

## O USO DE ALENDRONATO SÓDICO E TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM PERIODONTITE EXPERIMENTAL INDUZIDA. ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO EM RATOS

TACIANE MENEZES DA SILVEIRA<sup>1</sup>; FELIPE MARTINS SILVEIRA<sup>2</sup>; MARCELA  
CALDEIRA<sup>3</sup>; VITOR GENARO<sup>4</sup>; CAROLINA DOS SANTOS SANTINONI<sup>5</sup>;  
NATÁLIA MARCUMINI POLA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tacianesvs@hotmail.com](mailto:tacianesvs@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas – [fp.martinss@gmail.com](mailto:fp.martinss@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade do Oeste Paulista – [ma.lucio.11@hotmail.com](mailto:ma.lucio.11@hotmail.com),

<sup>4</sup>Universidade do Oeste Paulista - [vitorgenaro1971@gmail.com](mailto:vitorgenaro1971@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade do Oeste Paulista - [carolsantinoni@msn.com](mailto:carolsantinoni@msn.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas - [nataliampola@gmail.com](mailto:nataliampola@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) caracteriza-se por uma inflamação crônica dos tecidos periodontais de revestimento e sustentação, induzida pelo biofilme microbiano (HILL et al., 2019), a qual pode levar a reabsorção óssea alveolar e também a migração apical do epitélio juncional (FURLANETO et al., 2014). A presença microbiana periodontopatogênica e a consequente resposta imunopatológica do hospedeiro, além dos fatores de risco individuais e específicos, são elementos-chave da patogênese da doença (DE ALMEIDA et al., 2015). O tratamento convencional da DP é fundamentado na redução da microbiota periodontopatogênica por meio do procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR) (KALDAHL et al., 1993). Entretanto, a terapia mecânica pode ser falha na eliminação de bactérias localizadas em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, como as áreas de furca e depressões radiculares (KALDAHL et al., 1993). Tratamentos alternativos adjuvantes à RAR, representados por antimicrobianos e agentes moduladores do hospedeiro, têm sido propostos com o objetivo de otimizar os resultados no manejo da condição periodontal instalada (HILL et al., 2019). Nesse contexto, alguns estudos recentes têm demonstrado efeitos positivos da aplicação tópica do aminobisfosfonato alendronato sódico (ALN) e do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) adjuntos à RAR (DE ALMEIDA et al., 2015; GARCIA et al., 2013). A justificativa para o uso das modalidades terapêuticas alternativas mencionadas está na potente inibição da reabsorção óssea promovida pelo ALN (RUSSELL, 2011) e nas propriedades antimicrobianas da aPDT (DE ALMEIDA et al., 2008b), os quais poderiam auxiliar no controle da doença. Embora alguns autores apresentem resultados satisfatórios com o uso do ALN e aPDT isoladamente (DE ALMEIDA et al., 2015, 2008b), nenhum estudo avaliou o desfecho da associação dessas terapias no tratamento da DP. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, por meio de reações imunoistoquímicas, a influência do ALN e da aPDT, associados ou não, como adjuvantes à RAR no tratamento da periodontite experimental (PE) induzida em ratos.

### 2. METODOLOGIA

Noventa e seis ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) provenientes do Biotério Central da UFPel foram submetidos à indução da PE, através da inserção

de uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Após sete dias, a ligadura foi removida e os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=8), de acordo com os tratamentos realizados: (1) raspagem e alisamento radicular (RAR): RAR e irrigação da bolsa periodontal com soro fisiológico; (2) ALN: RAR e irrigação da bolsa periodontal com alendronato sódico ( $10^{-5}$  M); (3) aPDT: RAR, irrigação da bolsa periodontal com azul de metileno e aplicação do laser em baixa intensidade; e (4) ALN/aPDT: RAR, irrigação da bolsa periodontal com ALN e aplicação do aPDT. Os animais foram eutanasiados após 7, 15 e 30 dias dos tratamentos. As mandíbulas dos animais foram removidas, fixadas em formol tamponado 4%, desmineralizadas com Solução de Planck-Rychlo, incluídas em parafina e submetidas a cortes histológicos seriados de 5µm. Foram realizadas análises imunoistoquímicas para as proteínas TRAP, RANKL e OPG e avaliação de maturação do colágeno através da coloração do vermelho picrossirius. Os dados foram submetidos à análise estatística (two-way ANOVA; Tukey *post hoc*;  $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem média e o desvio padrão de fibras de colágeno imaturas e maduras para todos os grupos experimentais, bem como as comparações entre grupos, estão documentados na Figura 1. A porcentagem média e desvio padrão de células TRAP-positivas para todos grupos experimentais aos 7, 15 e 30 dias de pós-operatório, bem como as comparações entre os grupos estão apresentadas na Figura 2.

