

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GLAUCO RODRIGUES CARMO SILVEIRA

**EFEITOS DA DOXICICLINA E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
COMO ADJUVANTES AO TRATAMENTO CONVENCIONAL DA
DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: UMA ANÁLISE
BIOQUÍMICA, RADIOGRÁFICA, HISTOMORFOMÉTRICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

ALFENAS/MG

2019

GLAUCO RODRIGUES CARMO SILVEIRA

**EFEITOS DA DOXICICLINA E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
COMO ADJUVANTES AO TRATAMENTO CONVENCIONAL DA
DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: UMA ANÁLISE
BIOQUÍMICA, RADIOGRÁFICA, HISTOMORFOMÉTRICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes.
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra.

ALFENAS/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S587e Silveira, Glauco Rodrigues Carmo.
Efeitos da doxiciclina e do laser de baixa intensidade como adjuvantes ao tratamento convencional da doença periodontal induzida em ratos: uma análise bioquímica, radiográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica / Glauco Rodrigues Carmo Silveira - Alfenas/MG, 2019.
74 f.: il. --
Orientador: Leandro Araújo Fernandes
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Doxiciclina. 2. Lasers. 3. Ratos. I. Fernandes, Leandro Araújo. II. Título.

CDD-617.632



GLAUCO RODRIGUES CARMO SILVEIRA

EFEITOS DA DOXICICLINA E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE COMO ADJUVANTES AO TRATAMENTO CONVENCIONAL DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: UMA ANÁLISE BIOQUÍMICA, RADIOGRÁFICA, HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 10/5/19

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Leandro Araújo Fernandes

Profª. Dra. Suzane Cristina Pigossi
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: [Assinatura]

Prof. Dr. Ricardo Garcia Mureb Jacob
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano
UNIFENAS

Assinatura: R. Jacob

Dedico a Deus, aos meus pais,
e a todos os envolvidos na
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Alfenas**, onde, através da faculdade de Odontologia da Unifal-MG, tive a oportunidade de crescimento acadêmico durante o programa de pós-graduação em ciências odontológicas.

Ao programa **PROCAD**, pelo custeio de itens que foram utilizados nesta pesquisa.

Aos **docentes**, Leandro Araújo Fernandes, Noé Vital Ribeiro Júnior, João Adolfo Costa Hanemann, Suzane Cristina Pigossi, Renata Ribeiro Bruzadelli, Larissa Santana Rodriguez, Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, Francisca Isabel Ruela, Juliana dos Santos Neves, Daniela Coelho de Lima, Ronaldo Célio Mariano, Alessandro Aparecido Pereira, André Gustavo Paleari, Marcela Filié Haddad, Vivien Thiemy Sakai, pelos ensinamentos e oportunidades durante este período.

Ao meu orientador, **Leandro Araújo Fernandes**, pelo exímio profissional e ser humano que é, com seriedade e competência se empenhou para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível, por todo o seu auxílio durante a pesquisa e também pelos ensinamentos clínicos, através da sua orientação pude crescer um pouco como profissional e ser humano, muito obrigado.

Aos **funcionários**, Luzia, Ana Paula, Terezinha, pela amizade, prestatividade e gentileza ao longo do mestrado;

À professora **Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão**, que contribuiu fortemente na realização da parte bioquímica desta pesquisa.

Ao professor, **Roberto Martins Lourenço**, e aos **funcionários e técnicos da radiologia** da Unifal-MG pelo apoio na execução da fase radiológica deste estudo.

À professora **Juliana dos Santos Neves**, e aos técnicos do laboratório de histologia **Andréa, Moacir e Fernando**, por tornarem possível a realização da parte histológica deste trabalho.

Ao professor, **Noé Vital Ribeiro Júnior** e à professora, **Suzane Cristina Pigossi**, pela amizade e pelos ensinamentos durante as clínicas de cirurgia periodontal.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Júlio Mesquita Filho (UNESP)** agradeço pelo suporte na realização do processamento imunoistoquímico deste trabalho, em especial aos docentes, **Alberto Carlos Botazzo Delbem, Edilson Ervolino e Luciano Tavares Ângelo Cintra.**

Aos alunos que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho, **Derick, Fernanda, Henrique, Alexandre e Patrícia.**

Ao amigo, **Eduardo Quintão Manhanini**, pelo grande apoio durante o processamento imunoistoquímico.

Aos colegas de república, **Bruno e Júnior**, pelo bom convívio e amizade durante estes anos em Alfenas.

Aos meus pais, **Ronaldo do Carmo Silveira e Ângela Maria Rodrigues Silveira**, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para que eu pudesse trilhar este caminho profissional.

Às minhas irmãs, **Gracielle Silveira Piccirillo e Nayara Rodrigues Carmo Silveira**, ao meu avô, **José Carlos da Silveira** e à minha afilhada, **Alice Silveira Piccirillo**, e a todos os familiares que sempre torceram pelo meu crescimento.

Com certeza não pude lembrar de todos que contribuíram para a realização deste trabalho e que deveriam estar nesta lista de agradecimentos, mas agradeço imensamente a todos.

Por fim, agradeço a **Deus**, pela dádiva da vida e por me guiar em meus caminhos até aqui.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Muito obrigado.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar através de análises bioquímicas, radiográficas, histomorfométricas e imunoistoquímicas, os efeitos sistêmicos e locais da doxiciclina (DOX) e do laser de baixa intensidade (LBI) como adjuvantes à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da doença periodontal induzida em ratos. Cento e cinquenta (150) ratos receberam a indução da doença periodontal através de um fio de algodão na região dento-gengival dos primeiros molares inferiores esquerdos. Após setes dias, a ligadura foi removida e os animais divididos em cinco grupos de 30 ratos cada, de acordo com os seguintes tratamentos locais: grupo controle (C) – os animais não foram submetidos a nenhum tratamento, grupo RAR – os animais foram submetidos apenas à RAR, grupo DOX – os animais foram submetidos à RAR e à irrigação com DOX, grupo LBI – os animais foram submetidos à RAR e irradiação com LBI, e grupo DOX+LBI – os animais foram submetidos aos tratamentos de RAR, irrigação com DOX e irradiação com LBI. Após estas etapas, os animais foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias pós tratamentos locais para a realização das análises bioquímicas, radiográficas, histomorfométricas e imunoistoquímicas. Na análise bioquímica sistêmica entre os grupos, observou-se uma concentração de Alfa-1-glicoproteína ácida e Complemento 3 (C3) significativamente menor no grupo DOX+LBI comparado a todos os outros grupos em todos os períodos experimentais, e para o Complemento 4 (C4) aos 15 e 30 dias ($p < 0,01$). Na análise entre os períodos, observou-se no grupo DOX+LBI, que as concentrações de proteínas Alfa-1-glicoproteína ácida, C3 e C4 foram diminuindo de forma significativa entre os períodos de 7, 15 e 30 dias ($p < 0,01$). Na análise entre os grupos em relação à perda óssea local na região de furca, observou-se uma perda óssea significativamente menor no grupo DOX+LBI comparado aos grupos C, RAR e DOX em todos os períodos experimentais e um número significativamente menor de células TRAP positivas no grupo DOX+LBI comparado aos outros grupos, em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$). Na análise entre os períodos, pode-se observar no grupo DOX+LBI, uma menor perda óssea e de células TRAP positivas aos 30 dias comparado com o período de 7 dias ($p < 0,01$). Após os tratamentos locais, observou-se que ocorreu uma correlação positiva entre os valores sistêmicos das proteínas Alfa-1-glicoproteína ácida, C3 e C4, com os valores locais das áreas de perda óssea na região de furca e número de células TRAP positivas, pois a medida que houve uma diminuição das proteínas ocorreu também uma diminuição da área de perda óssea e do número de células TRAP positivas. Dentro dos limites deste estudo, podemos concluir que a associação da doxiciclina

ao laser de baixa intensidade adjuvantes à raspagem e alisamento radicular, foram efetivos tanto sistemicamente como localmente, no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

Palavras-chaves: Doxiciclina. Lasers. Ratos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the systemic and local effects of Doxycycline (DOX) and Low Intensity Laser (LBI) as adjuvants to scaling and root planing (RAR) in the treatment of the disease through biochemical, radiographic, histomorphometric and immunohistochemical analysis induced periodontal disease in rats. One hundred and fifty (150) rats received the induction of periodontal disease through a cotton thread in the dento-gingival region of the first left lower molars. After seven days, the ligature was removed and the animals were divided into five groups of 30 rats each, according to the following local treatments: Control Group (C) – the animals were not submitted to any treatment, Group RAR – the animals were submitted only to RAR, Group DOX – animals were submitted to RAR and DOX irrigation, Group LBI – the animals were submitted to RAR and irradiated with LBI, and Group DOX + LBI – the animals were submitted to RAR treatments, irrigation with DOX and irradiation with LBI. After these steps, the animals were euthanized at 7, 15 and 30 days post local treatments for biochemical, radiographic, histomorphometric and immunohistochemical analyzes. In the systemic biochemical analysis between groups, a significantly lower concentration of Alpha-Glycoprotein and Complement 3 (C3) was observed in the DOX + LBI group compared to all other groups in all experimental periods, and for Complement 4 (C4) at 15 and 30 days ($p < 0.01$). In the analysis between the periods, it was observed in the DOX + LBI Group that the concentrations of Alpha-Glycoprotein, C3 and C4 proteins decreased significantly between the periods of 7, 15 and 30 days ($p < 0.01$). In the analysis between groups regarding local bone loss in the furcation region, a significantly lower bone loss was observed in the DOX + LBI Group compared to Groups C, RAR and DOX in all experimental periods and a significantly lower number of TRAP cells positive in the DOX + LBI group compared to the other groups, in all experimental periods ($p < 0.01$). In the analysis between the periods, one can observe in the DOX + LBI group, lower bone loss and TRAP cells positive at 30 days compared to the 7-day period ($p < 0.01$). After local treatments, a positive correlation was observed between the systemic values of the alpha-glycoprotein proteins, C3 and C4, with the local values of the areas of bone loss in the furcation region and number of positive TRAP cells, since the measurement that there was a decrease in proteins there was also a decrease in the area of bone loss and in the number of positive TRAP cells. Within the limits of this study, we can conclude that the association of Doxycycline with Low Intensity Laser adjuvant to root scaling and smoothing were effective both locally and systemically in the treatment of periodontal disease induced in rats.

Keywords: Doxycycline. Lasers. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Animal posicionado na mesa operatória.....	33
Figura 2 -	Pinça modificada utilizada para a passagem do fio.....	33
Figura 3 -	Posicionamento do fio.....	33
Figura 4 -	Fio posicionado.....	33
Figura 5 -	Doença periodontal após 7 dias de indução.....	34
Figura 6 -	Raspagem e alisamento radicular.....	34
Figura 7 -	Seringas hipodérmicas para aplicação local da DOX.....	34
Figura 8 -	Aplicação do gel de DOX após RAR.....	34
Figura 9 -	Irradiação com o LBI.....	34
Figura 10 -	Aplicação da DOX e irradiação com o LBI.....	34
Figura 11 -	Delineamento do estudo e períodos experimentais.....	35
Figura 12 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo C - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	48
Figura 13 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo RAR - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	49
Figura 14 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	49
Figura 15 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo LBI - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para	

	OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	50
Figura 16 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX+LBI - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	50
Figura 17 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo C - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	51
Figura 18 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo RAR - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	51
Figura 19 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	52
Figura 20 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo LBI - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	52

Figura 21 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX+LBI – 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	53
Figura 22 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo C - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	53
Figura 23 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo RAR - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	54
Figura 24 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	54
Figura 25 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo LBI - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	55
Figura 26 -	Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX+LBI - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Média e desvio padrão ($M \pm SD$) das concentrações (mg/dl) de Alfa-1-glicoproteína ácida de acordo com cada grupo/período.....	42
Tabela 2 –	Média e desvio padrão ($M \pm SD$) das concentrações (mg/dl) de proteína C3 de acordo com cada grupo/período.....	43
Tabela 3 –	Média e desvio padrão ($M \pm SD$) das concentrações (mg/dl) de proteína C4 de acordo com cada grupo/período.....	43
Tabela 4 –	Média e desvio padrão ($M \pm SD$) das distâncias entre a união cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (mm) na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo e período.....	44
Tabela 5 –	Média e desvio padrão ($M \pm SD$) dos dados histométricos da perda óssea alveolar (mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, de acordo com cada grupo e período.....	46
Tabela 6 –	Média e desvio padrão ($M \pm SD$) do número de células TRAP positivas (un) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, de acordo com cada grupo e período.....	47
Tabela 7 –	Correlação entre os dados sistêmicos (bioquímicos) e locais (radiográficos, histométricos e imunoistoquímicos) de acordo com cada grupo e período.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Aa</i> -	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AGP -	Alfa-1-glicoproteína ácida
ATP -	Adenosina trifosfato
α TNF -	Fator de necrose tumoral α
C -	Controle
C3 -	Complemento 3
C4 -	Complemento 4
C5 -	Complemento 5
C6 -	Complemento 6
C7 -	Complemento 7
C8 -	Complemento 8
C9 -	Complemento 9
CEUA -	Comissão de ética no uso de animais
COBEA -	Colégio brasileiro de experimentação animal
DOX -	Doxiciclina
DOX+LBI -	Doxiciclina e laser de baixa intensidade
DP -	Doença periodontal
NF-Kb -	Fator nuclear kappa beta
FCG -	Fluido crevicular gengival
GRUPO C -	Grupo Controle
GRUPO RAR -	Grupo raspagem e alisamento radicular
GRUPO DOX -	Grupo doxiciclina
GRUPO LBI -	Grupo laser de baixa intensidade
GRUPO DOX+LBI -	Grupo doxiciclina e laser de baixa intensidade
HE -	Hematoxilina e eosina
InGaAIP -	Laser de fosfato de arsênio, índio, gálio

LBI -	Laser de baixa intensidade
LPS -	Lipopolissacarídeo
M -	Média
MBL -	Lectina ligadora de manose
MMPs -	Metaloproteinases de Matriz
MMP-8 -	Metaloproteinase de matriz 8
mL -	Mililitro
ml/Kg -	Mililitro por quilograma
mg/dl	Miligrama por decilitro
mW -	Miliwatt
mm -	Milímetro
NaCl -	Cloreto de sódio
nm -	Nanometro
OPG -	Osteoprotegerina
PBS -	Tampão fosfato de sódio
PCR -	Proteína C reativa
PFA -	Proteína de fase aguda
<i>Pg</i> -	<i>Porphyromona gingivalis</i>
PMN -	Polimorfonuclear
PO -	Perda óssea
RANK -	Receptor ativador do fator nuclear kappa beta
RANKL-	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta
RAR -	Raspagem e alisamento radicular
R1 -	Reagente
SD -	Desvio padrão
<i>Tf</i> -	<i>Tannerella forsythia</i>
TGF- b-1 -	Fator beta transformador de crescimento
TRAP -	Fosfatase ácida tartarato resistente
W/cm ² -	Watt por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL.....	20
2.2	TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	22
2.3	DOXICICLINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	23
2.4	LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	24
2.5	PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFA).....	27
2.5.1	<u>Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP)</u>	27
2.5.2	<u>Sistema Complemento</u>	28
2.6	IMUNOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO.....	29
3	OBJETIVOS	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	AMOSTRA.....	32
4.2	INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL.....	32
4.3	TRATAMENTOS LOCAIS E DIVISÃO DOS GRUPOS.....	33
4.4	PERÍODOS EXPERIMENTAIS.....	35
4.5	COLETA DE SANGUE E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	36
4.6	ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PLASMA.....	36
4.7	TOMADA RADIOGRÁFICA E ANÁLISE DIGITAL.....	37
4.8	PROCESSAMENTO LABORATORIAL E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	38
4.8.1	<u>Análise histológica</u>	38
4.8.2	<u>Análise histométrica</u>	39
4.9	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	39
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS	42
5.1	RESULTADOS BIOQUÍMICOS.....	42
5.2	RESULTADOS RADIOGRÁFICOS.....	44

5.3	RESULTADOS HISTOLÓGICOS (Figuras de 12 a 26).....	45
5.4	RESULTADOS HISTOMÉTRICOS (Figuras de 12 a 26).....	45
5.5	RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS (Figuras de 12 a 26).....	46
5.6	CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS ESTUDADOS.....	48
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

O periodonto é um complexo sistema, tendo como constituintes o cimento radicular, ligamento periodontal, osso alveolar e junção dentogengival. Esse sistema fixa os elementos dentais à maxila e mandíbula, preserva suas posições e tem importante papel na nutrição dos dentes, além de prevenir injúrias aos dentes e ossos por meio da dissipação de forças mastigatórias (BOTTINO et al., 2012). O desempenho do sistema periodontal depende da integridade de suas estruturas e a interação entre esses componentes (NANCI et al., 2006).

A Doença Periodontal (DP) é uma doença crônica, produzida pela ação de bactérias gram-negativas, possuindo níveis de prevalência elevados (PETERSEN et al., 2012). Acometem os tecidos periodontais, a partir de uma manifestação inicial, a gengivite, que se caracteriza por processos inflamatórios, hiperemia edema e sangramento gengival, podendo evoluir para a periodontite (LIU et al., 2012). Há uma clivagem das fibras colágenas, desencadeando a migração apical do epitélio juncional e formação da bolsa periodontal (RYAN et al., 2000).

O tratamento da DP inicia-se pela eliminação da microbiota subgengival patogênica, lançando mão de raspagem e alisamento radicular (RAR) (KALDAHL et al., 1993; LISTGARTEN, 1975). Porém, apenas o tratamento de RAR, pode ser falho na eliminação de bactérias patogênicas localizadas no interior dos tecidos moles, duros, ou áreas inacessíveis ao instrumento periodontal, como região de furca e depressões radiculares (ADRIAENS et al., 1988; MATIA et al., 1986).

