs photons from a light source to the resonant band absorbance, it is placed in an excited state. Depending on the structure of its molecule and the environment, the molecule can lose energy by electronic or physical process and return to the ground state, or may pass to a transition to the excited state triple (triplet state). At this stage, the molecules can again undergo a decay and return to the electronic ground state, undergo redox reactions with their environment (reaction type I), or their excitation energy can be transferred to the oxygen molecule, allowing the formation of singlet oxygen reaction (type II). These reactive oxygen species are responsible for irreversible damage to the bacterial cytoplasmic membrane, including protein modification in the respiratory chain and in fatty and nucleic acids.³⁹

Some factors may influence PDT and the coefficient of absorption of the dye, such as the energy source of light, photosensitizer concentration, and the duration of the triplet state molecule.^{39,48-50} The results of this study are agreement with the literature that has demonstrated the effectiveness of PDT in the evolution of periodontal disease in animals,^{33,40} in the treatment of periodontitis in humans,^{11,41} and in peri-implantitis.^{37,38}

In the present study, we also demonstrated that the

animals in group 4 had less bone loss compared with animals in groups 1, 2, and 3. Studies have reported that the use of low-intensity laser inhibits the production of inflammatory mediators in periodontal ligament cells,^{51,52} promotes cell chemotaxis,⁵³ and promotes vessel dilation and angiogenesis; consequently, there could be an increase in oxygen diffusion in tissue,⁵⁴⁻⁵⁶ favoring the repair process because the secretion of collagen by fibroblasts in the extracellular space occurs only in the presence of high rates of oxygenic pressure.⁵⁷ Moreover, a recent study showed that low-intensity laser associated with SRP significantly reduced bone loss in furcation in immunosuppressed rats treated with dexamethasone.³²

Corticosteroids and systemic immunosuppressants have been used in low- and high-dose treatments for various diseases, such as mucocutaneous, respiratory, tendinitis, bursitis, arthritis, and cysts in general.^{58,59} A side effect of these drugs is the increased risk of infection owing to the inhibitory effects of cellular immunity,⁶⁰ which may cause further periodontal damage, as demonstrated in this study.^{2,3}

Given these facts, the use of periodontal therapy alternatives or adjuncts to conventional treatment of RAR, such as the use of antibiotics, might be indicated, particularly because of the disadvantage of potentially increasing the antibiotic resistance of bacterial strains.^{33,39,44,61,62} Thus, the use of local antibacterial agents would support alternative choices for the treatment of periodontitis.

In the histometric and statistical analysis of the results, the animals in groups 4 and 5 that received treatment with laser and PDT showed less bone loss when compared with animals from other groups in all periods. With advantages and a specific ability to target cells, no side effects, a light-controllable onset of activity, and no induction of resistant bacterial strains as with antibiotics, PDT is an effective method of with great potential as an adjunct in the treatment of periodontal disease.

In conclusion, within the limits of this study, both laser and PDT were effective as adjuvant therapies to SRP, in that they reduced bone loss in animals suffering induced experimental periodontitis treated systemically with tacrolimus.

REFERENCES

1. Seymour RA: Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* 40:120, 2006
2. Lipari WA, Blake LC, Zipkin I: Preferential response of the periodontal apparatus and epiphyseal plate to hydrocortisone and fluoride in the rat. *J Periodontol* 45:879, 1974
3. Cavagni J, Soletti AC, Gaio EJ, et al: The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Braz Oral Res* 19:290, 2005
4. Spolidorio LC, Spolidorio DM, Massucato EM, et al: Oral health in renal transplant recipients administered cyclosporin A or tacrolimus. *Oral Dis* 12:309, 2006
5. Prabhu A, Mehta DS: A morphologic comparison of gingival changes influenced by cyclosporin and tacrolimus in rats: an experimental study. *J Periodontol* 77:265, 2006
6. de Oliveira Costa F, Diniz Ferreira S, de Miranda Cota LO, et al: Prevalence, severity, and risk variables associated with

- gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporin regimens. *J Periodontol* 77:969, 2006
7. Sekiguchi RT, Paixão CG, Saraiva L, et al: Incidence of tacrolimus-induced gingival overgrowth in the absence of calcium channel blockers: a short-term study. *J Clin Periodontol* 34:545, 2007
 8. Miyazaki H, Pilot T, Leclercq MH, et al: Profiles of periodontal conditions in adults measured by CPITN. *Int Dent J* 41:74, 1991
 9. Fernandez LA, de Almeida JM, Theodoro LH, et al: Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 36:219, 2009
 10. Pallasch TJ: Antibiotic resistance. *Dent Clin North Am* 47:623, 2003
 11. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, et al: Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 78:965, 2007
 12. Nichols WW, Evans MJ, Slack MPE, et al: The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 135:1291, 1989
 13. Feres M, Haffagee AD, Allard K, et al: Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol* 28:597, 2001
 14. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, et al: Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of Porphyromonas gingivalis in vitro. *Photochem Photobiol* 65:1026, 1997
 15. Dobson J, Wilson M: Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low power laser. *Arch Oral Biol* 37:883, 1992
 16. Henry CA, Judy M, Dyer B, et al: Sensitivity of Porphyromonas and Prevotella species in liquid media to argon laser. *Photochem Photobiol* 61:410, 1995
 17. Klausen B: Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 62:59, 1991
 18. Johnson IH: Effects of local irritation and dextran sulfate and administration on the periodontium of the rat. *J Periodontol Res* 10:332, 1975
 19. Guimarães MR, Nassar PO, Andia DC, et al: Protective effects of tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 52:882, 2007
 20. Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, et al: Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 74:103, 2004
 21. Pierce AM, Lindskog S: Early responses by osteoclasts in vivo and in vitro dentinoclasts to corticosteroids. *J Submicrosc Cytol Pathol* 21:501, 1989
 22. Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, et al: The histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg* 22:199, 2004
 23. Bondan EF, Lallo MA, Baz EI, et al: Ultrastructural study of the remyelinating process following local ethidium bromide injection in the brainstem of dexamethasone-immunosuppressed rats. *Arq Neuropsiquiatr* 62:131, 2004
 24. Tenius FP, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO: Effects of chronic use of dexamethasone on cutaneous wound healing in rats. *An Bras Dermatol* 82:141, 2007
 25. Ehrlich HP, Hunt TK: The effects of cortisone and anabolic steroids on the tensile strength of healing wounds. *Ann Surg* 170:203, 1969
 26. Leibovich SJ, Ross R: The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78:71, 1975
 27. Fässler R, Sasaki T, Timp R, et al: Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing of normal and glucocorticoid-treated mice. *Exp Cell Res* 222:111, 1996
 28. Durmus M, Karaaslan E, Ozturk E, et al: The effects of single-dose dexamethasone on wound healing in rats. *Anesth Analg* 97:1377, 2003
 29. Autio P, Oikarinen A, Melkkoski J, et al: Systemic glucocorticoids decrease the synthesis of type I and type III collagen in human skin in vivo, whereas isotretinoin treatment has little effect. *Br J Dermatol* 131:660, 1994
 30. Salmela K: Comparison of the effects of methylprednisolone and hydrocortisone on granulation tissue development: experimental study in the rat. *Scand J Plast Reconstr Surg* 15:87, 1981
 31. Nóbrega FJO: Histological study of the effect of laser and photodynamic therapy in the repair of skin wounds in rats treated with corticosteroids. Araçatuba, 2005, 153f. Dissertation (Master in Periodontics) - Faculty of Dentistry of Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
 32. Garcia VG, Fernandes LA, de Almeida JM, et al: Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. *Lasers Med Sci* 25:197, 2010
 33. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, et al: In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in the animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 47:932, 2003
 34. Tomaselli F, Maier A, Sankin O, et al: Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer—a clinical pilot study. *Lasers Surg Med* 28:399, 2001
 35. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, et al: Effect of galium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbial and clinical study. *Lasers Surg Med* 30:60, 2002
 36. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, et al: Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 76:1100, 2005
 37. Shibli JA, Martins MC, Nociti FH Jr, et al: Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* 74:338, 2003
 38. Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, et al: Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 17:273, 2006
 39. Wainwright M: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 42:13, 1998
 40. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, et al: Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 78:566, 2007
 41. Andersen R, Loebel N, Hammond D, et al: Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 18:34, 2007
 42. Malik Z, Hanania J, Nitzan Z: Bactericidal effects of photoactivated porphyrins—an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 5:281, 1990
 43. Nikaido H: Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1831, 1989
 44. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA: Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 29:165, 2001
 45. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA: The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med* 33:311, 2003
 46. Ochsner M: Photophysical and Photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *J Photochem Photobiol B* 39:1, 1997
 47. Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, et al: Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B* 86:70, 2007

48. Maisch T: Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci* 22:83, 2007
49. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, et al: Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol* 75:51, 2002
50. Olerud JE, Odland GF, Burgess EM, et al: A model for the study of wounds in normal elderly adults and patients with peripheral vascular disease or diabetes mellitus. *J Surg Res* 59:349, 1995
51. Saito S, Ngan P, Rosol T, et al: Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. *J Dent Res* 70:27, 1991
52. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, et al: Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 74:1382, 1995
53. Houreld N, Abrahamse H: In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomed Laser Surg* 25:78, 2007
54. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, et al: Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers Surg Med* 2:267, 1983
55. Basford JR: Low energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum? *Mayo Clin Proc* 61:671, 1986
56. Al-Watban FA, Zhang XY: Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg* 15:209, 1997
57. Reenstra WR, Veves A, Orlow D, et al: Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetics versus non diabetic sibling controls. *Acad Emerg Med* 8:519, 2001
58. Academy Report: Position paper: oral features of mucocutaneous disorders. *J Periodontol* 74:1545, 2003
59. Lech O, Severo AL, Silva LHP, et al: Effect of corticosteroids in previously traumatized tendons: an experimental study. *Rev Bras Ortop* 31:187, 1996
60. Wannmacher L, Ferreira MBC: *Clinical pharmacology in dentistry*, 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999. p 346
61. Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE: Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 26:347, 1999
62. Gad F, Zahra T, Hasan T, et al: Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2173, 2004