Todos os tratamentos utilizados no estudo foram propostos com base na literatura que mostrou um possível benefício no uso dos tratamentos isolados (DE ALMEIDA et al., 2015; FERNANDES et al., 2010; PRADEEP et al., 2012, 2013). Além disso, a combinação de ALN e aPDT foi proposta para adicionar o efeito antirreabsortivo do ALN às ações bacterianas e estimulantes celulares de aPDT no tratamento de PE.

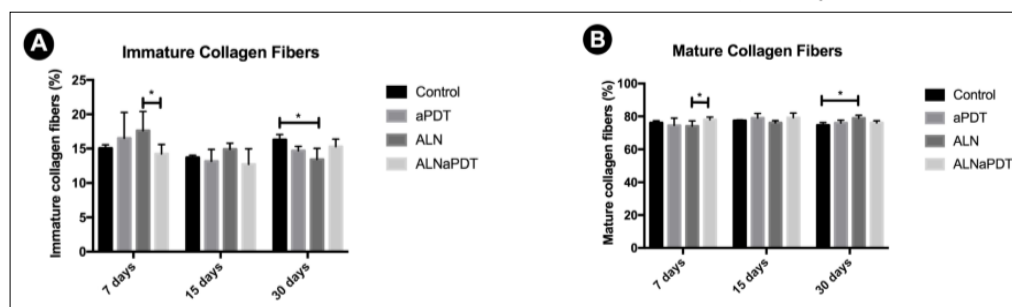
O grupo tratado com ALN apresentou uma porcentagem significativamente menor de fibras colágenas imaturas e uma porcentagem significativamente maior de fibras colágenas maduras do que o controle aos 30 dias de pós-operatório. Considerando que o colágeno está presente em grandes quantidades nos tecidos periodontais, pode-se inferir que o ALN acelerou sua cicatrização. Assim, os resultados do presente estudo corroboram estudos clínicos e laboratoriais que demonstraram benefícios na aplicação tópica coadjuvante de ALN à RAR (SHARMA; PRADEEP, 2012; WANIKAR; RATHOD; KOLTE, 2019). O Grupo ALN apresentou expressão de RANKL significativamente maior que o grupo controle aos 15 dias de pós-operatório. O que pode sugerir uma fase posterior da cicatrização óssea – remodelação óssea (HARADA; TAKAHASHI, 2011; TAKAHASHI et al., 2011) que ainda pode ser confirmada considerando a melhora da maturação do colágeno observada neste grupo.

Resultados positivos de ALN na cicatrização periodontal foram aprimorados ainda mais quando este tratamento foi associado ao aPDT. O Grupo ALN / aPDT apresentou percentual significativamente menor de fibras colágenas imaturas e porcentagem significativamente maior de fibras colágenas maduras do que o grupo ALN aos 7 dias de pós-operatórios. É possível que a produção de colágeno pelos fibroblastos no espaço extracelular tenha sido favorecida pela difusão de oxigênio através do tecido fornecido pelo aPDT (KIKUCHI et al., 2015). Além disso, o Grupo ALN / aPDT apresentou um número significativamente menor de células positivas para TRAP do que o Grupo aPDT nos estágios iniciais da

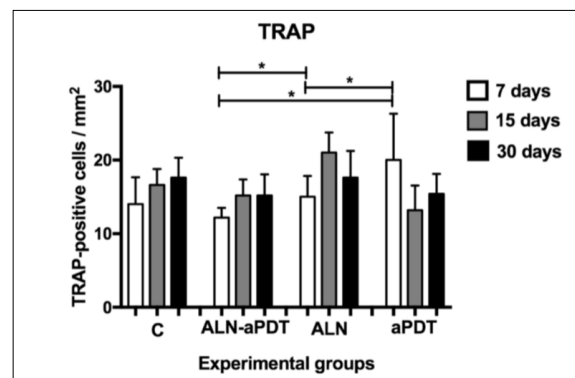
cicatrização (7 dias de pós-operatório), o que significa que a combinação diminuiu ainda mais a reabsorção óssea, reduzindo o número de osteoclastos. Considerando que os grupos tratados com a combinação de ALN / aPDT apresentaram número significativamente menor de células TRAP-positivas do que tratamentos isolados, pode-se inferir que ocorreu um efeito sinérgico entre o ALN e o aPDT na produção de radicais livres. Estudos futuros poderiam comprovar essa hipótese.