Pela existência dessas limitações, podemos utilizar métodos adjuvantes à terapia periodontal convencional (DALCICO, 2013; TING et al., 2016). Considerando o papel proeminente do hospedeiro, como principal componente da destruição de tecidos moles e duros visto na periodontite, estratégias terapêuticas, como a farmacológica, tem se sobressaído como uma nova abordagem de tratamento (DALCICO, 2013; TING et al., 2016), sendo que as Tetraciclina quimicamente modificadas como a doxiciclina (DOX), quando aplicadas diminuíram a inflamação dos tecidos periodontais (BILDT et al., 2006).

Uma recente revisão sistemática concluiu que o debridamento ultrassônico ou a RAR, quando associados ao uso local de antimicrobianos em bolsas periodontais com profundidades de sondagem ≥ 5 mm, promovem melhoras mais significativas na redução da profundidade de

sondagem e no ganho de nível de inserção clínico, quando comparado ao debridamento sozinho ou RAR sozinhos (CHAMBRONE et al., 2016).

Uma outra forma de tratamento adjuvante ao tratamento de RAR é a fotobiomoduladora com o uso do Laser de baixa intensidade (LBI), que também tem demonstrado efeitos positivos no tratamento periodontal (KIM et al., 2013). A fotobiomodulação está incluída no grupo dos efeitos fotoquímicos, nos quais a luz atua em processos moleculares e bioquímicos que ocorrem nos tecidos, como na cicatrização e reparo tecidual (PINHEIRO et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL

O periodonto é constituído pelo osso alveolar que forma o alvéolo dentário, pelo cimento que recobre a raiz dentária, pelo ligamento periodontal que está entre os dois anteriores, formando uma articulação do tipo gonfose e pela gengiva (REQUICHA et al., 2014).

Quando os tecidos de suporte dos dentes são afetados pela placa bacteriana, podemos ter duas alterações periodontais chamadas de gengivite e periodontite, sendo que a segunda é caracterizada pela formação de bolsas periodontais, propiciando a proliferação de bactérias patogênicas e de um processo inflamatório que causa a destruição do ligamento periodontal, do osso alveolar, retração gengival e, se não tratada, à perda do elemento dental (NIEMIEC, 2008).

Os sinais comuns presentes tanto na gengivite quanto na periodontite são a presença de sangramento, edema e aumento do fluido cervical, que resultam da atividade inflamatória, intermediada por bactérias ou endotoxinas, e da resposta imunológica/humoral do hospedeiro com a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), linfócitos, imunoglobulinas e sistema complemento (REGEZI et al., 2013).

As doenças crônicas avançam em todos os setores e estão presentes em todas as classes socioeconômicas. Dieta pouco saudável, má nutrição, sedentarismo, tabagismo, uso excessivo de álcool e estresse psicossocial são os fatores de risco mais importantes. A doença periodontal é um componente de carga global da doença crônica, tendo os mesmos fatores básicos de riscos (PETERSEN et al., 2012).

Uma das razões que pode determinar uma evolução da gengivite para periodontite é a presença de indicadores e fatores de risco, como o tabagismo e o diabetes, que são os mais estudados e consagrados pela literatura (BERGSTROM, 2014). Além desses dois fatores, outros vêm sendo estudados, como a obesidade, álcool, osteoporose e fatores psicossociais (DICKIE DE CASTILHOS et al., 2012).

A periodontite crônica possui como principais características: taxa de progressão leve a moderada, podendo ter períodos de progressão rápida, presença de irritantes locais compatíveis

com a severidade da doença e de ocorrência maior em adultos, podendo acometer crianças e adolescentes. Por outro lado, a periodontite agressiva compreende um grupo de lesões caracterizadas por ocorrer em indivíduos geralmente saudáveis, com tendência genética à doença, cujas manifestações clínicas são caracterizadas por rápida perda de inserção e destruição óssea, que não condizem com a quantidade de acúmulo de placa (LINDHE et al., 2010).

As doenças periodontais surgem a partir da colonização de bactérias à superfície dentária, predominantemente microrganismos gram-positivos (colonização primária), tais como *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguinis*, *Veillonella parvula* e *Capnocytophaga ochracea* (BEREZOW et al., 2011).

A infecção com *Streptococcus sanguinis*, comumente encontrado em placa dentária, pode aumentar a agregação plaquetária, influenciando no desenvolvimento de eventos tromboembólicos. Ele tem sido foco de investigação nos casos de DP, sendo um dos agentes etiológicos da endocardite bacteriana (BEREZOW et al., 2011).

O edema do tecido gengival e o sangramento presentes na periodontite podem levar à reabsorção óssea, verificada radiograficamente e seu estágio final é a perda do elemento dentário pela eliminação total do tecido de sustentação (LINDHE et al., 2010). A formação e o aumento da placa bacteriana responsáveis pela periodontite podem ser prevenidos a partir de uma boa higiene oral (WEIJDEN et al., 2011).

A periodontite pertence a uma família de doenças relacionadas que diferem quanto à etiologia, história natural e resposta terapêutica, porém, partilham do mesmo mecanismo de destruição do tecido conjuntivo e da perda óssea. Essa se inicia pela colonização bacteriana secundária (bactérias gram-negativas e anaeróbicas) sobre a superfície dentária e a subsequente formação de reação inflamatória (LINDHE et al., 2010).

Na colonização secundária, diferentes espécies de microrganismos (*Prevotella intermedia*, *Prevotellalo escheii*, espécies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*) se aderem às bactérias já existentes na placa bacteriana, alterando a concentração hidrogeniônica e a tensão do oxigênio, o que torna o meio ideal para proliferação (ARMITAGE et al., 2000).

A instalação da doença e seus sintomas clínicos são resultados de uma complexa interação entre microrganismos, sua virulência e a resposta do hospedeiro (LOOMER et al., 2004).

2.2 TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

A RAR promove a eliminação periódica do biofilme, cálculo e substâncias incorporadas ao cimento periodontal, sendo o tratamento periodontal mais eficaz para se obter uma superfície radicular limpa e compatível com a saúde dos tecidos periodontais (CARRARO et al., 2008).

A aplicação dos procedimentos básicos não depende apenas do tipo de instrumento e das variações anatômicas dos dentes, mas da habilidade do profissional no uso dos instrumentos periodontais (SOUZA et al., 2012).

Os procedimentos de RAR não atuam de maneira seletiva sobre os microorganismos relacionados à doença periodontal, mas são considerados fundamentais na terapia periodontal. Contudo, determinadas formas de doença periodontal ou determinados sítios podem não responder adequadamente ao tratamento mecânico convencional, devido à incompleta descontaminação da bolsa periodontal, à invasão bacteriana do tecido conjuntivo, ou à deficiência em mecanismos imunológicos de defesa frente à microbiota (PRETZL et al., 2009).

A remoção do biofilme dental aderido é o principal objetivo das técnicas de RAR. A terapêutica convencional para tratamento de indivíduos com periodontite crônica é baseada na remoção mecânica de depósitos bacterianos, localizados supra e subgingivalmente, além da remoção de fatores de retenção e instruções de higiene oral (CARRARO et al., 2008). Porém, apenas a instrumentação periodontal é ineficaz para a completa eliminação da *A. actinomycetemcomitans* (WORCH et al., 2001).

A fisiologia da doença periodontal é revista sob a ótica da bioquímica, lançando mão dos avanços científicos, atualmente, presume-se que as alterações inflamatórias sejam causadas não somente por bactérias, mesmo sendo essenciais para o desencadeamento do processo, porém insuficientes para justificar evolução clínica, mas também, a resposta do hospedeiro é determinante para a progressão (KINANE et al., 2011).

A RAR pode não ser suficiente para o tratamento da doença ou faz parte da fase inicial antes da terapêutica cirúrgica em casos de periodontite com bolsas profundas (MATTHEWS, 2009).

2.3 DOXICICLINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

Uma grande variedade de antimicrobianos de uso tópico e sistêmico têm sido estudados como adjuvantes ao tratamento convencional da doença periodontal. Dentre os antimicrobianos locais muitos têm demonstrado eficácia clínica, especialmente em pacientes em terapia de manutenção e como complementares a RAR, como as Tetraciclinas (HEASMAN et al., 2011).

A doxiciclina (DOX) é uma tetraciclina com potente efeito na inibição de metaloproteinases de matriz (MMPs) (BILDT et al., 2007; GOLUB et al., 1994). As MMPs exercem um importante papel na remodelação do tecido conjuntivo durante o desenvolvimento, homeostase e cicatrização (LAUER-FIELDS et al., 2002).

O colapso da matriz extracelular acontece pelo desequilíbrio entre as MMPs ativadas e seus inibidores endógenos derivados do hospedeiro, os inibidores de MMPs, durante a doença periodontal (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; SÉEGUIER et al., 2000).

A metaloproteinase de matriz 8 (MMP-8) é uma endopeptidase cálcio e zinco – dependente que se destaca entre as MMPs predominantemente presentes no tecido gengival inflamado, fluido crevicular gengival (FCG), saliva e fluido sulcular e periimplantar. Funciona em pH neutro, e o seu nível e grau de ativação parece aumentar com o aumento da atividade e gravidade da doença periodontal e diminuir com a instituição do tratamento com RAR (LAUER-FIELDS et al., 2002).

Pela existência de resposta imune deficiente, o organismo do hospedeiro não consegue eliminar os microorganismos patogênicos, se instalando o processo inflamatório. A inflamação crônica produz radicais livres de oxigênio que ativam metaloproteinases, que vão degradar o colágeno do ligamento periodontal diminuindo a fixação do dente ao processo alveolar, aumentando a profundidade do sulco gengival (KIILI et al., 2002).

A destruição dos tecidos periodontais, frequentemente associada ao aprofundamento do sulco gengival diferencia a periodontite da gengivite sendo refletida no FCG de sítios com lesão periodontal por altos níveis de MMP-8 ativa. Na gengivite pode haver níveis ligeiramente elevados de MMP-8 no FCG, mas ela estará na proforma latente e inativa. Durante a fase ativa da periodontite os níveis de MMP-8 ficam significativamente elevados e ela é quase completamente convertida para a forma ativa (SORSA et al., 1999).

A DOX tem sido considerada o antimicrobiano de ação local com maior efetividade, capaz de promover benefícios expressivos (EICKHOLZ et al., 2002).

Alguns estudos afirmam que o Gel de DOX possui a capacidade de manter-se no sítio subgingival por pelo menos dez dias, reduzindo o volume de FCG e do fator beta transformador de crescimento b-1 (TGF-b-1), observado pela melhora dos sinais clínicos da inflamação, redução da profundidade de sondagem e ganho clínico de inserção (KIM et al., 2004; GÜRKAN et al., 2005).

O Gel de DOX a 10% foi utilizado como adjuvante a RAR melhorando os níveis de inserção clínica e reduzindo a profundidade de sondagem de forma mais efetiva do que somente a RAR no tratamento de pacientes com periodontite crônica (GRUPTA, 2008).

Os benefícios observados pelo uso da administração local de DOX não são uma unanimidade encontrada entre os pesquisadores. Foi observado que o Gel de DOX a 8,8% como adjunto no retratamento de bolsas periodontais patológicas persistentes não melhorou significativamente os resultados em termos de redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção relativa comparado ao debridamento mecânico sozinho (TOMASI et al., 2008).

2.4 LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

Em 1917 Albert Einstein elucidou os princípios físicos do LASER, termo que é o acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação), e em sua teoria o classificou como sendo de “alta intensidade” (com potencial destrutivo) ou de “baixa intensidade” (sem potencial destrutivo) (EINSTEIN, 1917). Porém, sua teoria tornou-se realidade apenas em 1960, ano em que Theodore Maiman construiu o primeiro emissor de luz laser a rubi (MAIMAN, 1960).

Na atualidade, o laser vem sendo utilizado principalmente em procedimentos clínicos, na realização de incisões e coagulações em cirurgias, com o uso do laser de alta intensidade, e para fins terapêuticos pela modulação de processos biológicos, com a utilização do laser de baixa intensidade (ABDULJABBAR et al., 2017; HEIDARI et al., 2017).

A interação do laser com os tecidos se realiza nas interfases, mediante os fenômenos de reflexão e refração e, no interior do meio, onde tem lugar a transmissão, fato que depende principalmente dos fenômenos de absorção e dispersão. Estes dois últimos fatores dependem do comprimento da onda e da natureza absorvente (AGNES, 2005).

Em sua terapêutica, a cicatrização é o principal efeito da interação tecido-laser possibilitando incremento à produção de ATP, o que proporciona um aumento da velocidade mitótica das células, estimulando a microcirculação que aumenta o aporte de elementos nutricionais associado ao aumento da velocidade mitótica, facilitando a multiplicidade das células, assim, ocorre o efeito de neovascularização a partir dos vasos já existentes gerando melhores condições para a cicatrização rápida (STEFANELLO; HAMERSKIA, 2006).

O laser age como anti-inflamatório e analgésico que somados ao seu poder bioestimulante diminuem o desconforto logo após a primeira aplicação e aceleram a reparação, além de proporcionar estímulo ao nível de fibroblastos, com formação de fibras colágenas mais ordenadas, verificando-se clinicamente aceleração na cicatrização e logo após a primeira aplicação o paciente já relata alívio da dor (REGGIORI, 2008).

A terapia a laser, quando utilizada nos tecidos e nas células, não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (CATAO et al., 2004).

Entre os efeitos bioestimulantes mediados pelo laser de baixa intensidade (LBI) no processo de reparo tecidual, destacam-se: a indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos; o incentivo a produção de colágeno por estas últimas células; a inibição secretória de alguns mediadores químicos; a modificação da densidade capilar e o estímulo a microcirculação local (SILVA et al., 2007; MALUF et al., 2006).

O LBI aumenta a atividade quimiotática e fagocitária dos leucócitos humanos *in vitro*. No processo de reparo das feridas, a ativação dos linfócitos pela radiação laser pode torná-los mais responsivos aos mediadores estimulativos presentes nos tecidos injuriados (WALSH et al., 1997).

O laser terapêutico aumenta a atividade fagocitária dos macrófagos durante a fase inicial do processo de reparo, aproximadamente seis horas após o trauma, facilitando a limpeza da ferida e estabelecendo as condições necessárias a fase proliferativa subsequente. Em nível vascular, o LBI estimula a proliferação das células endoteliais, resultando na formação de

numerosos vasos sanguíneos, na produção aumentada do tecido de granulação, estimulando o relaxamento da musculatura vascular lisa e contribuindo, assim, para os efeitos analgésicos da terapia a laser (WALSH et al., 1997).

O LBI desempenha, possivelmente, um importante papel no reparo alveolar após extração dental, uma vez que exerce efeitos pronunciados em cultura de osteoblastos, influenciando os processos de proliferação, diferenciação e calcificação (WALSH et al., 1997).

Em alguns estudos sobre neoformação óssea, sugere-se que o efeito bioestimulante do laser não se deva apenas a suas propriedades específicas, mas também a criação de uma série de condições locais que acelerariam a neoformação óssea e a resolução de edemas (SILVA et al., 2007; MALUF et al., 2006).

O aumento da proliferação de fibroblastos, que pode ocorrer com a aplicação do laser, apesar de não terem sido realizadas pesquisas *in vivo*, traria benefícios para a terapia periodontal regenerativa (KREISLER et al., 2002).

O debridamento mecânico convencional continua sendo o tratamento de primeira escolha da gengivite e da periodontite. Entretanto, a ação biomoduladora, anti-inflamatória e analgésica do laser pode ajudar a acelerar a reparação dos tecidos periodontais e reduzir o sangramento da área a ser tratada (SAKURAI et al., 2000).

Na periodontia, pode ser aplicado antes e depois do procedimento de RAR e de cirurgia periodontal, para diminuir o sangramento, a dor, o edema, evidenciar cálculo subgengival, eliminar pseudobolsas e bioestimular os tecidos. Utiliza-se ainda em úlceras traumáticas, em úlceras aftosas recorrentes, em herpes simples recidivante, aumentando a reparação e diminuindo o tempo de evolução da doença. Quando o LBI é aplicado em região com parestesia, ocorre uma bioestimulação nas fibras nervosas (GENOVESE, 2000).

As doenças crônicas avançam em todas as regiões e permeiam todas as classes socioeconômicas. Dieta pouco saudável, má nutrição, sedentarismo, tabagismo, uso excessivo de álcool e estresse psicossocial são os fatores de risco mais importantes. A doença periodontal é um componente de carga global da doença crônica, tendo os mesmos fatores de riscos essenciais (PETERSEN et al., 2012).

2.5 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFA)

As PFA estão elevadas na resposta aguda do hospedeiro frente a alterações sistêmicas, e são fundamentais para a imunidade inata. São importantes biomarcadores da inflamação, infecção, neoplasia, estresse e trauma. Todos os animais apresentam PFA, porém o tipo de proteína principal difere de acordo com a espécie. (CRAY, 2012).

Distúrbios devido à infecção, inflamação, injúria tecidual, neoplasia ou desordem imunológica, causam uma resposta de fase aguda inespecífica, que compreende alterações na concentração de algumas proteínas séricas. A mensuração das concentrações das PFA pode auxiliar no monitoramento de protocolos terapêuticos em determinadas neoplasias (CÉRON et al., 2005).

Estas proteínas são úteis no auxílio diagnóstico de linfomas em pacientes humanos, leucemia e mieloma múltiplo, indicam também o prognóstico, permitindo detectar precocemente a sepse (ECKERSALL, 2004).

2.5.1 Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP)

A AGP foi descrita pela primeira vez em 1920 por Schmid, Winzler e colaboradores, em 1977, Twining e Brecher identificaram, por técnicas imunológicas, a AGP como componente da fração sobrenadante de um tumor maligno mamário, embora a associação entre o câncer e a AGP seja bem conhecida, outros autores mostraram que a AGP era detectável através de técnicas imunohistoquímicas, em tecido sadio, como por exemplo, no miocárdio humano. Em 1978, Gahmberg e Andersson descreveram a existência de anticorpos específicos para a AGP humana (FOURNIER et al., 2000).

A AGP altera-se de forma significativa diante de um processo inflamatório (CONNER et al., 1989), podendo diminuir na insuficiência hepática e nefropatias (YUKI et al., 2010), ela apresenta propriedades imunomoduladoras, no reparo e na cicatrização, se liga a maioria das drogas e agentes inespecíficos, e apresenta a sua concentração elevada na erliquiose, parvovirose, linfoma, sarcoma e carcinoma (CERÓN et al., 2005).

Os biomarcadores inflamatórios são ferramentas importantes no acompanhamento da evolução de uma doença inflamatória diante da resposta à terapêutica instituída (BENCE et al., 2005). Neste contexto, a AGP é uma PFA utilizada no monitoramento de doenças inflamatórias (WINKEL et al., 2015; PALTRINIERI et al., 2007; KAJIKAWA et al., 1999).

2.5.2 Sistema Complemento

Um conjunto com cerca de 30 proteínas plasmáticas produzidas principalmente por hepatócitos e, em menor quantidade, por monócitos e macrófagos, esse é o sistema complemento, componente da imunidade inata (BERGER, 2007; ITURRY-YAMAMOTO, 2001). Na presença de substâncias estranhas ao organismo, essas proteínas se ativam em cascata, podendo ter como resultado a citólise da célula alvo e a indução de uma resposta inflamatória com vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos e degranulação de mastócitos (FORTE, 2007; VERDEGUER et al., 2007).

A cascata de ativação do Sistema Complemento pode ocorrer por três diferentes vias: clássica, alternativa e das lectinas. A via clássica depende da presença de anticorpos. A via alternativa independe da presença de anticorpos. A via das lectinas, utiliza a proteína lectina ligadora de manose (MBL): resíduos de manose e outros açúcares, organizados em um padrão, que recobrem a superfície de diferentes patógenos, ligam-se à lectina do hospedeiro, ativando a cascata do Complemento de forma análoga à via clássica. O resultado da ativação destas três vias é uma resposta inflamatória induzida pela geração de produtos da clivagem de componentes do Sistema Complemento (FORTE, 2007).

A falta de algumas das proteínas do Sistema Complemento pode gerar a inativação de uma das vias ou todas as três, dependendo do comprometimento ao longo da cascata de ativação. As deficiências dessas proteínas são determinadas, em geral, por herança genética. Indivíduos portadores dessas características genéticas apresentam comprometimento quantitativo ou qualitativo do Sistema Complemento, que pode acarretar em susceptibilidade ao desenvolvimento de determinadas infecções e de algumas enfermidades, em especial doenças autoimunes (FALCÃO, 2008).

Dessa forma, concentrações séricas reduzidas das proteínas do Sistema Complemento, C3 e C4, podem ser observadas em algumas fases do Lúpus Eritematoso Sistêmico, em alguns tipos de Glomerulonefrite Membranoproliferativa, assim como a deficiência de C3 ou de C5, C6, C7, C8 ou C9 podem estar associadas à presença de infecções meningocócicas (HEBERT, 1991; WEST, 1989).

Entretanto, os componentes C3, C4 e os produtos de sua clivagem podem atuar como mediadores inflamatórios, podendo ser observadas elevadas concentrações séricas em algumas doenças inflamatórias (THOMAS, 1998; MARKIEWSKI, 2007), como aumento de C3 e/ou C4 na asma (CASTELLOTE, 1984).

2.6 IMUNOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO

Os osteoclastos são células multinucleares que agem na reabsorção óssea, derivadas a partir de células progenitoras hematopoiéticas e sua diferenciação é intimamente regulada por osteoblastos, células que atuam na formação de tecido ósseo (ROODMAN, 2006; CHAMBERS, 2010).

O processo de remodelação óssea é controlado por um sistema composto por três proteínas: RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa beta), seu ligante RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta) e o competidor natural OPG (osteoprotegerina) (FERNANDES et al., 2014).

RANKL é uma das citocinas que são expressas pelos osteoblastos, que atua de forma essencial na diferenciação de osteoclastos. RANKL está ligada à proteína de membrana de células como osteoblastos, fibroblastos e células T, é um mediador do processo de formação dos osteoclastos e possui afinidade pelo receptor RANK, a ligação RANK-RANKL na superfície de pré-osteoclastos ativa o fator nuclear Kappa beta (NF-kB) que leva a diferenciação dessas células. Assim, a ligação RANK-RANKL também determina a diferenciação de osteoclastos imaturos em osteoclastos maturados. A expressão de RANKL pelos osteoblastos, no tecido ósseo, atua permitindo a diferenciação, maturação e ativação dos osteoclastos através da ligação ao seu receptor, RANK, presente na superfície de pré-osteoclastos (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2008; CHAMBERS, 2010).

A proteína OPG também é produzida pelos osteoblastos, assim, se estabelece um equilíbrio entre a osteoclastogênese, pela produção de RANKL, e a inibição desta atividade osteoclástica, pela expressão de OPG. Secretada pelos osteoblastos, a OPG exerce um efeito protetor no osso; faz parte da superfamília de receptores α TNF (Fator de necrose tumoral α), contudo, embora seja expressa em vários tecidos, possui um papel essencial no sistema esquelético, agindo como um receptor solúvel que se liga ao RANKL com alta especificidade, eliminando sua disponibilidade para se ligar ao receptor RANK e, assim, impede a diferenciação e ativação de osteoclastos (LERNER, 2005).

O NF- κ B é um fator de transcrição pleiotrópico que atua na expressão de vários genes responsáveis pela maturação, diferenciação e ativação de osteoclastos que, por sua vez, sintetizam vários mediadores; entre eles, a fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP) que possui papel fundamental no processo de síntese e processamento de colágeno tipo I, importante componente da matriz óssea, assim, a TRAP tem sido utilizada como marcador histoquímico da atividade osteoclástica (SOYSA; ALLES, 2009; HAYMAN, 2008; HABERMANN et al., 2007).

Da família das fosfatases ácidas, a TRAP é uma enzima intracelular que se localiza dentro do compartimento lisossomal de osteoclastos, macrófagos e células dendríticas. A enzima possui importante participação em processos biológicos, como no desenvolvimento esquelético, pois, apresenta efeito negativo sobre a atividade osteoblástica e é essencial para atividade de reabsorção feita pelos osteoclastos. A enzima TRAP também tem efeito na mineralização do tecido ósseo por degradar osteopontina, além disso, é reconhecida como uma molécula de ocorrência generalizada com funções tanto no esqueleto, como no sistema imunitário (BASTOS et al., 2013; ELIAS et al., 2006; FERNANDES et al., 2014; HAYMAN, 2008).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar através de análises bioquímicas, radiográficas, histomorfométricas e imunoistoquímicas, os efeitos sistêmicos e locais da doxiciclina (DOX) e do Laser de baixa intensidade (LBI) como adjuvantes à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, seguindo as normas vigentes adotadas pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA).

4.1 AMOSTRA

O planejamento estatístico para a determinação do número de animais utilizados nesta pesquisa foi baseado nas recomendações de Eng (2003), conforme a seguinte fórmula: $n=1+[2*10,51*(0,2/0,172)^2]$, obtendo-se um número de 30 animais por grupo experimental com um poder de estudo de 90%. Desta forma a amostra foi composta por 150 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 200 a 250g, com 2 a 3 meses de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Eles foram mantidos em condições padronizadas com água e ração ad libitum, temperatura ambiente e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas e obedecendo aos critérios de acordo com as normas estabelecidas pela comissão de ética no uso animal (CEUA), da Unifal-MG, número 57/2017 do parecer consubstanciado (Anexo A).

4.2 INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL

A Doença Periodontal foi experimentalmente induzida realizando-se previamente a anestesia dos animais através de injeção intramuscular, associando 75 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira) a 6 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira). Com o auxílio de uma pinça modificada, adaptou-se um fio de algodão número 10 (Corrente Algodão nº 10; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, mantidos em posição por meio de nós cirúrgicos (JOHNSON, 1975) (Figuras de 1 a 4).



Figura 1 - Animal posicionado na mesa operatória.

Fonte: Do autor.



Figura 2 - Pinça modificada utilizada para a passagem do fio.

Fonte: Do autor.



Figura 3 - Posicionamento do fio.

Fonte: Do autor.



Figura 4 - Fio posicionado.

Fonte: Do autor.

4.3 TRATAMENTOS LOCAIS E DIVISÃO DOS GRUPOS

Decorridos 7 dias da indução e evolução da DP, a ligadura foi removida dos animais (Figura 5) e estes foram divididos em cinco grupos de acordo com os tratamentos locais: grupo Controle (C) – Os animais não foram submetidos a nenhum tratamento, grupo RAR – Os animais foram submetidos apenas à RAR, grupo DOX- os animais foram submetidos à RAR e aplicação de doxiciclina (DOX), grupo LBI– Os animais foram submetidos à RAR e irradiação com Laser de baixa intensidade (LBI), e por fim, grupo DOX+LBI– Os animais foram submetidos à RAR, irrigação com DOX e irradiação com o LBI (Figura 6).



Figura 5 - Doença periodontal após 7 dias de indução.

Fonte: Do autor.



Figura 6 - Raspagem e alisamento radicular.

Fonte: Do autor.

Os procedimentos de RAR foram realizados utilizando-se Cureta de Gracey Mini - Five 5 e 6 (Hu-Friedy MFG. Corporation. Inc. Chicago, USA) com três movimentos no sentido mesio-distal tanto na face vestibular quanto na face lingual. O gel de DOX a 10% foi manipulado com os seguintes componentes: cloridrato de doxiciclina, água destilada, gel metocel e trietanolamina. Para o tratamento da DOX foi realizada irrigação com 1 ml de DOX com o auxílio de seringa para insulina, a ponta da agulha foi direcionada no interior da bolsa periodontal. No grupo DOX+LBI, 1 minuto após a permanência da droga no tecido, foi utilizado o tratamento com laser de baixa intensidade (LBI) (Figuras de 7 a 10).



Figura 7 - Seringas hipodérmicas para aplicação local da DOX.

Fonte: Do autor.



Figura 8 - Aplicação do gel de DOX após RAR.

Fonte: Do autor.

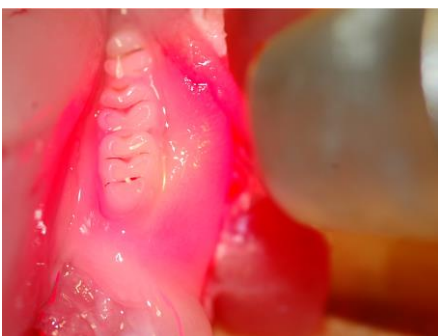


Figura 9 - Irradiação com o LBI.

Fonte: Do autor.

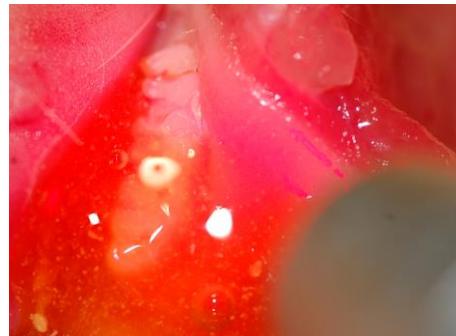


Figura 10 - Aplicação da DOX e irradiação com o LBI.

Fonte: Do autor.

O LBI utilizado apresentou as seguintes características: laser de diodo InGaAlP- Twin Flex® (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) operando no comprimento de onda de 660nm, luz vermelha (visível), área de feixe de 0,04 cm², potência de 40mW, densidade de potência de 1W/cm². A irradiação do laser foi realizada com a ponteira direcionada para o interior da bolsa periodontal em 3 pontos equidistantes na superfície vestibular (mesial, média e distal) e 3 pontos equidistantes na superfície lingual (mesial, média e distal), cada ponto foi irradiado por 4 segundos.

4.4 PERÍODOS EXPERIMENTAIS

Trinta (30) animais de cada grupo experimental foram eutanasiados por meio de superdosagem anestésica aos 7, 15 e 30 dias pós tratamentos locais para realização das análises bioquímicas, radiográficas, histomorfométricas e imunoistoquímicas (Figura 11).

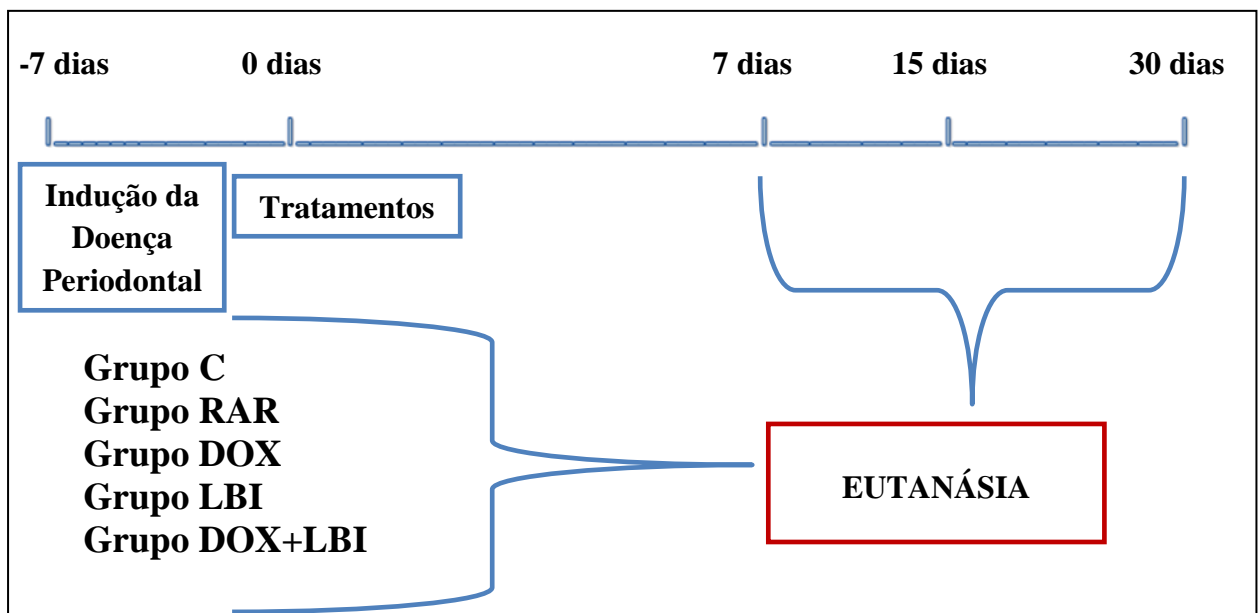


Figura 11 - Delineamento do estudo e períodos experimentais.

Fonte: Do autor.

4.5 COLETA DE SANGUE E PREPARO DAS AMOSTRAS

Momentos antes do sacrifício os animais foram anestesiados, via intramuscular, associando 75 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira) a 6 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira). Em sequência, foram feitas incisões na cavidade torácica para visualização do coração e coletados cerca de 10 ml de sangue, por animal, através de punção cardíaca no ventrículo esquerdo. Imediatamente o sangue foi depositado em tubos heparinizados identificados de acordo com cada grupo experimental, e centrifugados por 15 minutos a 2000 rpm para separação do plasma sanguíneo que foram armazenados a -70°C para as análises bioquímicas.

Logo após, os animais foram eutanasiados através de superdosagem anestésica, e posteriormente, as mandíbulas foram removidas, seccionadas ao meio, e as do lado esquerdo, onde a doença periodontal foi induzida, foram submetidas às análises radiográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica.

4.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PLASMA

Para as análises bioquímicas foram avaliadas as concentrações plasmáticas das proteínas, Alfa-1-glicoproteína ácida, Complemento 3 e 4 (C3 e C4) através da técnica de espectrofotometria.

A Alfa-1-glicoproteína ácida foi determinada através de reação de imunoturbidimetria com o reagente Alfa-1-glicoproteína ácida Plus Biotécnica, a determinação está baseada em um método imunoturbidimétrico em que anticorpos anti-alfa-1 glicoproteína ácida, formam com a alfa-1 glicoproteína ácida, um complexo insolúvel dando uma turbidez cuja intensidade é proporcional à concentração de alfa-1 glicoproteína ácida da amostra, determinada em espectrofotômetro a 340 nm. Inicialmente, para construção da curva de calibração, foi utilizada uma solução salina para realizar series de diluições, na primeira diluição foi utilizado unicamente 100 microlitros de NaCl 9g/l, na segunda diluição foi utilizado 10 microlitros de multicalibrador e 90 microlitros de NaCl 9g/l, na terceira diluição foi utilizado 25 microlitros de multicalibrador e 75 microlitros de NaCl 9g/l, na quarta diluição foi utilizado 50 microlitros

de multicalibrador e 50 microlitros de NaCl 9g/l, na quinta diluição foi utilizado 75 microlitros de multicalibrador e 25 microlitros de NaCl 9g/l, na sexta diluição foi utilizado unicamente 100 microlitros de multicalibrador. As diluições foram preaquecidas por 4 minutos a 37°C, o equipamento espectrofotômetro foi zerado com água purificada, as diluições foram pipetadas na cubeta e medidas no espectrofotômetro em triplicata para obtenção de suas absorbâncias. Por fim foi montada uma curva de calibração, através das absorbâncias obtidas por cada diluição.

Em seguida, foram pipetados 7 microlitros de amostra em 1 ml de reagente (R1) que foram homogeneizados e preaquecidos a 37° por 4 minutos, posteriormente mediu-se a absorbância no espectrofotômetro, essa etapa foi realizada em triplicata ou quadruplicata para cada grupo experimental.