Algumas limitações deste estudo podem ser apontadas como o tempo de exposição do laser nos grupos aPDT e ALN / aPDT, que foi de 4,66 minutos / ponto. Embora os grupos tenham mostrado resultados positivos, como estudos anteriores que usaram maior tempo de exposição à luz (DE ALMEIDA et al., 2008a), esse tempo poderia ter influenciado na manutenção do azul de metileno na bolsa periodontal ao longo do tempo. Estudos adicionais podem ajudar a esclarecê-lo e confirmar se a produção de radicais livres é o mecanismo de ação do ALN combinado ao aPDT.

**FIGURA 1.** Porcentagem média e desvio padrão das fibras colágenas imaturas (A) e maduras (B) para todos os grupos experimentais aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios, bem como as comparações entre grupos. \* $p < 0,05$ ; ALN, alendronato de sódio; ALN / aPDT, alendronato de sódio e terapia fotodinâmica; aPDT, terapia fotodinâmica antimicrobiana.



**FIGURA 2.** Porcentagem médias e desvio padrão de células TRAP-positivas para todos os grupos experimentais aos 7, 15 e 30 dias de pós-operatório, bem como as comparações entre grupos. \* $p < 0,05$ ; ALN, alendronato de sódio; ALN / aPDT, alendronato de sódio e terapia fotodinâmica; aPDT, terapia fotodinâmica antimicrobiana.



#### 4. CONCLUSÕES

Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o uso tópico coadjuvante de ALN a RAR - isoladamente ou combinado com aPDT aumentou a

maturação do colágeno e reduziu a osteoclastogênese durante a cicatrização da periodontite experimental em ratos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE ALMEIDA, J. et al. Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 10, p. 1166–1175, 2015.
- DE ALMEIDA, J. M. et al. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 6, p. 1081–1088, jun. 2008a.
- DE ALMEIDA, J. M. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 11, p. 2156–65, nov. 2008b.
- FERNANDES, L. A. et al. Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 3, p. 237–243, 2010.
- FURLANETO, F. A. C. et al. Effects of locally administered tiludronic acid on experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 85, n. 9, p. 1291–301, set. 2014.
- GARCIA, V. G. et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 1, p. 143–50, jan. 2013.
- HARADA, S.; TAKAHASHI, N. [Control of bone resorption by RANKL-RANK system]. **Clinical calcium**, v. 21, n. 8, p. 1121–30, ago. 2011.
- HILL, G. et al. Indocyanine green-based adjunctive antimicrobial photodynamic therapy for treating chronic periodontitis: A randomized clinical trial. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 26, p. 29–35, jun. 2019.
- KALDAHL, W. B.; KALKWARF, K. L.; PATIL, K. D. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. **Journal of periodontology**, v. 64, n. 4, p. 243–53, abr. 1993.
- KIKUCHI, T. et al. Adjunctive Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Nonsurgical Periodontal Treatment: A Review of Literature. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 24111–26, 13 out. 2015.
- PRADEEP, A. R. et al. Local drug delivery of alendronate gel for the treatment of patients with chronic periodontitis with diabetes mellitus: a double-masked controlled clinical trial. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 10, p. 1322–8, out. 2012.
- PRADEEP, A. R. et al. 1% alendronate gel as local drug delivery in the treatment of Class II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. **Journal of periodontology**, v. 84, n. 3, p. 307–15, mar. 2013.
- RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 2–19, jul. 2011.
- SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 1, p. 11–8, jan. 2012.
- TAKAHASHI, N. et al. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 21–30, 1 jan. 2011.
- WANIAR, I.; RATHOD, S.; KOLTE, A. P. Clinico-radiographic evaluation of 1% alendronate gel as an adjunct and smart blood derivative platelet rich fibrin in grade ii furcation defects. **Journal of Periodontology**, v. 90, n. 1, p. 52–60, 2019.