A concentração (mg/dl) de Alfa-1glicoproteína ácida de cada amostra foi calculada utilizando a equação da reta obtida na etapa de calibração, através das absorbâncias de cada grupo experimental obtidas no espectrofotômetro.

As concentrações de C3 e C4 (mg/dl) foram obtidas utilizando a mesma metodologia, porém com as seguintes modificações nos parâmetros de reação, para C3 Plus biotécnica, foi utilizado 2,5 microlitros de amostra em 250 microlitros de R1, incubados a 37° por 2 minutos, e para C4 Plus biotécnica, foi utilizado 5 microlitros de amostra em 200 microlitros de R1, incubados a 37° por 2 minutos.

4.7 TOMADA RADIOGRÁFICA E ANÁLISE DIGITAL

Sobre uma mesa, as hemimandíbulas esquerdas foram posicionadas com as superfícies vestibulares voltadas para a película radiográfica (Dental IntraoralE-SpeedFilm - Kodak).

A padronização das tomadas radiográficas foi obtida da seguinte forma:

- a) uso de um aparelho de raios X Pampas - E (General Electric, Milwaukee, EUA), com regime elétrico de 65 kvp, 10 mA;
- b) feixe central de raios-X incidindo perpendicular ao plano do filme-objeto, em um ângulo de 90° com a superfície da placa óptica;
- c) distância focal de 30 cm;

d) tempo de exposição 0,3 segundos;

As radiografias foram reveladas utilizando soluções de revelador e fixador Kodak, pelo método de revelação clima – tempo.

As radiografias foram escaneadas e as imagens foram analisadas no programa Imagelab (Softium, Brasil) com o uso da ferramenta distância e ângulo de mensuração. Com este recurso, mediu-se a distância da união cimento-esmalte à crista óssea alveolar na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos pelo traçado de uma linha, sendo essas medidas registradas em milímetros (mm). O mouse era posicionado na região correspondente a união cimento-esmalte. O botão esquerdo era acionado e arrastado até ao nível da crista óssea alveolar e o programa mensurava a distância automaticamente.

4.8 PROCESSAMENTO LABORATORIAL E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Os espécimes foram demineralizados em uma solução de ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%, em partes iguais. Após esta etapa, as peças foram incluídas em parafina. Os cortes foram realizados de forma semi-seriados no sentido mésio-distal, com 4 µm de espessura, e foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Foram analisadas as características do tecido ósseo e do ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos (ALMEIDA et al., 2008; FERNANDES et al., 2009).

4.8.1 Análise histológica

Para análise histológica foi realizada uma análise descritiva dos fenômenos histopatológicos em um aumento de 20X. Esta análise abrangeu a incidência e a descrição topográfica detalhada dos fenômenos histopatológicos ocorridos no processo de reparo na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, caracterizando cada variável após a seleção das lâminas mais representativas de cada grupo e período experimentais.

Para a análise quantitativa foram utilizados escores onde o aspecto morfológico que lembra a normalidade foi atribuído o escore 1 e à escala crescente das alterações patológicas presentes, foram considerados escores de 2 a 4, referindo-se os maiores valores sempre aos problemas patológicos mais graves (WOLFSON; SELTZER, 1975).

4.8.2 Análise histométrica

O nível ósseo interradicular foi mensurado através de mm^2 identificando a perda óssea (PO) na região de furca utilizando um sistema de análise de imagem (Imagelab 2000 - Software Diracon Bio Informática LTDA - Vargem Grande do Sul, S.P., Brasil). Após exclusão, da primeira e da última secção na qual a região de furca foi evidente, cinco secções equidistantes de cada dente foram selecionadas para análise histométrica (CÉSAR-NETO et al., 2006). A PO foi avaliada medindo a extensão da área entre a crista óssea e a superfície do cimento do teto da furca em um aumento de 5X.

A seleção das secções histológicas foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento realizado. Outro examinador cego ao tratamento e calibrado, realizou a análise histométrica. A PO de cada espécime foi avaliada três vezes pelo mesmo examinador e em dias diferentes (ALMEIDA et al., 2008). As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa). Os valores médios foram averiguados e comparados estatisticamente.

4.9 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas OPG, RANKL e TRAP no processo de reparo ósseo na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos.

Para as reações imunoistoquímicas, as lâminas foram submetidas a imunoperoxidase indireta empregando os anticorpos primários policlonais para OPG (Goat anti-opg – Santa Cruz Biotechnology, USA) (concentração de 1:100, SC 8468, Lot#H2208), RANKL (Goatanti-rankl

– Santa Cruz Biotechnology, USA) (concentração de 1:200, SC 7628, Lot#20908) e TRAP (Goat anti-trap – Santa Cruz Biotechnology, USA) (concentração de 1:100, SC 30833, Lot#B1805). Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato de sódio, pH 7.4, 0.1M, acrescido de albumina de soro bovino (3%, Sigma, CA, USA) e soro normal de burro na incubação para OPG (1:50, Jackson Immunoresearch Inc., CA, USA).

Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções decrescentes de álcoois e lavados em sucessivos banhos de PBS. Estes cortes histológicos foram tratados para bloqueio da peroxidase endógena empregando peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos e lavados com PBS. Em prosseguimento incubados com um dos anticorpos primários mencionados acima a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas e lavados com PBS. Uma segunda incubação foi realizada através do uso de anticorpo secundário biotilado universal (anti-camundongo, anti-cabra e anti-coelho, K 0690, Lot 10025449, DAKO – Carpinteria, CA, USA.) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavagens com PBS. Uma terceira incubação foi realizada com uma solução contendo estreptavidina conjugada com peroxidase (K 0690, Lot 10025449, DAKO – Carpinteria, CA, USA.) a temperatura ambiente, durante 1 hora. A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada com tampão de revelação (DAB-Substrato, K 3468, Lot 1002290 – DAKO – Carpinteria, CA, USA.) e diaminobenzidina (DAB- Cromógeno K 3468, Lot 1002290 – DAKO - Carpinteria, CA, USA.) entre 10 a 60 segundos, em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes histológicos foram lavados várias vezes em PBS e submetidos a coloração pela hematoxilina. Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão dos anticorpos primários. As marcações imunoistoquímicas foram analisadas qualitativamente no tecido ósseo e no ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares inferiores com doença periodontal experimental induzida, através de microscopia de campo claro (KHOJASTEH et al., 2008).

Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão dos anticorpos primários. As imunomarcações localizadas na margem do tecido ósseo mais coronal na região de furca dos primeiros molares inferiores com doença periodontal foram contadas em um aumento de 40X, através de microscopia de campo claro (JIN et al., 2007, KHOJASTEH et al., 2008). Foram consideradas células TRAP positivas osteoclastos maduros contendo três núcleos (HASSUMI et al., 2009).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados bioquímicos, radiográficos, histomorfométricos e imunoistoquímicos obtidos foram realizados pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress. Indústria Brasileira, Manaus, A.M, Brasil). A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados nos grupos e períodos nos dentes com periodontite induzida foi testada. Após análise da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, a análise entre grupos e períodos foram realizadas pela análise de variância a dois critérios ANOVA com complementação de Bonferroni com $p < 0,01$. Além disso o teste de correlação de Pearson foi realizado entre os dados bioquímicos, radiográficos, histomorfométricos e imunoistoquímicos com $p < 0,01$.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS BIOQUÍMICOS

Os dados bioquímicos resultaram em uma distribuição normal (dados paramétricos) sendo a análise estatística feita pelo teste ANOVA com complementação de Bonferroni, com $p < 0,01$. Na análise entre os grupos, observou-se uma concentração de Alfa-1-glicoproteína ácida significativamente menor no grupo DOX+LBI comparado a todos os outros grupos em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$). Além disso, observou-se uma concentração de Alfa-1-glicoproteína ácida significativamente menor no grupo LBI comparado aos grupos C, RAR e DOX aos 15 e 30 dias ($p < 0,01$).

Na análise entre os períodos, observou-se no grupo DOX+LBI, que a concentração de Alfa-1-glicoproteína ácida foi diminuindo de forma significativa entre os períodos de 7, 15 e 30 dias e no grupo LBI entre o período de 7 com os de 15 e 30 dias ($p < 0,01$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão ($M \pm SD$) das concentrações (mg/dl) de alfa-1-glicoproteína ácida de acordo com cada grupo/período

Grupos/Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
C	208,29±23,69 ^{Aa}	190,79±51,00 ^{Aa}	189,49±53,36 ^{Aa}
RAR	196,16±3,06 ^{Aa}	163,26±12,36 ^{Aa}	144,03±18,76 ^{Aa}
DOX	146,81±21,53 ^{Aa}	132,82±17,66 ^{Aa}	99,03±14,82 ^{Aa}
LBI	124,95±12,36 ^{Aa}	47,27±20,21 ^{Bb}	25,42±11,16 ^{Bb}
DOX+LBI	43,01±14,89 ^{Ca}	18,94±15,17 ^{Cb}	0,83±1,76 ^{Cc}
N	50	50	50

Letras maiúsculas diferentes nas colunas, indicam diferença entre os grupos no mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0,01$).

Letras minúsculas diferentes nas linhas, indicam diferença entre os períodos no mesmo grupo (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0,01$).

Fonte: Do autor.

Na análise entre os grupos, observou-se uma concentração de proteína C3 significativamente menor no grupo DOX+LBI comparado aos outros grupos em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$). Além disso, observou-se uma concentração de proteína C3

significativamente menor no grupo LBI comparado ao grupo C em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$). Na análise entre os períodos, observou-se no grupo DOX+LBI, que a concentração de proteína C3 foi diminuindo de forma significativa entre os períodos de 7, 15 e 30 dias ($p < 0,01$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Média e desvio padrão ($M \pm SD$) das concentrações (mg/dl) de proteína C3 de acordo com cada grupo/período

Grupos/Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
C	377,05±24,46 ^{Aa}	337,87±43,61 ^{Aa}	319,50±36,71 ^{Aa}
RAR	288,52±28,21 ^{Aa}	238,41±38,49 ^{ABa}	173,41±40,03 ^{ABa}
DOX	259,03±22,24 ^{Aa}	227,43±40,01 ^{ABa}	153,96±23,93 ^{ABa}
LBI	119,17±22,77 ^{Ba}	121,20±22,09 ^{Ba}	90,15±44,68 ^{Ba}
DOX+LBI	68,01±26,38 ^{Ca}	31,57±24,04 ^{Cb}	0,33±10,44 ^{Cc}
N	50	50	50

Letras maiúsculas diferentes nas colunas, indicam diferença entre os grupos no mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0,01$).

Letras minúsculas diferentes nas linhas, indicam diferença entre os períodos no mesmo grupo (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0,01$).

Fonte: Do autor.

Na análise entre os grupos, observou-se uma concentração de proteína C4 significativamente menor no grupo DOX+LBI comparado aos outros grupos nos períodos de 15 e 30 dias ($p < 0,01$). Além disso, observou-se uma concentração de proteína C4 significativamente menor nos grupos DOX e LBI comparado ao grupo C em todos os períodos experimentais e ao grupo RAR nos períodos de 15 e 30 dias ($p < 0,01$).

Na análise entre os períodos, observou-se no grupo DOX+LBI, que a concentração de proteína C4 foi diminuindo de forma significativa entre os períodos de 7, 15 e 30 dias ($p < 0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Média e desvio padrão ($M \pm SD$) das concentrações (mg/dl) de proteína C4 de acordo com cada grupo/período

Grupos/Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
C	84,36±0,56 ^{Aa}	76,80±7,91 ^{Aa}	77,80±5,85 ^{Aa}
RAR	35,84±10,16 ^{Ba}	45,68±18,11 ^{Aa}	61,14±10,74 ^{Aa}
DOX	36,80±3,27 ^{Ba}	18,17±6,67 ^{Ba}	21,47±0,66 ^{Ba}

(continua)

Tabela 3 - Média e desvio padrão (M±SD) das concentrações (mg/dl) de proteína C4 de acordo com cada grupo/período

Grupos/Períodos	(conclusão)		
	7 dias	15 dias	30 dias
LBI	28,80±3,21 ^{Ba}	12,92±7,66 ^{Ba}	15,47±4,33 ^{Ba}
DOX+LBI	27,44 ±3,86 ^{Ba}	5,05±41,81 ^{Cb}	0,38±1,50 ^{Cc}
N	50	50	50

Letras maiúsculas diferentes nas colunas, indicam diferença entre os grupos no mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com $p<0.01$).

Letras minúsculas diferentes nas linhas, indicam diferença entre os períodos no mesmo grupo (ANOVA e Bonferroni, com $p<0.01$).

Fonte: Do autor.

5.2 RESULTADOS RADIOGRÁFICOS

A normalidade dos dados radiográficos foi testada no programa Bioestat 5.0 utilizando o teste Shapiro-Wilk. Os dados resultaram em uma distribuição normal (dados paramétricos) sendo a análise estatística feita pelo teste ANOVA com complementação de Bonferroni, com $p<0,01$. Na análise entre os grupos, observou-se uma perda óssea significativamente menor nos grupos DOX, LBI e DOX+LBI comparado aos grupos C e RAR em todos os períodos experimentais ($p<0,01$).

Na análise entre os períodos, pode-se observar no grupo C, uma menor perda óssea aos 30 dias comparado com o período de 7 dias ($p<0,01$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio padrão (M±SD) das distâncias entre a união cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (mm) na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo e período

Grupos/Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
C	1,89±0,16 ^{Aa}	1,79±0,10 ^{Aa}	1,52±0,08 ^{Ab}
RAR	1,43±0,26 ^{Aa}	1,40±0,13 ^{Aa}	1,37±0,04 ^{Aa}
DOX	0,59±0,20 ^{Ba}	0,56±0,11 ^{Ba}	0,52±0,10 ^{Ba}
LBI	0,53±0,21 ^{Ba}	0,50±0,04 ^{Ba}	0,49±0,13 ^{Ba}
DOX+LBI	0,44±0,06 ^{Ba}	0,42±0,14 ^{Ba}	0,41±0,01 ^{Ba}
N	50	50	50

Letras maiúsculas diferentes nas colunas, indicam diferença entre os grupos no mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com $p<0.01$).

Letras minúsculas diferentes nas linhas, indicam diferença entre os períodos no mesmo grupo (ANOVA e Bonferroni, com $p<0.01$).

Fonte: Do autor.

5.3 RESULTADOS HISTOLÓGICOS (Figuras de 12 a 26)

Os animais do grupo C, em todos os períodos experimentais, apresentaram um tecido conjuntivo desorganizado, com elevado número de neutrófilos e discreto número de fibroblastos. O tecido ósseo apresentou áreas de necrose e trabéculas ósseas finas.

Nos animais dos grupos RAR e DOX, o tecido conjuntivo apresentou-se mais organizado, com um processo inflamatório predominantemente crônico e moderado número de fibroblastos. O tecido ósseo não apresentou áreas de necrose e as trabéculas ósseas tinham uma espessura fina.

Os animais dos grupos LBI e DOX+LBI, nos períodos de 7 e 15 dias, apresentaram o tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos, discreto infiltrado inflamatório crônico e tecido ósseo moderadamente desenvolvido.

Aos 30 dias, os animais apresentaram um ligamento periodontal íntegro, organizado e com fibras colágenas paralelas entre si. O tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido, íntegro e com ausência de infiltrado inflamatório.

5.4 RESULTADOS HISTOMÉTRICOS (Figuras de 12 a 26)

Os dados histométricos resultaram em uma distribuição normal (dados paramétricos) sendo a análise estatística feita pelo teste ANOVA com complementação de Bonferroni, com $p < 0,01$. Na análise entre os grupos, observou-se uma perda óssea significativamente menor no grupo DOX+LBI comparado aos grupos C, RAR e DOX em todos os períodos experimentais.

Além disso, observou-se uma perda óssea significativamente menor no grupo LBI comparado ao grupo C em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$).

Na análise entre os períodos, pode-se observar no grupo DOX+LBI, uma menor perda óssea aos 30 dias comparado com o período de 7 dias ($p < 0,01$) (Tabela 5).

Tabela 5: Média e desvio padrão (M±SD) dos dados histométricos da perda óssea alveolar (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, de acordo com cada grupo e período

Grupos/Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
C	1,31±0,03 ^{Aa}	1,12±0,08 ^{Aa}	0,89±0,11 ^{Aa}
RAR	0,96±0,13 ^{ABa}	0,83±0,15 ^{ABa}	0,76±0,10 ^{ABa}
DOX	0,81±0,06 ^{ABa}	0,76±0,05 ^{ABa}	0,69±0,44 ^{ABa}
LBI	0,74±0,03 ^{Ba}	0,69±0,03 ^{Ba}	0,52±0,17 ^{Ba}
DOX+LBI	0,36±0,25 ^{Ca}	0,27±0,13 ^{Cab}	0,16±0,31 ^{Cb}
N	50	50	50

Letras maiúsculas diferentes nas colunas, indicam diferença entre os grupos no mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com $p<0.01$).

Letras minúsculas diferentes nas linhas, indicam diferença entre os períodos no mesmo grupo (ANOVA e Bonferroni, com $p<0.01$).

Fonte: Do autor.

5.5 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS (Figuras de 12 a 26)

As análises imunoistoquímicas dos padrões de marcações antigênicas da OPG, RANKL e TRAP nos cortes histológicos revelaram uma nítida especificidade dos anticorpos empregados. As estruturas teciduais que revelaram imunorreatividades à OPG e à RANKL foram similares e restritas ao compartimento citosólico das células semelhantes a osteoblastos, fibroblastos e macrófagos mononucleados.

A imunorreatividade a TRAP ficou limitada ao compartimento citosólico de células gigantes multinucleadas (osteoclastos ou odontoclastos) ou células mononucleadas (macrófagos clásticos) associadas a superfícies ósseas e dentárias. Além disso, algumas células mononucleadas dispersas no ligamento periodontal, não associadas a superfícies mineralizadas, também exibiram imunorreatividade a TRAP. Estes perfis celulares possivelmente representam os estágios de migração dos macrófagos clásticos dos vasos sanguíneos para o tecido conjuntivo, ou mesmo, estágios de eliminação dos osteoclastos que atuaram na fase ativa da reabsorção óssea e/ou dentária.

As imunorreatividades a RANKL e a TRAP foram mais bem evidenciadas nos períodos de 7 e 15 dias, enquanto a imunorreatividade a OPG foi considerável aos 15 dias principalmente

nos animais do grupo C e RAR. Ocasionalmente, este padrão de imunorreatividade foi variável nos animais do grupo DOX e LBI, dependente da magnitude da lesão periodontal induzida.

A análise qualitativa desses marcadores entre os grupos experimentais revelou uma tendência nos animais tratados com DOX+LBI em apresentar uma menor imunorreatividade a RANKL e TRAP aos 7 dias e considerável imunorreatividade a OPG aos 15 dias pós-tratamento.

Os dados imunoistoquímicos quantitativos da contagem de células TRAP positivas resultaram em uma distribuição normal (dados paramétricos) sendo a análise estatística feita pelo teste ANOVA com complementação de Bonferroni, com $p < 0,01$. Na análise entre os grupos, observou-se um número significativamente menor de células TRAP positivas no grupo DOX+LBI comparado aos outros grupos, em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$). Além disso, observou-se um número significativamente menor de células TRAP positivas no grupo LBI comparado ao grupo C em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$).

Na análise entre os períodos, observou-se no grupo DOX+LBI, que o número de células TRAP positivas foi significativamente menor no período de 30 dias comparado ao período de 7 dias ($p < 0,01$) (Tabela 6).

Tabela 6: Média e desvio padrão ($M \pm SD$) do número de células TRAP positivas (un) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, de acordo com cada grupo e período

Grupos/Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
C	9,10 \pm 0,60 ^{Aa}	8,02 \pm 1,16 ^{Aa}	7,89 \pm 0,23 ^{Aa}
RAR	6,23 \pm 0,02 ^{ABa}	6,00 \pm 0,34 ^{ABa}	5,79 \pm 0,87 ^{ABa}
DOX	5,71 \pm 1,24 ^{ABa}	5,45 \pm 1,55 ^{ABa}	4,95 \pm 0,13 ^{ABa}
LBI	4,11 \pm 1,19 ^{Ba}	3,99 \pm 1,26 ^{Ba}	3,68 \pm 0,51 ^{Ba}
DOX+LBI	2,05 \pm 0,34 ^{Ca}	1,89 \pm 0,70 ^{Ca}	1,02 \pm 0,83 ^{Cb}
N	50	50	50

Letras maiúsculas diferentes nas colunas, indicam diferença entre os grupos no mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0,01$).

Letras minúsculas diferentes nas linhas, indicam diferença entre os períodos no mesmo grupo (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0,01$).

Fonte: Do autor.

5.6 CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS ESTUDADOS

Após os tratamentos locais, observou-se que ocorreu uma correlação positiva entre os valores sistêmicos das proteínas Alfa-1-glicoproteína ácida, C3 e C4, com os valores locais das áreas de perda óssea e número de células TRAP positivas na região de furca, dos primeiros molares inferiores esquerdos que receberam a indução da periodontite. A medida que houve uma diminuição das proteínas ocorreu também uma diminuição da área de perda óssea e do número de células TRAP positivas, com $p < 0,01$ (Tabela 7).

Tabela 7 – Correlação entre os dados sistêmicos (bioquímicos) e locais (radiográficos, histométricos e imunoistoquímicos) de acordo com cada grupo e período

Sistêmicos/Locais	Radiográficos	Histométricos	Imunoistoquímicos
Alfa-1-glicoproteína ácida	0,10	0,77 [×]	0,74 [×]
C3	0,02	0,88 [×]	0,81 [×]
C4	0,04	0,72 [×]	0,70 [×]

[×]Correlação positiva entre os dados sistêmicos (bioquímicos) e locais (radiográficos, histométricos e imunoistoquímicos) (Correlação de Pearson, com $p < 0,01$).

Fonte: Do autor.

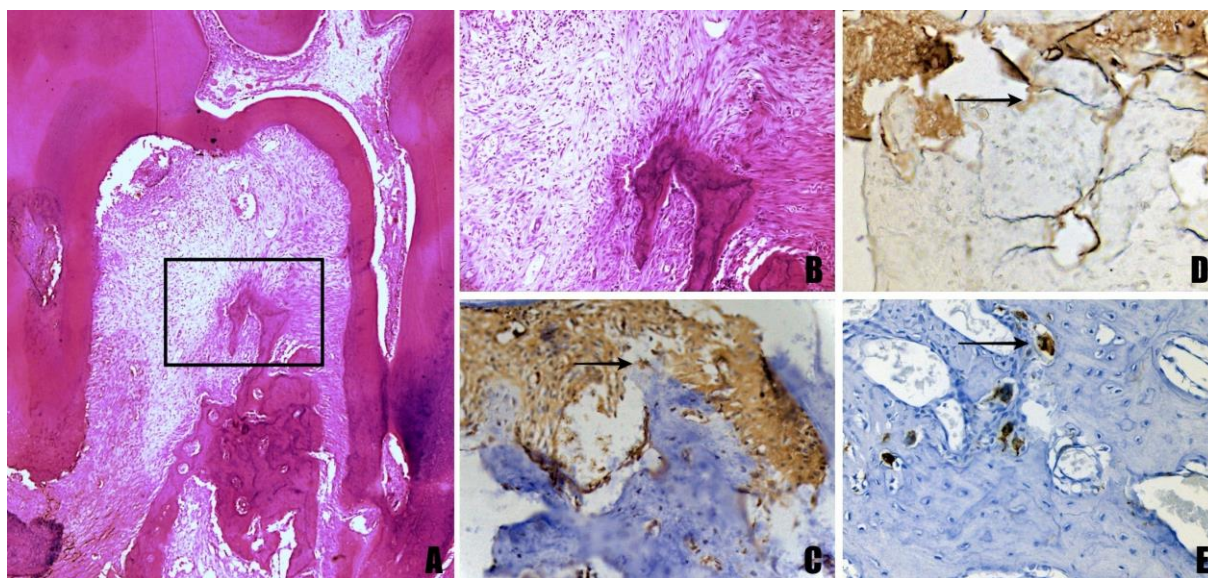


Figura 12 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo C - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.

Fonte: Do autor.

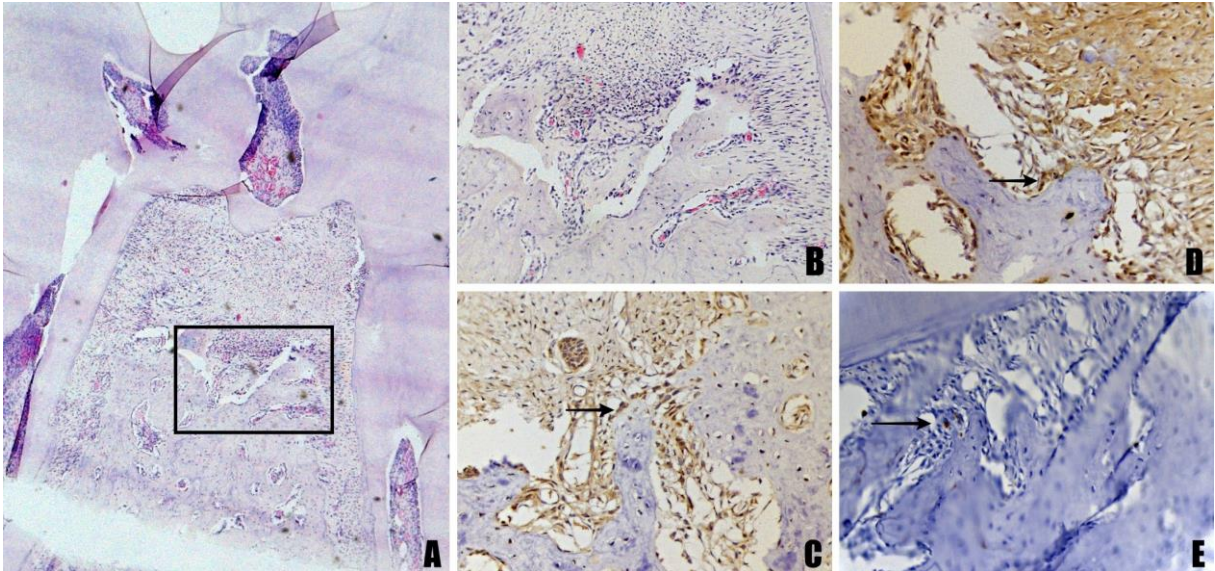


Figura 13 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo RAR - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

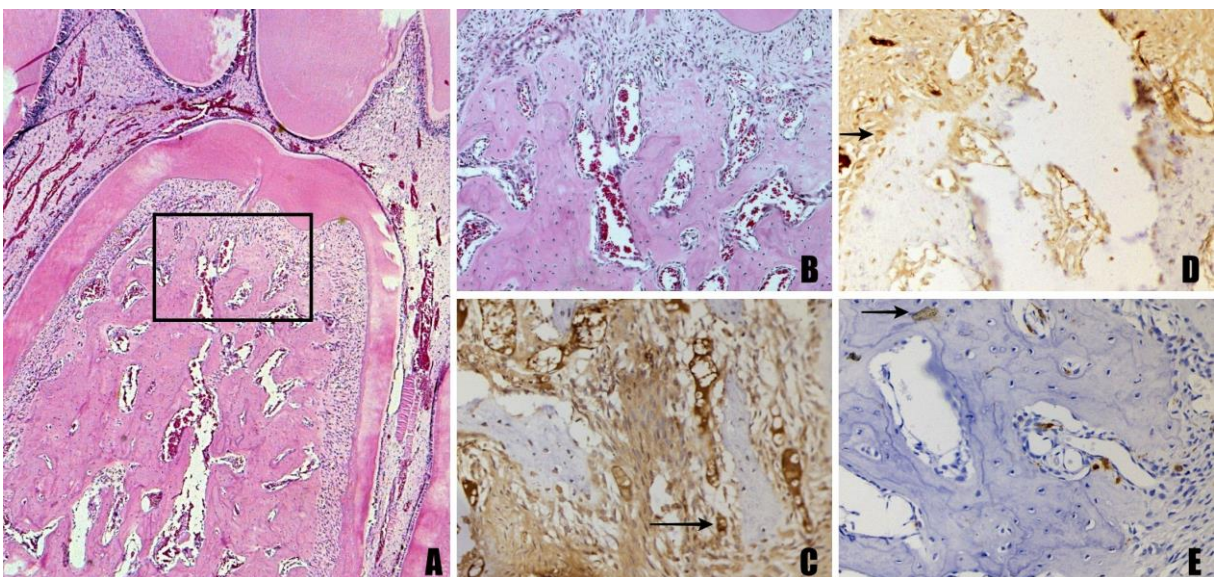


Figura 14 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

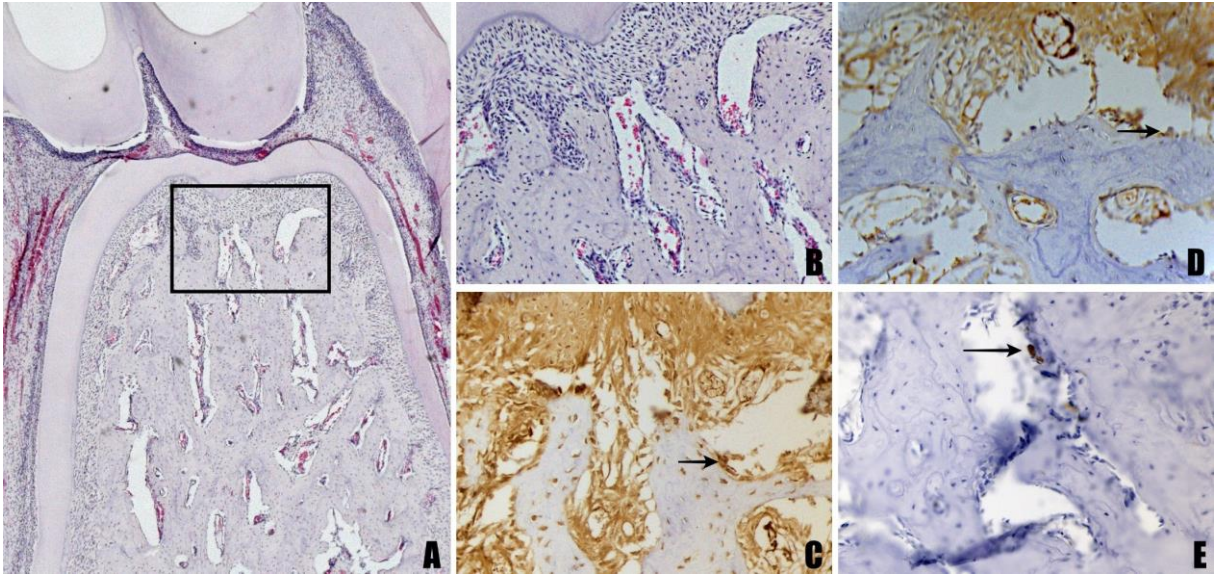


Figura 15 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo LBI - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.

Fonte: Do autor.

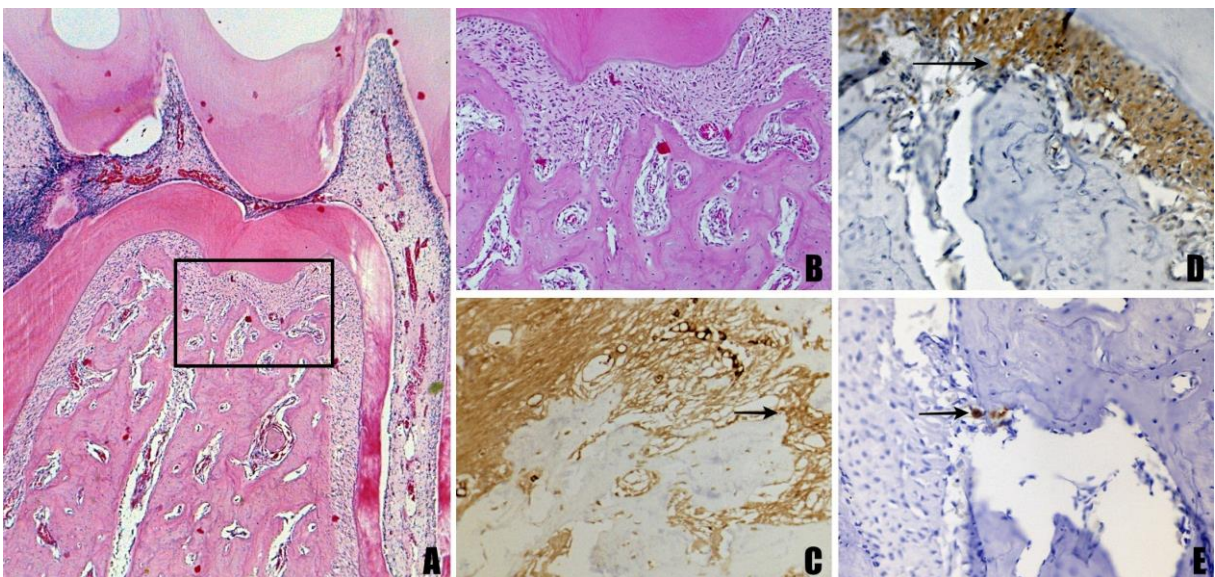


Figura 16 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX+LBI - 7 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.

Fonte: Do autor.

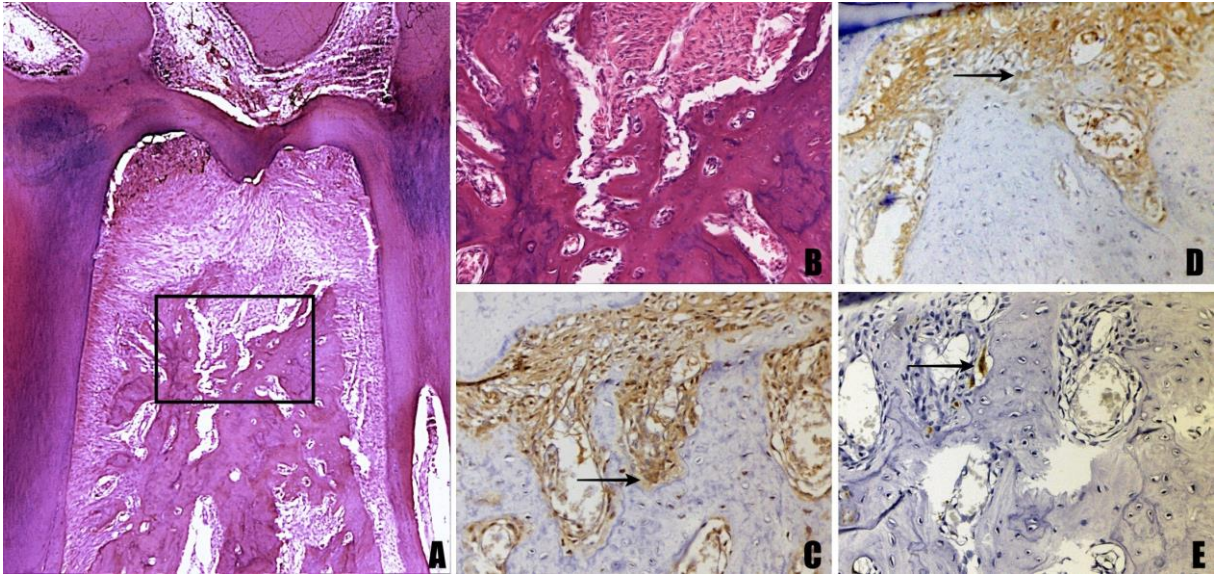


Figura 17 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo C - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

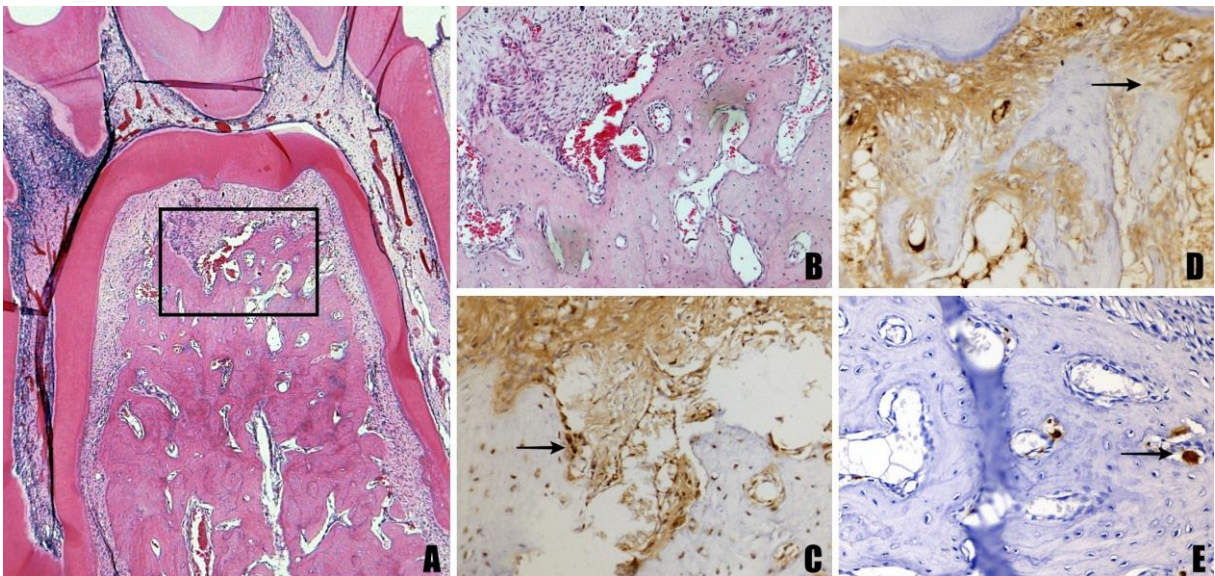


Figura 18 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo RAR - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

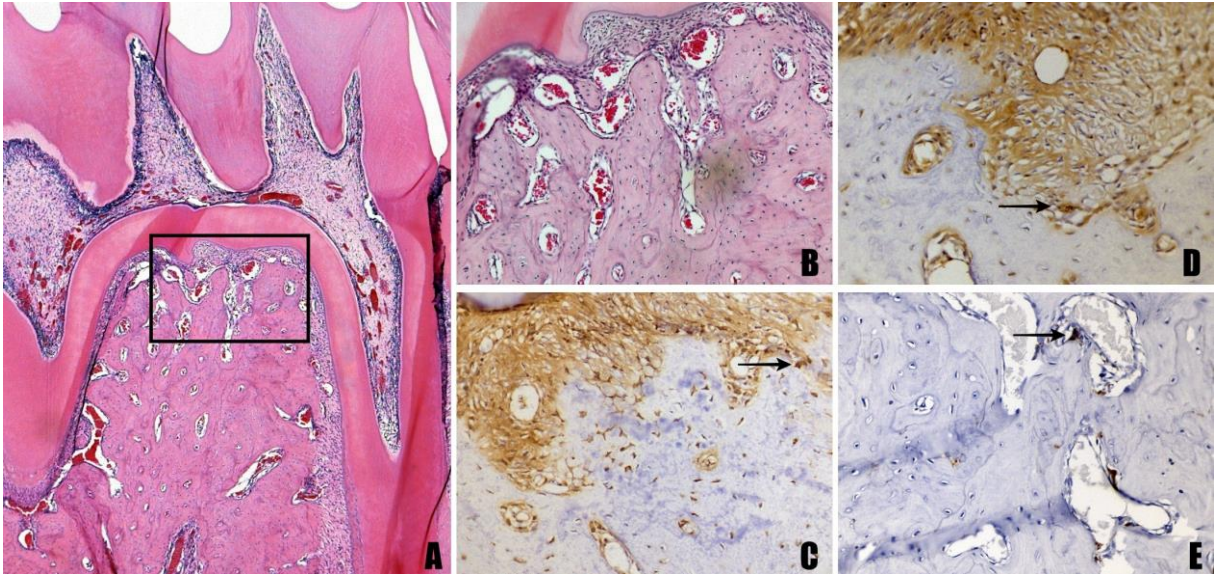


Figura 19 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

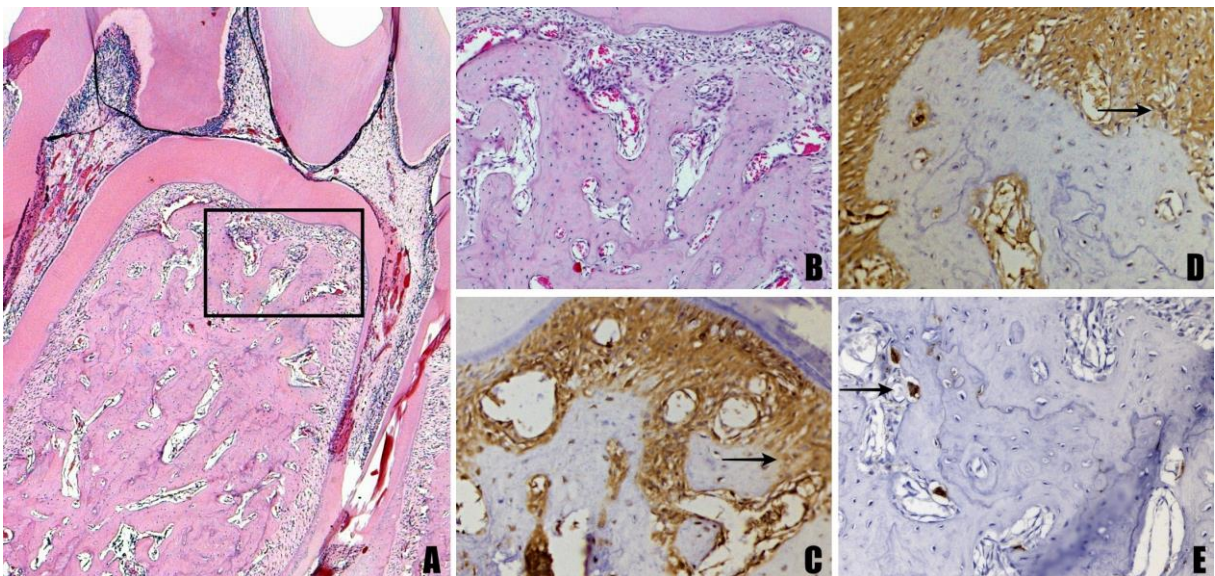


Figura 20 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo LBI - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

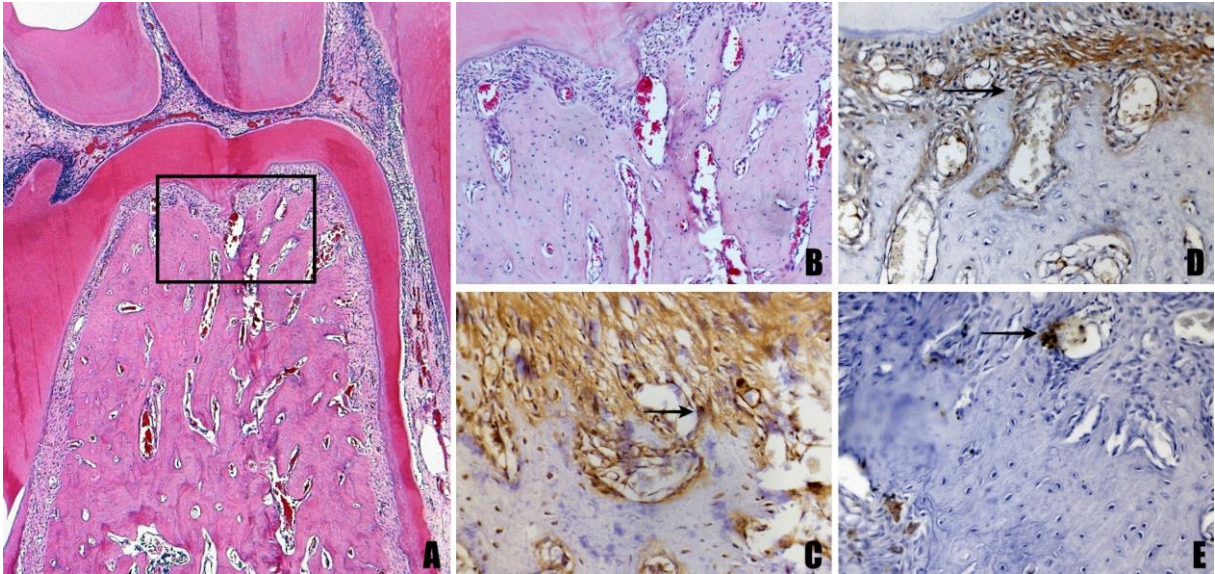


Figura 21 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX+LBI - 15 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.

Fonte: Do autor.

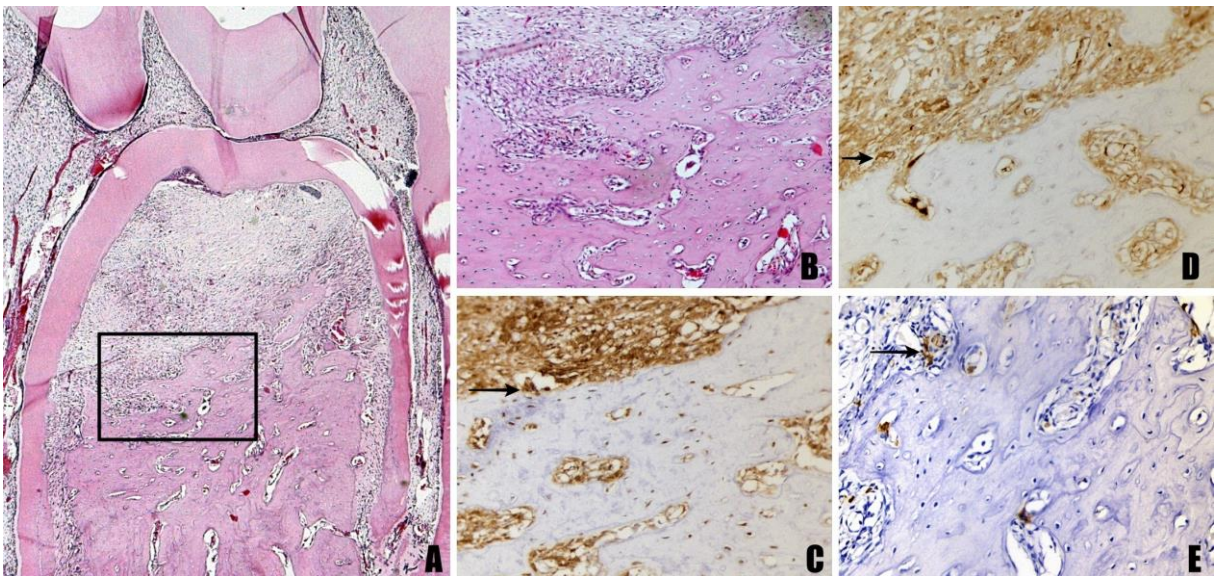


Figura 22 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo C - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.

Fonte: Do autor.

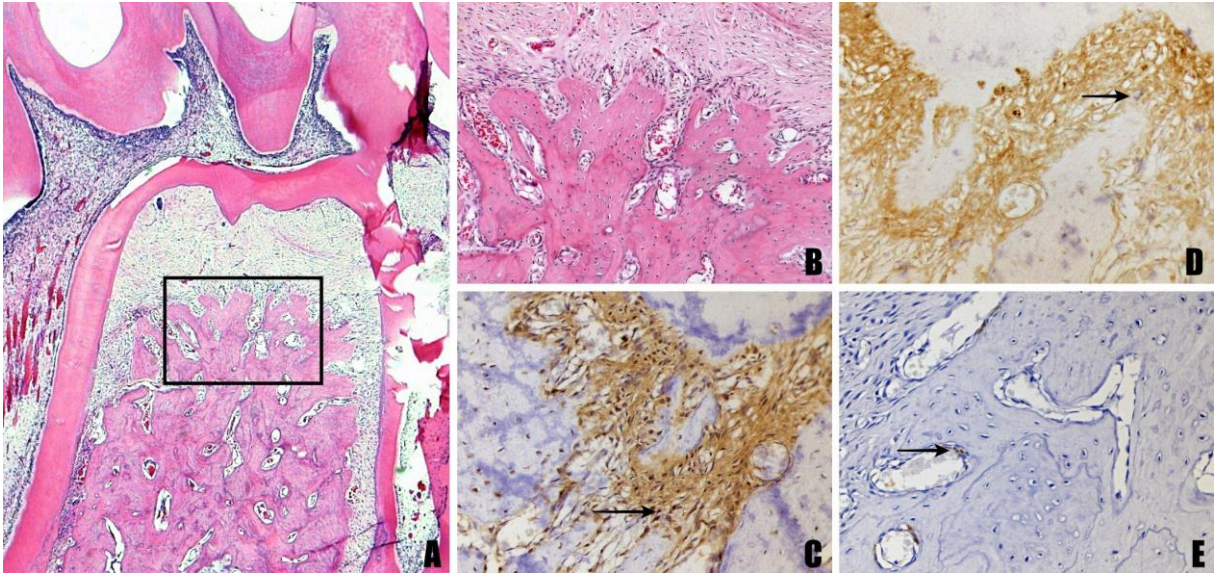


Figura 23 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo RAR - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

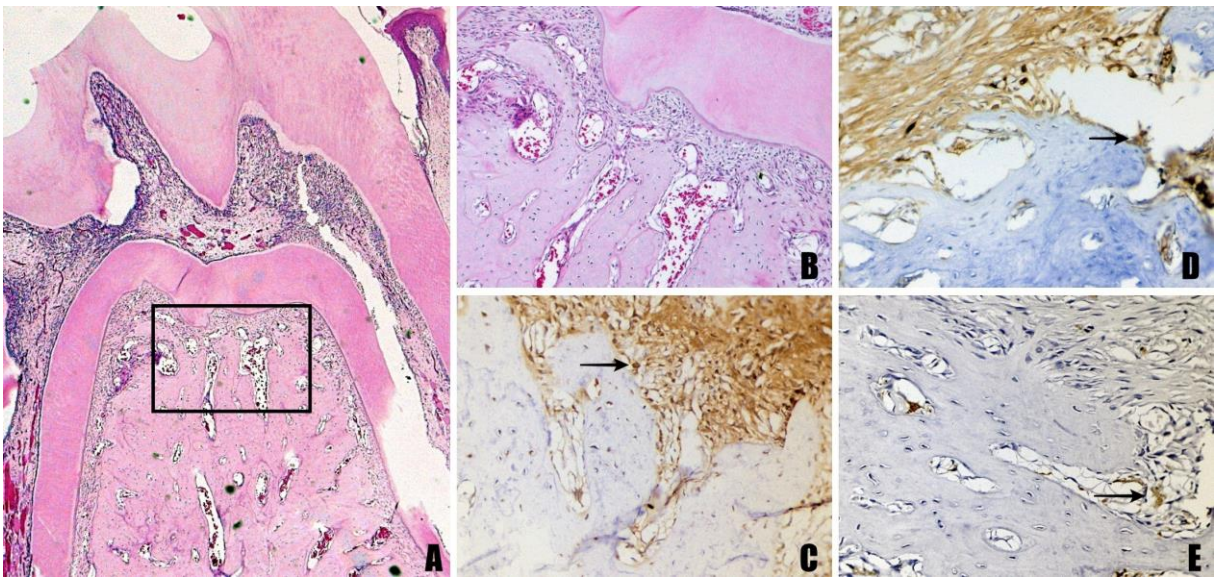


Figura 24 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.
Fonte: Do autor.

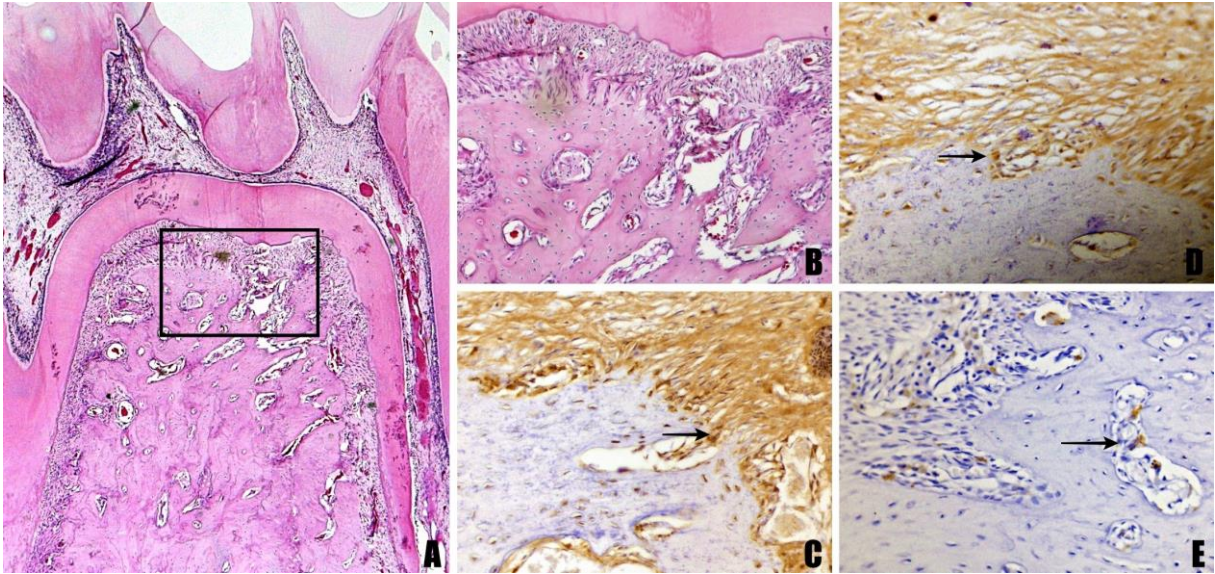


Figura 25 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo LBI - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.

Fonte: Do autor.

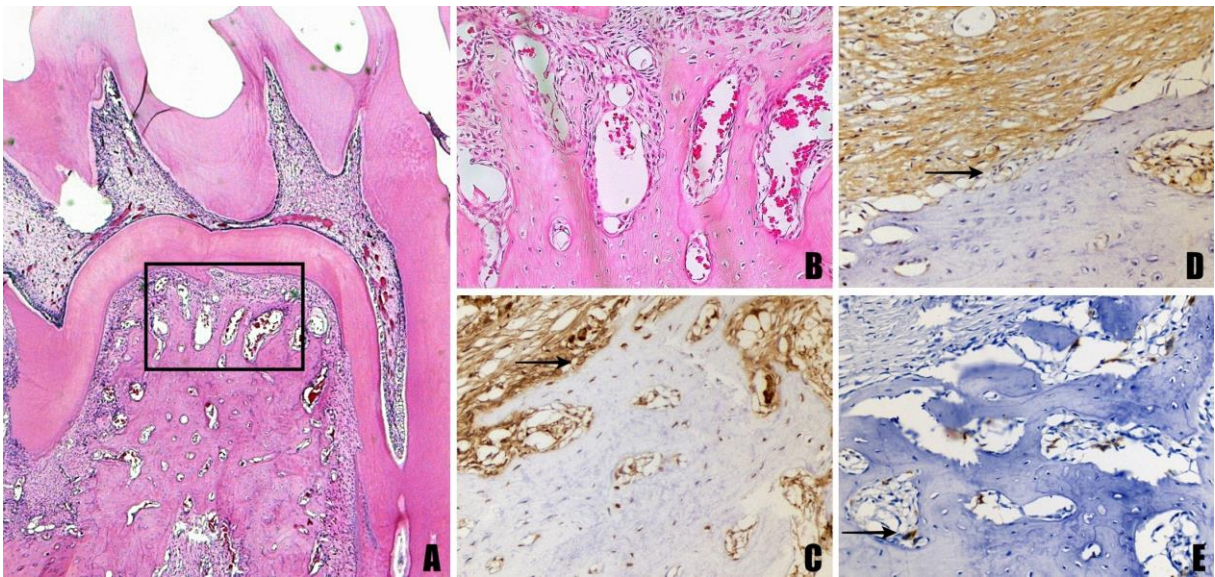


Figura 26 - Fotomicrografia ilustrando área do ligamento periodontal e perda óssea na área de furca dos dentes do lado esquerdo. Grupo DOX+LBI - 30 dias. A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 20X. C) Imunoperoxidase para RANKL (Seta). Aumento original 40X. D) Imunoperoxidase para OPG (Seta). Aumento original 40X. E) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 40X.

Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

A escolha do rato, como modelo animal experimental baseou-se nos estudos de Klausen (1991). Segundo este autor, o rato é favorável como modelo experimental para o desenvolvimento e estudo da doença periodontal pela semelhança do seu periodonto com o do homem, tendo como divergência apenas a presença da queratinização do epitélio sulcular.

O presente estudo apoiou-se no modelo de indução da doença periodontal proposto por Johnson (1975), através da colocação de um fio de algodão ao redor dos molares de ratos. Segundo o modelo proposto por Johnson, a ligadura favorece o acúmulo bacteriano desenvolvendo dessa forma, a doença periodontal. Observamos no presente estudo que este modelo foi eficiente na indução da doença periodontal experimental, pois a ligadura induziu a formação de placa bacteriana e uma resposta inflamatória local. A doença periodontal foi caracterizada pelos sinais clínicos de inflamação gengival, como edema, vermelhidão e perda da aderência do tecido gengival ao dente.

Para todos os parâmetros avaliados, o grupo RAR apresentou melhores resultados que os do grupo C, porém não de forma significativa estatisticamente. Este fato demonstra que a raspagem e alisamento radicular não foi eficaz no tratamento da doença periodontal nas áreas de furca dos primeiros molares inferiores de ratos. Clinicamente, é provado que a RAR com instrumentos manuais fornece os melhores resultados para o tratamento da doença periodontal (LINDHE et al., 1982). No entanto, diversos fatores podem limitar o sucesso da RAR tais como concavidades radiculares, apinhamento dentário, áreas profundas, zonas de bifurcação que dificultam o acesso dos instrumentos manuais na bolsa periodontal. Devidos a estes fatores anatômicos limitantes, terapias adjuvantes ao tratamento convencional têm sido propostas (ALMEIDA et al., 2008).

Uma das terapias periodontais alternativas ao tratamento periodontal não cirúrgico seria o uso de antibióticos sistêmicos, porém com algumas desvantagens e dentre elas a de causar o aparecimento de cepas bacterianas resistentes (GAD et al., 2004; KLEINFELDER et al., 1999; USACHEVA et al., 2001; WAINWRIGHT, 1998). Desta forma o uso de agentes locais como a DOX e o LBI seriam alternativas adjuvantes à raspagem e alisamento radicular para o tratamento da doença periodontal, tendo como vantagens o fato de poder atingir altas concentrações quando comparados com os antibióticos de uso sistêmico; sua aplicação

profissional independe da adesão e colaboração dos pacientes; não estão relacionados à eventos adversos relevantes, sobre tudo no trato gastrintestinal ou no aparelho geniturinário (SACHDEVA et al., 2018).

No presente estudo, o uso adjuvante da DOX com a RAR, demonstrou sistemicamente que houve uma menor concentração de proteína C4 no grupo DOX comparado ao grupo C em todos os períodos experimentais e ao grupo RAR nos períodos de 15 e 30 dias. Em relação a avaliação local através da análise radiográfica, observamos que houve uma menor perda óssea no grupo DOX comparado aos grupos C e RAR em todos os períodos experimentais. Reforçando os nossos resultados, trabalhos mostram que a DOX apresenta eficácia conhecida contra periodontopatógenos, como *aggreatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e *tannerella forsythia* (*Tf*) e eficácia clínica na modulação dos sinais clínicos da periodontite (HYUN et al., 2014; POLSON et al., 1996). Estes fatores podem ser atribuídos aos efeitos locais da DOX, como inibição de MMPs (colagenase e gelatinase) e promoção de um impacto positivo no processo de reparo ósseo, além de efeitos anti-inflamatórios, devido à sua capacidade de suprimir os leucócitos polimorfonucleares, por sua ação de limpeza ou bloqueando prostaglandina E2 (GAMAL et al., 2013; HOLMES et al., 2004, PARK, 2011, KHANDAN et al., 2015). Um outro fator importante é a forma da DOX utilizada, pois autores afirmaram que o gel de doxiciclina é capaz de manter-se no sítio subgengival por um período mínimo de dez dias, e dessa forma seu mecanismo de ação reduziu o volume do FCG e do TGF-b-1, comprovados com a melhora dos sinais clínicos da inflamação, diminuição da profundidade de sondagem e ganho clínico de inserção (KIM et al., 2004).

Na avaliação sistêmica a concentração de Alfa-1-glicoproteína ácida foi significativamente menor no grupo LBI comparado aos grupos C, RAR e DOX aos 15 e 30 dias e à C3 em todos os períodos experimentais. Localmente os resultados histológicos demonstraram que os animais do grupo LBI nos períodos de 7 e 15 dias, apresentaram o tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos, discreto infiltrado inflamatório crônico e tecido ósseo moderadamente desenvolvido. Aos 30 dias, o ligamento periodontal se apresentava íntegro, organizado e com fibras colágenas paralelas entre si. O tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido, íntegro e com ausência de infiltrado inflamatório. Além disso, uma menor perda óssea na região de furca e um menor número de células TRAP positivas foram encontradas comparado ao grupo C em todos os períodos experimentais. Uma possível explicação para estes resultados, deve-se ao fato da fonte de luz utilizada ser o laser em baixa intensidade. Autores têm mostrado que a utilização desta fonte de

luz inibe a produção de mediadores inflamatórios por células do ligamento periodontal, favorece a quimiotaxia celular, como relatado por Saito et al. (1991) e Houreld et al. 2007, promove vasodilatação e angiogênese local e desta forma poderia haver um aumento na difusão de oxigênio no tecido, 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 (AL-WATBAN et al., 1997; REENSTRA et al., 2001). É importante destacar que essa ação biomoduladora acontece em função do aumento da produção de ATP, que é gerada pela aplicação do laser de baixa potência e, conseqüentemente, do aumento da velocidade da mitose. No caso da ação anti-inflamatória, isso acontece porque a irradiação provoca o aumento da degranulação dos mastócitos, o que, por sua vez, ocasiona o aumento da quantidade de histamina, provocando alterações circulatórias locais como a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (LUI et al., 2011).

A associação da DOX e LBI demonstraram sistemicamente uma menor concentração de Alfa-1-glicoproteína ácida e C3 comparado a todos os outros grupos em todos os períodos experimentais, e para o C4 aos 15 e 30 dias. Além disso, o grupo DOX+LBI apresentou localmente, nos períodos de 7 e 15 dias, um tecido conjuntivo desenvolvido com moderado número de fibroblastos, discreto infiltrado inflamatório crônico e tecido ósseo moderadamente desenvolvido. Aos 30 dias, o ligamento periodontal estava íntegro, organizado e com fibras colágenas paralelas entre si. O tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido, íntegro e com ausência de infiltrado inflamatório. Estes resultados mostram que a raspagem e o alisamento radicular, DOX e LBI geraram efeitos positivos no tratamento da doença periodontal. A DOX por sua ação no condicionamento da dentina poderia permitir a ligação de fibrina, favorecendo a formação de uma nova fixação e promovendo também a inserção de fibroblastos à superfície radicular, resultando no aumento da produção de colágeno, do osso e da reparação periodontal (KHANDAN et al., 2015). Por outro lado, o LBI atuaria na modulação dos processos biológicos, como a aceleração do reparo tecidual, a diminuição da dor e da inflamação, e a ativação de células do sistema imune (CERDEIRA et al., 2016; ESLAMIPOUR; MOTAMEDIAN; BAGHERI, 2017; HEIDARI et al., 2017).

Na análise imunistoquímica qualitativa, os animais do grupo DOX+LBI, demonstraram uma tendência em apresentar uma menor imunorreatividade para RANK-L e TRAP aos 7 dias e considerável imunorreatividade para OPG aos 15 dias pós-tratamentos locais. Uma possível explicação para esses resultados é o fato da DOX funcionar impedindo a reabsorção óssea de forma direta, induzindo a apoptose dos osteoclastos e indireta, inibindo o receptor ativador do

fator nuclear kappa beta Ligante (RANK-L) na osteoclastogênese. Além disso, favorece a formação de tecido ósseo pela ativação dos osteoblastos (GAMAL et al., 2013; HOLMES et al., 2004, PARK, 2011, KHANDAN et al., 2015).

Na análise da perda óssea local entre os grupos, observou-se uma perda óssea significativamente menor no grupo DOX+LBI comparado aos grupos C, RAR e DOX em todos os períodos experimentais e um número significativamente menor de células TRAP positivas no grupo DOX+LBI comparado aos outros grupos, em todos os períodos experimentais. Esses resultados mostram que o tratamento no grupo DOX+LBI teve efeitos de inibição sobre o receptor RANK e seu ligante, evidenciados pela diminuição da atividade osteoclastogênica e, em consequência da não dimerização do RANK, também uma inibição para a formação de células multinucleadas TRAP positivas que são expressas principalmente em osteoclastos, o que explica a perda óssea significativamente menor nesse grupo (SUDA et al., 1999; KANEDA et al., 2000; IWAMOTO et al., 2004).

O mecanismo de reabsorção óssea tem sido caracterizado pela ação das moléculas RANK-L e OPG. O RANK-L é preferencialmente expresso em células pré-osteoblásticas e osteoblastos, enquanto seu receptor específico RANK, é expresso em osteoclastos progenitores. A ligação entre ambos permite uma dimerização da RANK, ocasionando a diferenciação e ativação dos osteoclastos o que ocasiona a formação de uma célula multinucleada TRAP positiva (IWAMOTO et al., 2004). Por outro lado, a OPG é produzida por células blásticas e é considerada um receptor para RANK-L (THÉOLEYRE et al., 2004). A ligação da OPG à RANK-L, impede e bloqueia a sua ligação com o RANK interferindo negativamente com a função de osteoclastogênese (PACIFICI, 2010). A inibição funcional de RANK-L via ligação com a OPG, reduz a destruição alveolar como relatado por Teng et al. (2000).

Os nossos resultados mostraram que as imunorreatividades para RANK-L e a TRAP foram mais bem evidenciadas nos períodos de 7 e 15 dias, enquanto que a imunorreatividade a OPG foi considerável aos 15 dias principalmente nos animais dos grupos C e RAR. Isto provavelmente ocorreu porque a RANK-L exerceu um importante papel para a diferenciação osteoclástica e agiu como fator de sobrevivência de precursores osteoclásticos e pré-reabsortivos, enquanto que a OPG atuou como um agente protetor inibindo a diferenciação clástica (LACEY et al., 1998). Estes achados estão de acordo com nossos resultados histológicos que mostram uma maior perda óssea nos períodos iniciais nos animais dos grupos C e RAR. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Theodoro et al. (2017)

e Belinello-Souza et al. (2017), que ao introduzirem um determinado tratamento para ratos com doença periodontal experimentalmente induzida por ligadura, obtiveram resultados positivos em relação aos níveis de reabsorção óssea e uma menor imunomarcagem para RANK-L e TRAP e, assim como uma imunomarcagem mais expressiva para OPG.

Atualmente tem se estudado a correlação entre a saúde bucal e a saúde geral dos pacientes. O desafio é entender os seus mecanismos biológicos e os efeitos que o tratamento periodontal pode ter na condição sistêmica dos indivíduos e como isso, poder incorporar estes conhecimentos na prática clínica (HAJISHENGALLIS et al., 2019). Após os tratamentos locais, observou-se que ocorreu uma correlação positiva entre os valores sistêmicos das proteínas Alfa-1-glicoproteína ácida, C3 e C4, com os valores locais das áreas de perda óssea e número de células TRAP positivas na região de furca, dos primeiros molares inferiores esquerdos que receberam a indução da periodontite. A medida que houve uma diminuição das proteínas, ocorreu também uma diminuição da área de perda óssea e do número de células TRAP positivas. Corroborando com estes resultados, Rasperini et al. (2019), avaliou os efeitos de um suplemento alimentar sobre parâmetros clínicos periodontais e marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes com periodontite crônica grave. O desbridamento supragengival foi realizado e parâmetros clínicos periodontais foram monitorados e correlacionados com proteína C-reativa sérica (PCR) e metaloproteinase de matriz. A análise longitudinal revelou que os níveis de MMP-8 e 9 diminuíram com o tempo. A correlação entre o sangramento gengival e o nível de MMP-8 em ambos os grupos foi significativa. Apesar de autores sugerirem uma associação entre o tratamento local da doença periodontal e patologias sistêmicas, como relatado por Li e Xu (2018), outros autores, como no trabalho de Joshi et al. (2019), não encontraram esta correlação. Assim, ainda que o melhor conselho continue a ser o incentivo à prevenção, salienta-se a necessidade de realizar mais estudos, eventualmente de intervenção, para esclarecer e determinar qual a real associação entre a Doença Periodontal e os impactos do seu tratamento sobre as alterações sistêmicas.

Para finalizar, podemos citar como limitação do presente estudo, o fato do mesmo ter sido feito em ratos, pois a busca do entendimento dos fatores etiológicos, mecanismos e tratamento das doenças periodontais usando outras espécies animais como modelos, traz também a difícil tarefa de extrapolar os resultados do estudo para os seres humanos. Contudo, o fato de padronizarmos os procedimentos de forma rigorosa foi de suma importância para proporcionar um avanço mais confiável do conhecimento.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, podemos concluir que a associação da doxiciclina ao laser de baixa intensidade, adjuvantes à raspagem e alisamento radicular, foram efetivos, tanto sistemicamente como localmente, no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

REFERÊNCIAS

ABDULJABBAR, T. et al. Efficacy of surgical laser therapy in the management of oral pigmented lesions: A systematic review. **J Photochem Photobiol B**, v. 173, n. 15, p. 353-359, Jun. 2017.

ADRIAENS, P. A. et al. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J Periodontol**, v. 59, n. 8, p. 493-503, 1988.

AGNES, J. E. **Eletroterapia: teoria e prática**. Santa Maria: Orium, 2005.

ALMEIDA, J. M. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **J Periodontol**, v. 79, n. 11, p. 2156-2165, 2008.

AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, X. Y. Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. **J Clin Laser Med Surg**, v. 15, n. 5, p. 209-215, 1997.

ARMITAGE, G. C. et al. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. **J of Periodontol**, v. 71, n. 2, p. 164-171, 2000.

BASTOS, M.F. et al. Effects of lercanidipine on bone density and bone repair in spontaneously hypertensive rats. **Implant Dent**, v. 22, n. 1, p. 49-54, 2013.

BELINELLO-SOUZA, E. L.; et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment: Experimental model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 275–278, jun. 2017.

BENCE, L.; ADDIE, D.; ECKERSALL, P. An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 335-340, 2005.

BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 55, n. 1, p. 36-47, 2011.

BERGER, P. S.; DAHA, M. R.; Complement in glomerular injury. **Semin Immunopathol**, v. 29, p. 375–84, 2007.

BERGSTROM, J. Smoking rate and periodontal disease prevalence: 40-year trends in Sweden 1970-2010. **J ClinPeriodontol**, v. 41, n. 10, p. 952-7, 2014.

BILDT, M. M. et al. Chemically modified tetracyclines stimulate matrix metalloproteinase-2 production by periodontal ligament cells. **J Periodont Res**, v. 41, p. 463-470, 2006.

BILDT, M. M. et al. CMT-3 inhibits orthodontic tooth displacement in the rat. **Arch Oral Biol**, v. 52, p. 571–578, 2007.

BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BOTTINO, C. M. et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration- A materials perspective, **Dental materials**, v. 28, p.703-721, 2012.

CARRARO, E. A. S. et al. Procedimentos básicos em Periodontia. **Rev. dental press periodontia implantol**, v. 2, n. 2, p. 41-53, 2008.

CASTELLOTE, M. C. et al. Levels of complement factors and immunoglobulins in asthmatic children undergoing hyposensitization. **Allergol Immunopathol**, v. 12, p. 259-66, 1984.

CATAO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **RevBrasPatol Oral**, v. 3, p. 214-8, 2004.

CERDEIRA, C. D. et al. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **J Biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1180-1188, Dec. 2016.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CÉSAR-NETO, J. B. et al. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. **J Periodontal Res**, v. 41, n. 2, p.118-123, 2006.

CHAMBERS, T. J. The birth of the osteoclast. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1192, p. 19-26, 2010.

CHAMBRONE, L. et al. Efficacy of Local and Systemic Antimicrobials in the Non-Surgical Treatment of Smokers With Chronic Periodontitis: A Systematic Review. **J Periodontol**, v. 87, p. 1320-1332, 2016.

CONNER, J. G. et al. The acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica* and *Ostertagia ostertagii* and endotoxin administration. **Research in Veterinary Science**, v. 47, n. 3, p. 203-207, 1989.

CRAY, C. Acute phase proteins in animals. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 105, p. 113-150, 2012.

DALCICO, R. et al. Protective Mechanisms of Simvastatin in Experimental Periodontal Disease. **J of Periodontol**, v. 84, n. 8, p.1145-1157, 2013.

DICKIE DE CASTILHOS, E. et al. Association between obesity and periodontal disease in young adults: a population- based birth cohort. **J of clinperiodontol**, v. 39, n. 8, p. 717-724, 2012.

ECKERSALL, P. D. The time is right for acute phase protein assays. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 3-5, 2004.

EICKHOLZ, P. et al. Non-surgical periodontal therapy with adjunctive topical doxycycline: a double-blind randomized multicenter study. **J ClinPeriodontol**, v. 29, p. 108-117, 2002.

EINSTEIN, A. The Quantum Theory of Radiation. **Physikalische Zeitschrift**, v. 18, n. 121, p. 1-15, 1917.

ELIAS, G.P. et al. Dental mineralization and salivary activity are reduced in offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR). **J Appl Oral Sci.** v. 14, n. 4, p. 253-259, 2006.

ENG, J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? **Radiology**, n.227, p.309-313, 2003.

ESLAMIPOUR, F.; MOTAMEDIAN, S. R.; BAGHERI, F. Ibuprofen and Low-level Laser Therapy for Pain Control during Fixed Orthodontic Therapy: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials and Meta-analysis. **J Contemp Dent Pract**, v. 18, n. 6, p. 527-533, Jun. 2017.

FALCÃO, D. A, ISAAC, L. As deficiências de proteínas do sistema complemento e o desenvolvimento de doenças. **Rev Campus**, v. 1, p.36-45, 2008.

FERNANDES, L. A. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 3, p. 219-228, 2009.

FERNANDES, M. S. et al. Effects of fluoride bone repair: an evaluation of RANKL, OPG e and TRAP expression. **Odontology**. v. 102, n. 1, p. 22-30, 2014.

FORTE, W. C. N. **Imunologia do básico ao aplicado**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

FOURNIER, T.; MEDJOUBI-N, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1482, p. 157-71, 2000.

GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

GAMAL, A. Y. L. et al. Doxycycline-Loaded b-Tricalcium Phosphate Release Following EDTA Root Surface Etching Improved the Clinical Outcomes in Chronic Periodontitis: An In Vivo Study. **J Periodontol**, v. 84, p.924-933, 2013.

GENOVESE, W. J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000.

GOLUB, L. M. et al. Treating periodontal disease by blocking tissue-destructive enzymes. **J Am Dent Assoc**, v. 125, p. 163-169, 1994.

GRUPTA, R, et al. Comparative evaluation of subgingivally delivered 10% doxycycline hyclate and xanthan-based chlorhexidine gels in the treatment of chronic periodontitis. **J Contemp Dent Pract**, v. 9, p. 25-32, 2008.

GÜRKAN, A.; CINARCIK, S.; HUSEYINOV, A. Adjunctive subantimicrobial dose: effect on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor-b1 levels in severe, generalized chronic periodontitis. **J ClinPeriodontol**, v. 32, p. 244-253, 2005.

HABERMANN, B. et al. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. **Acta Orthop**, v. 78, n. 2, p. 221-225, 2007.

HAIJSHENGALLIS, G. et al. Complement-Dependent Mechanisms and Interventions in Periodontal Disease. **Front Immunol**, Mar. 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00406.

HASSUMI, M. Y. et al. mPPAR-gamma agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. **IntImmunopharmacol**, v. 9, p. 1150-1158, 2009.

HAYMAN, A.R. Tartrate – resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. **Autoimmunity**, v. 41, n. 3, p. 218-223, 2008.

HEASMAN, P. A. et al. Cost- effectiveness of adjunctive antimicrobials in the treatment of periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 55, n. 1, p. 217-230, 2011.

HEBERT, L. A.; COSIO, F.G.; NEFF, J.C. Diagnostic significance of hypocomplementemia. **Kidney Int**, v. 39, p. 811-21, 1991.

HEIDARI, M. et al. Effect of laser photobiomodulation on wound healing and postoperative pain following free gingival graft: A split-mouth triple-blind randomized controlled clinical trial. **J Photochem Photobiol B**, v. 172, p. 109-114, Jul. 2017.

HOLMES, S. G. et al. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. **Bone**, v. 35, n. 2, p. 471-478, 2004.

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**, v. 25, n. 2, p. 78-84, 2007.

HYUN S, S.G. et al. Comparison of different concentrations of tetracycline-loaded silk fibroin membranes on the guided bone regeneration in the rat calvarial defect model. **Tissue Eng. Regen. Med**, v. 11, p. 476–482, 2014.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: Ativação, regulação e deficiências congênitas adquiridas. **Rev Assoc Med Bras**, v. 47, p. 41-51, 2001.

IWAMOTO, K. et al. Dimer formation of receptor activator of nuclear factor kB induces incomplete osteoclast formation. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 325, n. 1, p. 229-234, 2004.

JIN, Q. et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **J Periodontal**, v.78, p. 1300-1308, 2007.

JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sufhath administration on the periodontium of the rat. **J Periodontal Res**, v. 10, n. 6, p. 332-345, 1975.

JOSHI, A. et al. Gingival crevicular fluid resistin levels in chronic periodontitis with type 2 diabetes before and after non-surgical periodontal therapy: A clinico-biochemical study. **Indian J Dent Res**, v. 30, n. 1, p. 47-51, Jan, 2019.

KAJIKAWA, T. et al. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. **In Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 91-98, 1999.

KALDAHL, W. B.; KALKWARF, K. L.; PATIL, K. D. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. **J Periodontol**, v. 64, n. 4, p. 243-253, 1993.

KANEDA, T.; NOJIMA, T.; NAKAGAWA, M. Endogenous production of TGF beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-Kappa B ligand and macrophage-colony stimulating factor. **J Immunol**, v.165, p. 4254-4263, 2000.

KHANDAN, A.; OZADA, N.; KARAMIAN, E. Novel microstructure mechanical activated nanocomposites for tissue engineering applications. **J. Bioeng. Biomed. Sci**, Jan. 2015. doi: 10.4172/2155-9538.100014.

KHOJASTEHEH, A.; ESLAMINEJAD, M. B.; NAZARIAN, H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 2, p. 356-362, 2008.

KIILI, M. et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. **Journal of ClinPeriodontol**, v.29, p. 224-232, 2002.

KIM, S. J. et al. Effects of low-intensity laser therapy on periodontal tissue remodeling during relapse and retention of orthodontically moved teeth. **Lasers Med Sci**, v. 28, p. 325-333, 2013.

KIM, T. S. et al. Comparison of the pharmacokinetic profiles of two locally administered doxycycline gels in crevicular fluid and saliva. **J ClinPeriodontol**, v. 31, p. 286-292, 2004.

KINANE, D. F.; PRESHAW, P. M.; LOOS, B. G. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J of ClinPeriodontol**, v. 38, p. 44-48, 2011.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, v. 62, n. 1, p. 59-73, 1991.

KLEINFELDER, J. W.; MULLER, R. F.; LANGE, D. E. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v. 26, n. 6, p. 347-351, 1999.

KREISLER, M. et al. Low-level 809-nm laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg. Med**, v.30, p.365-369, 2002.

LACEY, D. L. et al. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998.

LAUER-FIELDS, J. L.; JUSKA, D.; FIELDS, G. B. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. **Biopolymers**, v. 66, n. 1, p. 19-32, 2002.

LERNER, U. H. Bone remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. **Journal of Dental Research**, v. 85, p. 584-595, 2005.

LI, F.; XU, H. S. Effects of low level laser combined with basic periodontal therapy on cytokines and LPS, leptin in gingival crevicular fluid of diabetes mellitus complicated with chronic periodontitis patients. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v. 27, n. 6, p. 637-640, Dec. 2018.

LINDHE, J. et al. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 2, p. 115-128, 1982.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**, 5. ed. Guanabara Koogan, 2010.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. **J Periodontol**, v. 46, n. 11, p. 677-680, 1975.

LIU, B. et al. Deep Sequencing of the Oral Microbiome Reveals Signatures of Periodontal Disease. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e37919, 2012.

LOOMER, P. M. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. **Periodontol**, v. 34, p. 49-56, 2004.

LOPES, J. C.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Osteoimmunology – The hidden immune regulation of bone. **Revista Autoimmun**, v. 8, n. 3, p. 250-255, 2008.

LUI, J.; CORBET, E. F.; JIN, L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 46, n. 1, p. 89-96, Feb. 2011.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493-494, Aug. 1960.

MALUF, A. P. et al. Utilizacao de laser terapeutico em exodontia de terceiros molares inferiores. **RGO**, v. 54, p. 182-4, 2006.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **Am J Pathol**, v. 171, p. 715-27, 2007.

MATIA, J. I. et al. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 38, n. 6, p. 24-35, 1986.

MATTHEWS, D. C. No difference between full-mouth and quadrant-wisetreatment of chronic periodontitis. **Evid Based Dent**, v.10, n.1, p.17, 2009.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 40, n. 11, p. 11-28, Fev, 2006.

NIEMIEC, B. A. Periodontal Disease. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 23, n. 2, p. 72-80, Maio, 2008.

PACIFICI, R. The immune system and bone. **Arch Biochem Biophys**, v.1, n.503, p.41- 53, 2010.

PALTRINIERI, S. et al. Serum alpha1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, p. 271-277, 2007.

PARK, J. B. Effects of doxycycline, minocycline and tetracycline on cell proliferation, differentiation and protein expression in osteoprecursor cells. **J. Craniofac. Surg.** v. 22, p. 1839–1842, 2011.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontol** 2000, v. 60, n. 1, p. 15-39, 2012.

PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JR., A.; ZANIN, F. A. A. **Aplicação do laser na odontologia**. São Paulo: Santos, 2010.

POLSON, A. P. et al. Periodontal pocket treatment in Beagle Dogs using subgingival Doxycycline from a biodegradable system. I. Initial Clinical responses. **J Periodontol**, v. 67, p. 1176-84, 1996.

PRETZL, B.; WIEDEMANN, D.; COSGAREA, R. Effort and costs of tooth preservation in supportive periodontal treatment in a German population. **J Clin Periodontol**, v. 36, p. 669-676, 2009.

RASPERINI, G. et al. Effects of food supplements on periodontal status and local and systemic inflammation after nonoperative periodontal treatment. **J Oral Sci**, Mar. 2019. doi: 10.2334/josnusd.18-0048.

REENSTRA, W. R. et al. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetics versus non diabetic sibling controls. **Acad Emerg Med**, v. 8, p. 519, 2001.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas*. 6a ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, p. 374-86, 2013.

REGGIORI. et al. Terapia a laser no tratamento de herpes simples em pacientes HIV: relato de caso. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 26, n. 3, p. 357-6, 2008.

REQUICHA, J. F. et al. Periodontal tissue engineering strategies based on nonoral stem cells. **Anatomical Record**, v. 297, n. 1, p. 6-15, Jan, 2014.

ROODMAN, G. D. Regulation of osteoclast differentiation. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 1068: p. 100–109, 2006.

RYAN, M. E.; GOLUB, L. M. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. **Periodontology** 2000, v. 24, n. 1, p. 226-238, 2000.

SACHDEVA, S. et al. Comparison of clinical effectiveness of single and multiple applications of 1% chlorhexidine varnish (Cervitec Plus) along with scaling and root planing in patients with chronic periodontitis. **J Indian Soc Periodontol**, v. 22, n. 6, p. 523-528, Nov./Dec. 2018.

SAITO, S. et al. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. **J Dent Res**, v. 70, n. 1, p. 27-33, 1991.

SAKURAI, Y.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **Eur. J. Oral Sci**, v.108, p.29-34, 2000.

SCHMIDT, M. I. et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (ARIC study): a cohort study. **Lancet**, v. 353, p. 1649-52, 1999.

SÉEGUIER, S; GODEAU, G; BROUSSE, N. cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. **J Periodontol**, v.71, n.7, p.1079-85, 2000.

SILVA, E. M. et al. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e osseo: estudo experimental em ratos. **Ver Sul-Bras Odontol**, v. 4, p. 29-35, 2007.

SORSA, T. et al. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 30, n. 878, p. 130-40, 1999.

SOUZA, D. G. et al. Análise do grau de conhecimento em relação aos instrumentais utilizados na disciplina de periodontia dos alunos do último período de faculdades de odontologia do Rio de Janeiro. **Braz J Periodontol**, v. 22, n. 1, p. 94-99, 2012.

SOYSA, N. S.; ALLES, N. NF kappa beta functions in osteoclast. **Biochem Biophys Rev Commum**, v. 378, p. 1-5, 2009.

STEFANELLO, T. D.; HAMERSKI, C. R. Tratamento de úlcera de pressão através do laser asga de 904 nm - um relato de caso. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v.10, n.2, maio/ago. 2006.

SUDA, T. et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endroc Ver**, v.3, p. 345-57, 1999.

TENG, Y. T. A. et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. **J Clin Invest**, v. 106, n. 6, p. 59-67, 2000.

THEODORO, L. H. et al. Curcumin photodynamic effect in the treatment of the induced periodontitis in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 8, p. 1783–1791, Nov. 2017.

THÉOLEYRE, S. et al. Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and MAPK. **Biochim Biophys Acta**, v. 1644, n. 1, p. 1-7, 2004.

THOMAS, L. The complement system. In: THOMAS, L. **Clinical laboratory diagnostics**. Frankfurt: T-H Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 794-806.

TING, M.; WHITAKER, E. J.; ALBANDAR, J. M. Systematic review of the in vitro effects of statins on oral and perioral microorganisms. **Eur J Oral Sci**, v.124, p. 4-10, 2016.

TOMASI, C.; KOUTOUZIS, T.; WENNSTRÖM, J. L. Locally delivered doxycycline as an adjunct to mechanical debridement at retreatment of periodontal pockets. **J Periodontol**, v. 79, p. 431-39, 2008.

USACHEVA, M. ; TEICHER, T. M. C. ; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg Med**, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

VERDEGUER, F. et al. Complement regulation in murine and human hypercholesterolemia and role in the control of macrophage and smooth muscle cell proliferation. **Cardiovasc Res**. v. 76, p.340–50, 2007.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **J Antimicrob Chemother**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Austr Dental J**, v. 42, p. 247-54, 1997.

WEIJDEN, F. V. D.; SLOT D. E. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. **Periodontology 2000**, v. 55, p. 104-123, 2011.

WEST, C. D. The complement profile in clinical medicine. Inherited and acquired conditions lowering the serum concentrations of complement components and control proteins.

Complement Inflamm, v. 6, p. 49-64, 1989.

WINKEL, V. et al. Serum α -1 acid glycoprotein and serum amyloid A concentrations in cats receiving antineoplastic treatment for lymphoma. **American Journal Veterinary Research**, v. 76, p. 983-988, 2015.

WOLFSON, E. M.; SELTZER, S. Reactions of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. **J End**, v. 1, p. 395-402, 1975.

WORCH, K. P.; LISTGARTEN, M. A.; KOROSTOFF, J. M. A multidisciplinary approach to the diagnosis and treatment of early-onset periodontitis: a case report. **J Periodontol**, v. 72, p. 96-106, 2001.

YUKI, M.; ITOH, H.; TAKASE, K. Serum α 1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, p. 65-71, 2010.

ANEXO A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA DOXICICLINA E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE COMO ADJUVANTES AO TRATAMENTO CONVENCIONAL DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: UMA ANÁLISE RADIOGRÁFICA, BIOQUÍMICA, HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA", registrada com o nº 57/2017, sob a responsabilidade de Leandro Araújo Fernandes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 23/11/2017 a 31/06/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	150
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 23 de Novembro de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL