PRISCILA VIVAS DA CRUZ ANDRADE

**Avaliação de mediadores inflamatórios após a terapia fotodinâmica no
tratamento de bolsas periodontais residuais de pacientes
em manutenção periodontal**

São Paulo

2014

PRISCILA VIVAS DA CRUZ ANDRADE

**Avaliação de mediadores inflamatórios após a terapia fotodinâmica no
tratamento de bolsas periodontais residuais de pacientes
em manutenção periodontal**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giorgio De Micheli

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Andrade, Priscila Vivas da Cruz.

Avaliação de mediadores inflamatórios após a terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas periodontais residuais de pacientes em manutenção periodontal/ Priscila Vivas da Cruz Andrade; orientador Giorgio De Micheli. -- São Paulo, 2015.

84 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Doenças periodontais. 2. Laser. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Inflamação. I. De Micheli, Giorgio. II. Título.

Andrade PVC. Avaliação de mediadores inflamatórios após a terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas periodontais residuais de pacientes em manutenção periodontal. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas ou Odontologia.

Aprovado em: / / 2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho ao André, meu amor,
que acompanha todo o meu crescimento de perto
e me faz uma pessoa muito melhor e mais feliz.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Giorgio De Micheli por sempre despender tanto carinho e confiança, por ter me acolhido na especialização e ter aberto as portas da pós-graduação.

À Profa. Marina Clemente Conde, por tantos ensinamentos desde a especialização e por confiar em mim desde o meu início de vida profissional em São Paulo.

À Profa. Marinella Holzhausen Caldeira, pessoa imprescindível em todo o meu processo no mestrado e na pesquisa, não tenho como agradecer tantos ensinamentos e tanta ajuda. Todos os alunos deveriam ter a oportunidade de conviver cientificamente com você.

Ao Prof. Claudio Mendes Pannuti, por todos os ensinamentos transmitidos.

À Vanessa Tubero por toda sua generosidade em ceder o seu conhecimento e me ajudar quando sempre precisei.

Às fotodinâmicas, nossa equipe de pesquisa, por tanto trabalho e dedicação durante todo o seguimento da pesquisa. Meu agradecimento especial para Verônica Carvalho e Michelle de Franco Rodrigues por tanto amor e dedicação ao nosso projeto e por juntas termos transformado a nossa jornada em um caminho mais leve, e também a Donata de Souza, Amália Cristina de Souza, Ananda Fini, Andressa Gonçalves e Camila de Luca.

Aos pacientes, por tornarem o nosso estudo possível.

Aos amigos do mestrado: Michelle Rodrigues, Mariana Rocha, Mariana Rabelo, Henrique Bueno, Marcelo Sirolli, Ieda Abreu, Vanessa Almeida, Daniela Takahashi, Henrique Fukushima, Stefania Possamai, Carlos Eduardo Mafra.

Aos demais amigos da pós-graduação : Adriana Foz, Isabela Brito, Gisleine Sakata, Cissa, Hilana Artese, Ana Paula Sassá.

Aos Professores: Luciana Saraiva e Fausto Mendes pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da Fousp: Giuseppe Alexandre Romito, Luiz Antonio Pugliese Alves de Lima, João Batista César Neto, Marinella Holzhausen Caldeira, Luciana Saraiva, Cláudio Pannuti, Marina Conde, Giorgio De Micheli, Marco Antônio Paupério Georgetti, Cristina Villar, pelos ensinamentos durante o mestrado.

Às secretárias: Márcia Maria dos Santos, Marília Camargo, Cecília Forte Muniz e Nina Mascarenhas por sempre serem gentis, solícitas e ajudarem em tudo que foi preciso.

À Meire Hiyane, técnica do laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB 4, pela ajuda no processamento das amostras.

À FAPESP pelo auxílio a esta pesquisa.(2010/20157-3).

À CAPES pela bolsa de mestrado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Aos meus pais por tanto amor,
dedicação e abdições para criar suas filhas.*

*À minhas irmãs, por um amor que só
nós três sabemos ter.*

*Aos meus sobrinhos: Ana Clara, João Pedro e Antônio
por trazerem mais alegria a nossa família
Ao André, por estar sempre do meu lado.*

RESUMO

Andrade PVC. Avaliação de mediadores inflamatórios após a terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas periodontais residuais de pacientes em manutenção periodontal [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da terapia fotodinâmica (PDT) no tratamento de bolsas residuais de pacientes portadores de periodontite crônica em manutenção periodontal, através da avaliação de parâmetros imunológicos, durante 12 meses de acompanhamento. Foi conduzido um estudo prospectivo intervencional com 28 pacientes com periodontite crônica, que foram submetidos ao tratamento periodontal não-cirúrgico e apresentaram ao menos quatro sítios com bolsas residuais para serem submetidos à PDT. Os pacientes foram pareados em gênero, idade e média de profundidade clínica de sondagem (PCS) dos sítios experimentais, e assim sorteados em grupo teste (PDT) ou grupo controle. A intervenção foi feita no início do estudo, aos três, seis e nove meses e a coleta do fluido gengival foi realizada antes da intervenção, uma semana após, três e 12 meses depois. A avaliação imunológica, realizada por meio do Luminex, quantificou os níveis de dez citocinas: interleucina (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-1ra, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-4 e IL-10. Em relação a essa análise, verificou-se que para o FGF, IL-4 e TNF- α não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$) em qualquer momento do estudo. Os mediadores IL-1 α , IL-1 β , IL-8 e VEGF apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos, ao passo que os mediadores IL-1ra e IFN- γ demonstraram diferença estatística ($p<0,01$) ao longo do tempo em ambos os grupos e a IL-10 apresentou diferença estatística ($p<0,01$) aos 03 meses para o grupo PDT. Dentro dos parâmetros apresentados, a PDT se mostrou superior na modulação da inflamação.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Laser. Terapia fotodinâmica. Inflamação

ABSTRACT

Andrade PVC. Evaluation of inflammatory mediators following photodynamic therapy in the treatment of residual periodontal pockets of periodontal patients in maintenance [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

The objective of this study was to evaluate the impact of photodynamic therapy (PDT) in the treatment of residual pockets of patients with chronic periodontitis in periodontal maintenance, by evaluating immunological parameters during 12 months of follow up. . An interventional prospective study in 28 patients with chronic periodontitis, who underwent non-surgical periodontal treatment and had at least four sites with residual pockets to undergo PDT was conducted. Patients were matched for gender, age and average probing pocket depth (PPD) of the experimental sites, and so drawn in group test (PDT) or control group. The intervention was done at baseline, at three, six, nine and gingival fluid collection was performed before intervention, a week after three and 12 months later. Immunological evaluation performed by the Luminex quantified levels ten cytokines: interleukin (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-1ra, fibroblast growth factor (FGF), vascular growth factor endothelial (VEGF), interferon- γ (IFN- γ), Tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-4 and IL-10. In relation to this analysis, it was found that FGF, IL-4 and TNF- α was not different between groups ($p > 0.05$) at any time of the study. The mediators IL-1 α , IL-1 β , IL-8 and VEGF showed a significant difference ($p < 0.05$) between the groups, whereas IL-1ra mediators and IFN- γ showed a statistical difference ($p < 0.01$) over time in both groups and IL-10 showed statistically significant difference ($p < 0.01$) at 03 months for PDT group. Within the given parameters, the PDT was superior in the modulation of inflammation

Keywords: Periodontal diseases. Laser. Photodynamic therapy. inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Coleta de dados clínicos	30
Figura 4.2 - Coleta do fluido gengival	30
Figura 4.3 - Fotossensibilizador dispensado na bolsa periodontal	32
Figura 4.4 - Irradiação com o laser	32
Figura 4.5 - Fluxograma	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Diagrama representativo do recrutamento e acompanhamento dos indivíduos	39
Tabela 5.2	Dados demográficos e características clínicas dos pacientes dos grupos teste e controle antes do tratamento periodontal e no início do estudo	40
Tabela 5.3	Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS e NCI (sítios experimentais)	41
Tabela 5.4	Níveis da IL-1 α (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	42
Tabela 5.5	Níveis da IL-1 β (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	43
Tabela 5.6	Níveis da IL-8 (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	44
Tabela 5.7	Níveis da TNF- α (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	45
Tabela 5.8	Níveis da IFN- γ (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	46
Tabela 5.9	Níveis da IL-4 (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	46
Tabela 5.10	Níveis da IL-10 (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	47
Tabela 5.11	Níveis da IL-1ra (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	48
Tabela 5.12	Níveis da FGF (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	49
Tabela 5.13	Níveis da VEGF (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle	50
Tabela 5.14	Escala Visual Analógica para percepção dos efeitos adversos	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
EVA	Escala visual analógica
<i>F.nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos de macrófagos
IPV	Índice de placa visível
IS	Índice de sangramento à sondagem
IL-1	Interleucina-1
IL- 1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-8	Interleucina-8
IL- 10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
IFN- γ	Interferon gama
IL-1ra	Receptor antagonista da interleucina 1
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MMP2	Metaloproteinases de matriz 2
MMP8	Metaloproteinases de matriz 8
NCI	Nível Clínico de Inserção
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Solução salina tampão fosfato
PCS	Profundidade clínica de sondagem
PDT	Terapia Fotodinâmica
PGE2	Prostaglandina-E2

P.gingivalis

P. intermedia

PMNs

RANKL

TNF- α

VEGF

IGF-1

Porphyromonas gingivalis

Prevotella intermedia

Polimorfonucleares

Receptor ligante do fator nuclear kappa B

Fator de necrose tumoral alfa

Fator de crescimento específico do endotélio

Fator de crescimento semelhante a insulina

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	milímetro
%	porcentagem
$\geq$	maior que
$\leq$	menor que
ml	mililitro
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
μg	micrograma
nm	nanometro
mW	miliwatt
s	segundo
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
μL	microlitro
g	grama
pg/ml	picograma por microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	71
APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica é uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes causada por grupos específicos de microrganismos, acompanhada pela destruição progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar (Armitage, 1999). A destruição do tecido periodontal ocorre principalmente como resultado das respostas imuno-inflamatórias de um hospedeiro susceptível frente a uma ameaça microbiana persistente (Schenken, 2006).

Os periodontopatógenos produzem diversos fatores que podem estimular as células do hospedeiro a ativar uma variedade de respostas que levam à produção de potentes mediadores inflamatórios, tais como o metabólito do ácido araquidônico, prostaglandina-E2 (PGE2), enzimas conhecidas como metaloproteinases da matriz (MMPs) e as citocinas interleucina (IL) IL- 1 α , IL-1 β , IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Schwartz et al., 1997).

Sabe-se que a difusão de produtos bacterianos, especialmente os produzidos por bactérias Gram-negativas, leva à inflamação local e causa a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Os PMNs ativados e os macrófagos constituem uma importante fonte de mediadores pró-inflamatórios (Curfs et al., 1997), os quais em elevada produção leva a destruição dos tecidos periodontais no hospedeiro (Offenbacher et al., 1993).

O tratamento periodontal consiste no debridamento mecânico das superfícies radiculares com o objetivo de reduzir a carga bacteriana e alterar as condições ambientais dos nichos microbianos para que, conseqüentemente, haja uma redução da resposta inflamatória do hospedeiro (Angaji et al., 2010). Entretanto, alguns sítios não respondem favoravelmente ao tratamento da doença periodontal e, levando em consideração aspectos locais, isso ocorre provavelmente devido à invasão tecidual por patógenos específicos ou regiões de difícil acesso à raspagem, como lesões de furca, concavidades e bolsas muito profundas que limitam o alcance do debridamento mecânico, e por isso demandam a necessidade de abordagens complementares ao tratamento inicial (Sanz et al., 2012).

As bolsas periodontais residuais, que são os sítios com profundidade clínica de sondagem (PCS) maior ou igual a 4 mm, após o tratamento inicial, carregam o risco da presença contínua de patógenos periodontais e podem ser recolonizadas

por uma microbiota incompatível com a saúde periodontal (Westfeld et al., 1998; Claffey; Egelberg, 1995; Renvert; Persson, 2002). Nesse caso, bolsas residuais podem requerer a execução de procedimentos complementares, como cirurgias periodontais ou uso de antimicrobianos (Pedrazzoli et al., 1991; Van Winkelhoff et al., 1996), com a finalidade de aumentar a chance de condições clínicas compatíveis com saúde periodontal.

A adição da antibioticoterapia sistêmica ao tratamento periodontal tem como finalidade eliminar os microrganismos persistentes das bolsas periodontais após o tratamento mecânico. Essa terapia, entretanto, é controversa devido à possibilidade de desenvolvimento de organismos resistentes e da sua limitação em penetrar na matriz extracelular do biofilme dental (Adriaens et al., 1998; Cortelli et al., 2006; Herrera et al., 2008).

Dessa maneira, novas abordagens terapêuticas complementares ao tratamento periodontal convencional vêm ganhando espaço na periodontia. A aplicação do laser no campo da periodontia tem recebido grande interesse científico ao longo das últimas décadas, e uma variedade de sistemas de lasers têm sido investigados em vários estudos *in vitro* e *in vivo* (Theodoro et al., 2006; de Andrade et al., 2008; Cappuyns et al., 2012).

Quando utilizado no tratamento de doenças periodontais inflamatórias, os lasers podem contribuir com a diminuição da inflamação e a redução bacteriana nas bolsas periodontais (de Andrade et al., 2008; Ishikawa et al., 2009). Diversos estudos avaliaram a eficácia do laser, tanto em alta como em baixa intensidade, na regulação de mediadores inflamatórios relacionados à doença periodontal (Quadri et al., 2005; Gómez et al., 2011; Luchesi et al., 2013), entretanto pouco se sabe sobre o efeito da PDT sobre mediadores inflamatórios em bolsas periodontais residuais ao longo do tempo.

Dessa forma, o presente estudo utilizou a PDT com o objetivo de superar as limitações da raspagem e alisamento radicular em sítios periodontais não responsivos, representados por suas condições clínicas e regulação de parâmetros inflamatórios.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A doença periodontal se desenvolve como o resultado de um desequilíbrio entre os microrganismos presentes na placa dental e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Oliveira et al., 2009). A perpetuação da resposta do hospedeiro frente a um desafio bacteriano persistente perturba os mecanismos homeostáticos e resulta na liberação de mediadores biológicos tais como as citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , MMPs e PGE2. Estes mediadores da inflamação promovem a destruição extracelular da matriz no periodonto e estimulam a reabsorção óssea (Page, 1998; Giannobile, 2008; Saglam et al., 2014).

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória importante na iniciação e desenvolvimento da periodontite. É produzida principalmente por neutrófilos e macrófagos e se apresenta nas formas α e β . A IL-1 α e a IL-1 β atuam como receptores agonistas e a IL-1ra como receptor antagonista da IL-1 (Delaleu; Bickel, 2004). A citocina na forma β é a mais predominante, e regula a produção de PGE-2, leucotrienos e fator ativador de plaquetas em vários tipos celulares, levando à ativação dos osteoclastos e à reabsorção óssea. Além disso, ela causa a apoptose das células produtoras de matriz, limitando a capacidade reparativa do periodonto (Raisz; Rodon, 1996; Agarwal et al., 1998). Já a forma α é capaz de inibir a atividade dos osteoblastos e promover a atividade dos osteoclastos, além de estimular a produção das MMPs (Bostanci et al., 2007).

A IL-8 tem a capacidade de induzir a migração de polimorfonucleares os quais, ao chegar ao local da inflamação, promovem o recrutamento de mais PMNs e o acúmulo e ativação de monócitos, macrófagos e linfócitos (Raisz; Rodon, 1996).

O TNF- α é um potente mediador inflamatório que regula positivamente a produção de collagenase, PGE-2, quimiocinas e citocinas e, da mesma forma que a IL-1 β , exercem efeitos pró-inflamatórios estimulando a reabsorção óssea e a produção de MMP2 e MMP8 (Graves; Cochran, 2003; Bastos et al., 2009). A IFN- γ também é uma citocina pró-inflamatória, produzida pelos macrófagos e está implicada na modulação da produção da IL-1 β e na indução da TNF- α (Figueredo et al., 2008).

A IL-10 é uma citocina produzida por monócitos, células T e macrófagos, sendo implicada na supressão da destruição dos tecidos, na inibição da síntese das

citocinas pró-inflamatórias e no aumento da produção da IL-1ra. Dessa maneira, acredita-se que a IL-10 tenha um papel regulador importante na limitação da duração e extensão da resposta inflamatória aguda (Goutoudi et al., 2004). A interleucina-4 (IL-4) é secretada a partir de células T auxiliares e tem sido associada na ativação dos macrófagos para regular negativamente a síntese de mediadores pró-inflamatórios tais como: IL-1 β , IL-6 E PGE-2 (Te Velde et al.,1990). Essas citocinas descritas são consideradas importantes marcadores da doença periodontal.

Nas últimas décadas para o tratamento da doença periodontal foram realizadas várias tentativas com o intuito de complementar as medidas antimicrobianas (Séguier et al., 2010). Alguns estudos demonstraram que o uso da antibioticoterapia sistêmica, quando associado à raspagem e alisamento coronoradicular, apresenta um benefício adicional em pacientes com alto risco de progressão da doença periodontal. Entretanto o risco para o desenvolvimento de resistência microbiana e também efeitos colaterais, como intolerância gastrointestinal e hipersensibilidade aos antibióticos, torna a sua indicação mais cautelosa (Angaji et al., 2010; Zandbergen et al., 2013). A utilização de agentes antimicrobianos de uso local, por meio do uso de dispositivos contendo antimicrobianos, como chip de clorexidina ou gel de metronidazol, poderia ser uma alternativa complementar ao tratamento mecânico, entretanto os estudos demonstram que esses agentes não promovem benefício adicional (Querido; Cortelli, 2003).

Nos últimos anos, muitos estudos investigaram o uso dos lasers de alta intensidade como coadjuvante na terapia periodontal (Karlsson et al., 2008) visando uma redução da microbiota. Entretanto, os resultados não se mostraram favoráveis demonstrando que a sua atuação parece não proporcionar benefícios adicionais ao tratamento periodontal não cirúrgico. (de Andrade et al.,2008; Euzebio et al., 2013). A aplicação dos lasers de baixa intensidade, devido a suas propriedades bioestimuladoras, tem sido muito recomendada para a cicatrização de feridas e redução de dor. (Ozcelik et al.,2008) Mais recentemente, despertou-se na comunidade científica um maior interesse sobre o seu uso através da terapia fotodinâmica (PDT) e sua capacidade antimicrobiana. Dessa forma, a PDT foi introduzida como uma terapia coadjuvante promissora ao tratamento periodontal. (Walsh et al., 2003).

A Terapia Fotodinâmica

A PDT envolve a associação da luz laser a um corante, o fotossensibilizador. O biofilme é impregnado pelo agente fotossensibilizador que se torna excitado quando irradiado, essa reação transfere energia às moléculas de oxigênio da célula bacteriana, dessa forma são formados o oxigênio singleto e os radicais livres, formas altamente reativas e capazes de destruir sistemas biológicos, levando à morte celular (Meisel; Kocher, 2005). Dessa maneira, a PDT pode ser um complemento ao tratamento periodontal possibilitando melhor desinfecção da superfície radicular.

A atuação da terapia fotodinâmica no biofilme dental foi comprovada por estudos *in vitro* (Dobson; Wilson, 1992; Sarkar; Wilson, 1993). Esses estudos demonstraram que o oxigênio singleto é capaz de agir diretamente nas moléculas da matriz extracelular do biofilme degradando polissacarídeos, deixando os microrganismos vulneráveis ao efeito fotoquímico, diferentemente dos antibióticos (Soukos et al., 2003; Konopka; Goslinski, 2007). Microrganismos organizados no biofilme oral são menos sensíveis aos antibióticos. Ao se administrar a medicação por via oral é difícil manter as concentrações terapêuticas para os sítios alvo e organismos alvo. Dessa forma, os patógenos podem desenvolver resistência a determinadas drogas. A principal vantagem da PDT é o não favorecimento a resistência bacteriana. Polissacarídeos presentes na matriz extracelular do biofilme oral são altamente sensíveis ao oxigênio singleto (Raghavendra et al., 2009).

Os corantes empregados na PDT caracterizam-se por serem atóxicos para as células humanas. Os mais utilizados como substâncias fotossensibilizadoras na odontologia são: azul de toluidina e azul de metileno. Esses corantes têm a capacidade de absorver a luz visível e participar das reações fotoquímicas. Uma substância fotossensibilizadora para ser considerada ideal deve ser biologicamente estável, apresentar baixa toxicidade, uma boa absorção da luz no espectro vermelho, hidrossolubilidade e fácil eliminação pelo organismo (Garcez, 2003; Wainright, 2004; Hamblin; Hason, 2004).

A efetividade da PDT na redução de periodontopatógenos foi confirmada por estudos em animais (Sigusch et al., 2005; de Almeida et al., 2007), que demonstraram a penetração do corante no tecido epitelial sem provocar ulceração e

inflamação do tecido conjuntivo, indicando a segurança do método para os tecidos (Komerik et al., 2006).

Os corantes azul de metileno e azul de toluidina atuam como agentes fotossensibilizadores capazes de provocar morte celular de periodontopatógenos como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, quando submetidos à PDT (Wilson et al., 1993; Chan; Lai, 2003; Souza, 2007; Qin et al., 2008). O emprego do fotossensibilizador isoladamente, sem irradiação com laser, não se mostrou eficiente na redução da viabilidade de culturas de periodontopatógenos, quando comparadas às que também receberam irradiação (Wilson et al., 1993, Chan; Lai, 2003). Da mesma maneira, o fotossensibilizador isolado não foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das culturas de periodontopatógenos coletados de placa subgengival de pacientes com periodontite crônica (Sarkar; Wilson, 1993; Qin et al., 2008). Ainda, em um estudo em ratos, de Almeida et al. (2007) incluíram um grupo tratado apenas com azul de metileno e concluíram que essa terapia não foi capaz de minimizar os efeitos da microbiota presente nas áreas com ligaduras.

A efetividade da PDT na redução de periodontopatógenos foi confirmada por estudos em animais (Sigusch et al., 2005; de Almeida et al., 2007), que demonstraram a penetração do corante no tecido epitelial sem provocar ulceração e inflamação do tecido conjuntivo, indicando a segurança do método para os tecidos (Komerik et al., 2006).

Terapia Fotodinâmica e a avaliação de mediadores inflamatórios

O laser de baixa potência é utilizado mais comumente em processos fotobiológicos (Karu et al., 1999), nos quais os eventos desencadeados resultam na melhora do metabolismo, síntese de colágeno, aumento na atividade de leucócitos e liberação de fatores de crescimento, acelerando dessa forma a reparação dos tecidos (Schindl et al., 2002; Damante et al., 2009). Woodruff et al. (2004) por meio de uma meta-análise, confirmaram o papel da biomodulação dos tecidos pelo laser de baixa potência ao demonstrarem que o mesmo é capaz de acelerar a proliferação de fibroblastos gengivais e a diminuição da inflamação local.

A aplicação do laser no campo da periodontia tem recebido grande interesse científico ao longo das últimas décadas. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* avaliaram o

laser em baixa intensidade como adjunto à terapia periodontal convencional, sugerindo que os lasers podem contribuir com a diminuição da inflamação e redução bacteriana nas bolsas periodontais. Portanto, a terapia com laser de baixa potência constitui em uma das abordagens utilizadas na tentativa de modular a inflamação, visando o controle da doença instalada (Sakurai et al., 2000; Schwarz et al., 2003; Quadri et al., 2005; Haypek et al., 2006; Ishikawa et al., 2009).

A fototerapia é muito pesquisada também para a cicatrização de feridas. Para a cicatrização de feridas periodontais são necessárias interações complexas entre células dentro do periodonto, incluindo fibroblastos e osteoblastos. Segundo Hakki e Bourzoukt (2012) durante a aplicação do laser sobre o tecido periodontal existe uma interação da luz com os fibroblastos. Os efeitos positivos da fototerapia sobre o processo de cicatrização de feridas podem estar relacionados com a indução da proliferação de células, síntese de proteínas e liberação de fatores de crescimento (Kreisler et al., 2002; Pourzarandian et al., 2005). Os fatores de crescimento desempenham um papel essencial nas atividades biológicas, como proliferação, diferenciação e apoptose (Hakki;Bozkurt, 2012).

As células epiteliais desempenham um papel importante nos eventos reparativos, pois elas são responsáveis por estimular os tecidos conjuntivo e epitelial pela expressão de fatores de crescimento (Basso et al., 2013). O fator de crescimento específico do endotélio (VEGF) promove a proliferação e a diferenciação de células endoteliais e também induz a hiper-permeabilidade microvascular e a remodelação da matriz. Dessa maneira, o VEGF promove um papel importante na angiogênese, inflamação e cicatrização de feridas (Hakki; Bozkurt, 2012). O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) está envolvido na transmissão de sinais entre epitélio e conjuntivo e influencia o crescimento e diferenciação epitelial, além de promover quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células reparadoras, pelo estímulo de fibroblastos e células endoteliais (Lynch, 1994; Webb et al., 1998).

Saygun et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se a irradiação com o laser de baixa potência poderia aumentar a produção de FGF e IGF-1(fator de crescimento semelhante a insulina), a partir de fibroblastos gengivais humanos. No total foram 30 amostras, divididas em três grupos: grupo de dose única (685nm, 2J/cm²), grupo com mesma dose por dois dias consecutivos e grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos

irradiados, entretanto em ambos os grupos laser houve um grande aumento da proliferação de células.

Diversos estudos na literatura tem relatado que a terapia periodontal associada ao laser de baixa potência pode acelerar a cicatrização de feridas periodontais (Sakurai et al., 2000; Amorim et al., 2006).

Vários estudos investigaram a ação do laser de baixa potência na produção de PGE₂, um estimulador da inflamação e reabsorção óssea por fibroblastos da gengiva de humanos *in vitro* e *in vivo*, e foi sugerido que o laser de baixa potência inibe a sua produção (Sakurai et al., 2000). Ainda, Shimizu et al. (2007) irradiaram fibroblastos humanos do ligamento periodontal, células responsáveis pela produção de colágeno com um papel importante na regeneração periodontal, e demonstraram que o laser inibiu significativamente a produção de prostaglandina E₂ e IL-1 β . Tem sido sugerido também que o uso do laser de baixa potência, após a raspagem e alisamento radicular, reduz a expressão de MMP-8 e a síntese de PGE-2 frente à presença de estímulo bacteriano (Ohlrich et al., 2009).

Qadri et al. (2005), em um ensaio clínico do tipo boca-dividida, avaliaram os efeitos da irradiação do laser de baixa potência no tratamento adjuvante da doença periodontal. Todos os pacientes foram submetidos à raspagem e alisamento radicular. Uma semana após a terapia, foi realizada coleta do fluido gengival nas bolsas periodontais e na semana seguinte foi iniciada a terapia com laser uma vez por semana, durante seis semanas. Um hemi-arco foi irradiado com o laser e o outro com placebo. Uma semana após a última sessão de laser foi feita nova coleta do fluido gengival. O grupo teste apresentou menor volume de fluido gengival e menor valor de MMP-8, o que leva a concluir que o laser reduziu os padrões inflamatórios nesses pacientes.

Pejcic et al. (2010) realizaram um ensaio clínico para avaliar os efeitos da irradiação do laser de baixa potência sobre o tratamento periodontal. Trinta pacientes foram submetidos à raspagem e alisamento radicular, uma semana após a conclusão dos procedimentos básicos. O grupo teste foi submetido à irradiação com laser de baixa potência nas bolsas periodontais residuais, todos os dias durante dez dias. Todos os pacientes do grupo teste foram examinados antes e após o tratamento conservador e com o laser e os pacientes do grupo controle foram examinados antes e após a terapia conservadora. Todos os pacientes foram reavaliados durante um, três e seis meses. Os resultados do estudo nos leva a

concluir que o grupo teste apresentou uma diminuição constante dos índices avaliados, demonstrando uma significativa redução da inflamação gengival nos pacientes irradiados.

O papel biomodulador do laser de baixa potência nos tecidos periodontais está consagrado na literatura. No entanto, há poucas informações sobre o efeito da PDT na modulação imunológica por meio da análise dos biomarcadores inflamatórios após o tratamento periodontal (Kolbe et al., 2014).

Braham et al. (2009), em um estudo *in vitro*, demonstraram o potencial da PDT em inativar as citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α . Esses resultados não foram confirmados mais tarde por Sorkhdini et al.(2013) em um estudo em cães, no qual avaliaram as mesmas citocinas inflamatórias por meio de um modelo de estudo de indução da doença periodontal com ligadura de seda nos dentes superiores e inferiores. Também em um estudo em animais, Garcia et al.(2013) demonstraram que a PDT foi capaz de reduzir os níveis de RANKL e OPG em ratos com periodontite induzida.

Com o objetivo de comparar os efeitos biológicos locais da PDT e da terapia periodontal convencional em bolsas residuais, Giannpoulou et al.(2012) realizaram um estudo clínico em 32 pacientes com periodontite crônica. Todos os pacientes incluídos no estudo tinham histórico de tratamento periodontal convencional prévio, com sítios com profundidade clínica de sondagem ≥ 4 mm e sangramento à sondagem na reavaliação. Todos os sítios residuais passaram por debridamento mecânico com ultrassom e em seguida, os pacientes foram alocados em grupo teste (PDT) e grupo controle. O fluido gengival foi coletado antes do tratamento, quatorze dias, dois e seis meses após a intervenção de todos os pacientes. Foram avaliados 22 diferentes biomarcadores, entretanto a PDT não demonstrou nenhum benefício adicional.

Luchesi et al. (2013) em um estudo do tipo boca-dividida, avaliaram os efeitos imunológicos da terapia fotodinâmica como co-adjuvante à terapia mecânica em pacientes com lesões de furca classe II. Observou-se uma diminuição dos níveis de GM-CSF, IL-8, e IL-6 no grupo PDT aos três meses e aos seis meses. Apenas a IL - 1 β se manteve em níveis mais baixos quando comparado ao grupo controle, entretanto, no estudo de Oliveira et al.(2009) em pacientes com periodontite agressiva, tanto a raspagem quanto a PDT resultaram em efeitos similares quantos aos níveis de TNF- α e RANKL.

Franco et al. (2014) em um ensaio clínico do tipo boca-dividida comparou o tratamento periodontal convencional e o tratamento periodontal convencional seguido da PDT em quinze pacientes com periodontite severa, para os níveis clínicos e imunológicos por um período de três meses. A utilização da PDT em conjunto com o tratamento periodontal convencional demonstrou ter um papel superior para a FGF e RANKL.

Diante dos estudos clínicos presentes na literatura até o momento, observa-se que ainda não existe evidência suficiente sobre a eficácia da aplicação da PDT como coadjuvante ao tratamento da periodontite crônica, analisados em longo período por dados imunológicos com métodos quantitativos reprodutíveis.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a terapia fotodinâmica como complemento ao tratamento periodontal não cirúrgico de bolsas periodontais residuais de pacientes em manutenção periodontal, por meio da avaliação de mediadores inflamatórios, durante 12 meses de acompanhamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Este estudo fez parte de um ensaio clínico aleatório controlado duplo-cego paralelo, no qual teve como desfecho principal a análise dos dados clínicos dos pacientes incluídos. Portanto, o cálculo amostral foi realizado considerando-se clinicamente relevante uma diferença entre os grupos de 1,0 mm no Nível Clínico de Inserção (NCI). Utilizando um poder de 90% para detectar essa diferença e um nível de significância de 5%, seriam necessários 17 sujeitos por grupo. Considerando uma perda no acompanhamento dos pacientes de 10%, foram recrutados 19 indivíduos por grupo.

Os sujeitos da pesquisa foram incluídos consecutivamente de acordo com os critérios de inclusão e exclusão e em seguida, pareados por sexo, idade e média de profundidade clínica de sondagem após a reavaliação. Estes indivíduos procuraram atendimento odontológico nas clínicas da Disciplina de Periodontia da FOUSP.

Critérios de inclusão

- Portadores de Periodontite Crônica Generalizada Severa– presença de perda de inserção proximal ≥ 5 mm em mais de 30% dos dentes presentes (Tonetti;Claffey, 2005). Além disso, o indivíduo deveria apresentar pelo menos 2 sítios com PCS > 7 mm antes do tratamento periodontal;
- Presença de pelo menos 10 dentes na cavidade oral;
- Idade entre 35 e 75 anos;

- Presença de pelo menos quatro sítios com profundidade clínica de sondagem (PCS) ≥ 4 mm, e pelo menos um sítio com PCS ≥ 5 mm, com ou sem sangramento à sondagem após a reavaliação (06 semanas);
- Índice de placa $\leq 30\%$ na reavaliação.

Critérios de exclusão

- Necessidade de antibioticoterapia profilática;
- Uso de medicação que interferisse na reparação dos tecidos periodontais, descritos na literatura;
- Uso de contraceptivo hormonal ou reposição hormonal;
- Pacientes diabéticos, fumantes, imunodeprimidos, gestantes ou lactantes;
- Tratamento periodontal prévio e/ou uso de antibiótico, nos últimos 6 meses;
- Presença de discrepâncias oclusais severas e/ou uso de aparelhos ortodônticos;
- Dentes pilares ou retentores de próteses, dentes com mobilidade grau II e III, dentes com lesão endodôntica, dentes com lesão de furca na reavaliação.

4.2 Aspectos Éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FOUSP (protocolo 211/2008), anexos B e C e obteve apoio de auxílio à pesquisa da FAPESP (apêndice E). Os indivíduos que participaram deste estudo leram, entenderam e assinaram o termo de consentimento livre-esclarecido aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FOUSP (Apêndice A) e em seguida, após uma anamnese completa (Apêndice B) foram encaminhados para a realização de exame radiográfico.

4.3 Coleta de dados clínicos

Foram analisados os seguintes parâmetros clínicos: índice de placa visível (IPV) (Ainamo; Bay, 1975), índice de sangramento à sondagem (IS) (Greenstein et al., 1981), profundidade clínica de sondagem (PCS) (Glavind; Løe, 1967) e nível clínico de inserção (NCI) (Glavind; Løe, 1967). Para a mensuração dos parâmetros clínicos, uma sonda computadorizada de pressão controlada (Florida Probe System®, Florida Probe Corporation – Gainesville, FL, EUA) foi utilizada por um examinador treinado e calibrado para uma maior precisão na obtenção dos dados clínicos. (Apêndice C). Na calibração os pacientes foram reexaminados para as variáveis PCS e NCI, com um intervalo de uma semana entre os dois exames. A reprodutibilidade dos exames foi verificada por meio do coeficiente de correlação intra-classe para as variáveis contínuas (PCS e NCI) e pelo coeficiente kappa, apresentando 82% e 90% respectivamente de reprodutibilidade (Figura 4.1).

4.4 Coleta do fluido gengival

O exame imunológico foi realizado a partir das amostras de fluido gengival das bolsas periodontais dos sítios experimentais. Para a coleta do fluido gengival, foi feita a remoção da placa supragengival com uma cureta periodontal e os sítios foram isolados com rolos de algodão estéreis e um sugador de saliva para diminuir o risco de contaminação salivar. Os dentes foram delicadamente secos com jato de ar por dez segundos e em seguida, uma tira de papel absorvente (Periopaper Collection Strip; Oraflow, Plainview, NY, EUA), foi introduzida na bolsa periodontal, onde permaneceu por 30 segundos (Figura 4.2). Amostras visivelmente contaminadas com sangue foram descartadas e o volume do fluido gengival foi determinado utilizando-se um aparelho apropriado (Periotron 6000, IDE Interstate, Amityville, NY) e calculado em µl, por meio de uma curva-padrão pré-estabelecida.

Logo após, as tiras de papel foram colocados em “poll” em microtubos estéreis codificados de acordo com cada paciente, e colocados cuidadosamente em

gelo seco durante a coleta e transporte e em seguida armazenados em biofreezer a -80°C até a análise das amostras.

Figura 4.1- Coleta dos dados clínicos com a Flórida Probe

Figura 4.2- Coleta do fluido gengival

4.5 Protocolo de tratamento

A anamnese completa e encaminhamento para o exame radiográfico (14 radiografias periapicais) foram feitos após a primeira inclusão dos sujeitos na pesquisa. A coleta dos dados clínicos (IPV, IS, PCS, NCI) foi realizada e registrada sob a forma de periograma completo com o programa Florida Probe System®. Subsequentemente foi realizado o tratamento periodontal não-cirúrgico que consistiu de acordo com o seguinte protocolo clínico:

- 1) Raspagem preliminar: realizada uma sessão de raspagem supra e subgengival preliminar em todos os dentes com aparelho de ultrassom (Mini-Piezon – SEM, Suíça).
- 2) Orientação de higiene bucal: realizada com auxílio de um espelho de mão, quando a técnica de Bass foi instruída ao paciente com o uso de uma escova convencional macia, fornecida ao paciente nesta consulta. Escovas interdentais,

escovas de tufo e fio dental também fornecidos e o paciente foi orientado a utilizá-los diariamente de maneira individualizada para cada região. A instrução de higiene e motivação foi realizada a cada sessão ao longo do tratamento periodontal.

3) Remoção de fatores retentivos de placa: excessos cervicais de material restaurador foram removidos com brocas em alta rotação ou tiras de lixa, cavidades de cárie foram seladas com material restaurador provisório, dentes condenados foram extraídos.

4) Raspagem subgengival: feita em quatro ou seis sessões (uma para cada quadrante ou sextante) com raspadores manuais (curetas Gracey 5-6, 11-12, 13-14 e Gracey mini-five) (Hu-Friedy – Chicago, IL, USA) e o mesmo aparelho de ultrassom com pontas próprias para áreas subgengivais (pontas SEM[®]: DS-011^a, DS-16^a, DS-003^a, DS-011^a) sob anestesia local, por dois especialistas em periodontia, até que fossem obtidas superfícies dentais livres de cálculo.

5) Revisão: sessão para a revisão da raspagem subgengival, com o objetivo de eliminar o cálculo residual e realizar controle de placa supra e subgengival de todos os sítios.

4.6 Reavaliação do Tratamento Periodontal

A reavaliação foi realizada seis semanas após o término do tratamento (Segelnick; Weinberg, 2006), e novo exame periodontal completo foi realizado. Foram considerados sítios experimentais aqueles que apresentaram, na reavaliação, profundidade clínica de sondagem (PCS) ≥ 4 mm. Indivíduos que apresentaram pelo menos um sítio com PCS ≥ 5 mm, dentre pelo menos quatro sítios com PCS ≥ 4 mm após a reavaliação permaneceram no estudo para receber os procedimentos experimentais (Tonetti et al., 2012). Os indivíduos que não preencheram os critérios de elegibilidade acima descritos nesta fase do estudo não puderam participar da fase experimental e foram encaminhados conforme as suas necessidades individuais.

Os sujeitos foram aleatoriamente alocados para grupo teste ou controle, de acordo com uma sequência aleatória gerada pelo computador. O sigilo de alocação

foi obtido através do uso de envelopes opacos selados. Os envelopes numerados continham no seu interior uma ficha informando para qual grupo o indivíduo seria alocado. Os envelopes foram abertos sequencialmente, pelo pesquisador responsável pelo procedimento experimental. Este não sabia para qual grupo o próximo paciente seria alocado até a abertura do próximo envelope. A sequência aleatória e o sigilo de alocação nos envelopes foram realizados por um estatístico independente.

A primeira coleta do fluido gengival dos quatro sítios selecionados foi feita previamente ao procedimento experimental.

4.7 Procedimento Experimental

Os pacientes foram alocados em dois grupos (teste ou controle). Os sítios de dentes pertencentes aos pacientes do grupo teste foram submetidos à PDT. Após o isolamento relativo com roletes de algodão, a fotossensibilização ocorreu através da irrigação subgengival em toda extensão do dente, por meio de seringa descartável, do fundo da bolsa a margem gengival, com 1 mL do fotossensibilizador azul de metileno a 0,01% (Chimiolux®, Hypofarma, Belo Horizonte, MG, Brasil), o qual atuou por cinco minutos. (tempo pré-irradiação, de acordo com o fabricante). O excesso de corante extravasado foi lavado com água (Figura 4.3).

Figura 4.3 – O fotossensibilizador é dispensado na bolsa periodontal

Figura 4.4 – Irradiação com o laser

A irradiação ocorreu logo após a introdução da fibra óptica (200 µm de diâmetro) no interior da bolsa periodontal, previamente demarcada com o comprimento da PCS do sítio e com movimentos de apical para cervical. O aparelho de laser diodo (Laser Hand® – MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm, foi utilizado na potência máxima 40 mW, por 90 s, com dose de 90 J/cm² (Figura 4.4)

Os sítios dos dentes dos pacientes do grupo controle receberam irrigação subgengival em mesmo volume e pelo mesmo tempo, porém com solução salina. A ponta ativa do aparelho de laser foi posicionada da mesma maneira, pelo mesmo tempo, angulação e movimentos utilizados no grupo teste, contudo sem ativação do aparelho (procedimento *sham*). O medidor de energia Laser Check® (Coherent Molelectron Portland, EUA) foi utilizado antes de cada irradiação, com o intuito de padronizar a energia aplicada nos sítios estudados.

4.8 Procedimento de coleta duplo-cego

Um pesquisador foi responsável pela inclusão dos pacientes e coleta dos dados clínicos, outro pesquisador foi responsável pela coleta imunológica e processamento das amostras. Outros dois investigadores realizaram o tratamento e manutenção periodontal e por fim, outro pesquisador foi responsável pelo sorteio e alocação aleatória dos indivíduos nos grupos experimentais e pelo procedimento experimental. Portanto, os pacientes e o examinador estavam cegos para a intervenção.

4.9 Avaliação após tratamento - curto prazo

Após uma semana do procedimento experimental, foi realizada a segunda coleta de fluido gengival dos sítios experimentais. Essa avaliação imunológica teve como objetivo comparar os níveis de fatores pró-inflamatórios antes e após o procedimento experimental.

4.10 Acompanhamento e avaliação após tratamento - longo prazo

Além da avaliação em curto prazo, os pacientes passaram pelo procedimento experimental aos três, seis, nove e doze meses, seguindo pela manutenção periodontal, sendo que a coleta imunológica foi realizada aos três e doze meses.

Os indivíduos tiveram manutenção periodontal a cada três meses, durante doze meses. Foram realizados procedimentos de controle de placa supragengival, por meio de raspagem e polimento com taça de borracha e pasta profilática em todos os sítios da cavidade bucal e orientação de higiene bucal (AAP, 1998). Se um sítio apresentasse perda de inserção adicional maior que dois mm, este seria excluído da análise.

As sequências dos procedimentos clínicos estão resumidamente apresentadas no fluxograma (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Fluxograma

4.11 Percepção de efeitos adversos

Através de um questionário de efeitos adversos (Apêndice D), os indivíduos julgaram o nível de desconforto do tratamento, desconforto ao mastigar, edema e dor – escala visual analógica (EVA) de 0 a 10 – 100 mm, durante as consultas de avaliação clínica e coleta de dados (Tomasi et al., 2008; Cappuyns et al., 2012). A cada visita, um dos investigadores realizou um exame intra-oral para verificar a incidência de lesões ou eventos adversos, na cavidade bucal dos participantes. Os participantes também foram arguidos a respeito de possíveis sintomas.

4.11 Análise dos mediadores inflamatórios

As amostras de fluido gengival foram analisadas no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB 4 da Universidade de São Paulo.

4.12 Extração do fluido gengival das amostras

Para cada *pool* (quatro sítios coletados de cada paciente) foram adicionados 300 μ L de solução salina tampão fosfato (PBS). Em seguida, foi realizada agitação vigorosa por três vezes consecutivas, durante 30 segundos a cada tubo. Os periopapers foram removidos e as amostras centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C (Eppendorf, 5417R, EUA), subsequentemente o sobrenadante foi removido e as amostras congeladas a - 80°C até o processamento das mesmas.

4.13 Análise do Fluido Gengival pelo método Luminex

Para análise do fluido gengival foi utilizado o kit *Luminex Performance Assay – Human Cytokine Premixed Kit A* (R&D Systems, Minneapolis, Minn). Foram analisados os seguintes mediadores inflamatórios: IL-1 β , IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-4, IL-1 γ , TNF- α , VEGF, IFN- γ e FGF. O ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante.

O fundo da placa de 96 poços com filtro foi molhado com a solução tampão de lavagem (R&D Systems), a solução foi aspirada dos poços usando uma sucção a vácuo (Millipore Corporation, Billerica, MA). Após a retirada do tampão, foram adicionadas esferas conjugadas com anticorpos anti-citocinas (R&D Systems), seguidas de duas lavagens com tampão de lavagem. Posteriormente, 50 μ L da solução do fluido gengival e padrões (curva padrão e branco) foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por uma noite à 4°C, sob agitação.

Novamente a placa foi lavada com a solução tampão de lavagem e foram adicionados 50 μ L da solução de anticorpo de detecção biotilado (R&D Systems) a cada poço à placa que foi incubada por 1h sob agitação. Após esse período, novas lavagens com a solução tampão de lavagem foram realizadas e foram adicionados 50 μ L da solução de estreptavidina conjugada com PE (R&D Systems), a placa que foi incubada por 30 minutos sob agitação. Novas lavagens foram realizadas com a solução tampão de lavagem e o complexo de anticorpos. Citocinas e esferas foram ressuspensas com 100 μ L de tampão de ensaio por poço (R&D Systems).

As placas foram analisadas em duplicata no Bioplex 200 Suspension Array System/ Luminex (BioRad, Hercules, CA) por meio do Software Bio-Plex Manager, versão 6.0 (BioRad, Hercules, CA). Os parâmetros para a corrida do kit para citocinas humanas foram ajustadas para fator baixo do fotomultiplicador durante a calibração, 50 esferas por região mensuradas em 100 μ L de volume da amostra. Baseado na curva padrão foi determinado os níveis de citocinas encontrados nos soros e no fluido gengival de cada paciente.

4.13 Análise estatística

O nível médio de cada biomarcador no fluido gengival foi calculado pela média entre os indivíduos por *poll*, a cada tempo experimental em cada grupo separadamente. Os dados obtidos foram computados e submetidos à análise estatística utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Foram calculadas as médias dos grupos teste e controle.

O teste t de Student foi utilizado para verificar se havia diferença significativa entre os grupos, para a análise ao longo do tempo e para as variáveis PCS e NCI e também para cada biomarcador no fluido gengival, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Foi utilizado o teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas.

A comparação entre os grupos teste e controle, em relação ao questionário de efeitos adversos (EVA) foi feita pelo teste t de Student.

Todos os testes foram realizados considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Entre abril de 2010 a agosto de 2012 foram examinados 483 voluntários que compareceram a clínica odontológica da disciplina de Periodontia da FOU SP para o exame de triagem. Destes, 86 indivíduos foram recrutados para o tratamento periodontal não-cirúrgico (primeira etapa do estudo) de acordo com os critérios de elegibilidade. Após o tratamento periodontal, 48 sujeitos foram excluídos para a segunda etapa do estudo, por não apresentarem de acordo com os critérios de inclusão, bolsas residuais elegíveis para o procedimento experimental. Dessa maneira, durante a reavaliação foram incluídos 38 pacientes aleatoriamente nos grupos PDT e controle e em seguida, estes foram pareados em sexo, idade e média de profundidade clínica de sondagem, o que resultou na participação de 28 sujeitos, 14 no grupo teste e 14 no grupo controle (Figura 5.1).

Figura 5.1- Diagrama representativo do recrutamento e acompanhamento dos indivíduos

5.1 Características clínicas dos sítios dos indivíduos do estudo

Os indivíduos do grupo teste e controle foram pareados de acordo com idade, sexo e pela diferença máxima de 0,25 mm na média da PCS dos quatros sítios experimentais. De acordo com a tabela 5.2 não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo PDT e o grupo controle em relação à média de idade.

A tabela 5.2 mostra que o tratamento periodontal promoveu redução de PCS e ganho clínico de inserção nos dois grupos em relação ao início. As alterações nos dois grupos foram significativas ao longo do tempo, porém não houve diferença entre os grupos para esses dois parâmetros.

Tabela 5.2 - Dados demográficos e características clínicas dos pacientes dos grupos teste e controle antes do tratamento periodontal e no início do estudo.

Variáveis	Grupo Teste	Grupo Controle	
N	14	14	
Mulheres	7	7	
Idade (anos)	49±9,6	50±7,9	
30-39 (N)	2	2	
40-49 (N)	5	5	
50-59 (N)	5	5	
60-69 (N)	2	2	
Parâmetros periodontais	Teste	Controle	P
PCS (mm)	4,69±0,11	4,71±0,11	>0,05
NCL (mm)	5,54±0,24	5,5±0,30	>0,05
IPV (%)	54,21±23,50	47,11±27,82	>0,05
IS (%)	45,42 ±23,07	37,63±23,40	>0,05

A tabela 5.3 mostra que os dois grupos apresentaram uma redução da profundidade clínica de sondagem, ganho clínico de inserção, redução no índice de placa e redução no número de sítios com sangramento a sondagem. Não houve diferença entre os grupos para qualquer parâmetro, entretanto todos os parâmetros apresentaram alterações significativamente positivas quando comparadas ao início do estudo.

Tabela 5.3 - Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS e NCI (sítios experimentais)

Parâmetros clínicos	Grupos	Início Média/DP	3 meses Média/DP	12 meses Média/DP	P (Anova)
PCS (mm)	PDT	4,69 ± 0,11	3,58 ± 0,22 ^a	3,62 ± 0,26	>0,05
	Controle	4,71 ± 0,11	3,19 ± 0,19 ^a	3,25 ± 0,26 ^{a,b}	
NCI (mm)	PDT	5,54 ± 0,24	4,5 ± 0,34	4,61 ± 0,30	>0,05
	Controle	5,5 ± 0,30	4,09 ± 0,34 ^a	3,94 ± 0,32 ^a	
IS (%)	PDT	53,5 ± 26,02	17,8 ± 16,5 ^a	17,85 ± 15,3 ^a	>0,05
	Controle	44,6 ± 16,83	17,8 ± 16,5 ^a	16,07 ± 14,36 ^a	
IP (%)	PDT	17,85 ± 3,42	10,71 ± 6,83 ^a	12,5 ± 4,2 ^a	>0,05
	Controle	14,28 ± 3,44	10,51 ± 3,77 ^a	5,35 ± 3,94 ^a	

a - diferença estatística em relação a inicial ($p < 0,01$)

b - diferença estatística em relação a 7 dias ($p < 0,001$)

5.2 Análise dos níveis dos marcadores inflamatórios

A análise dos níveis da IL-1 α demonstrou que o grupo controle apresentou um aumento progressivo dos seus níveis até os três meses, apresentando uma diferença estatisticamente significativa em relação ao início e sete dias seguindo de uma redução, enquanto que o grupo teste se manteve sempre em equilíbrio quando comparado a análise inicial, devido a essa diferença no comportamento desta interleucina, houve diferença entre os grupos aos sete dias ($p=0,03$), três meses ($p=0,03$) e doze meses ($p=0,02$). (Anexo A).

Figura 5.4 – Níveis de IL-1 α (pg/μl) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle. Início, 7 dias, 3 meses e 12 meses. Dados expressos em média $\pm$ DP; a - $p<0,01$ comparados aos valores do início do estudo; b - $p<0,05$ comparados aos valores dos 7 dias; c- $p <0,05$ comparados aos valores dos 3 meses

A análise da IL-1 β demonstrou que o grupo controle apresentou um aumento progressivo dos níveis desta citocina durante todos os tempos experimentais, o mesmo não foi observado no grupo teste. Aos doze meses, o grupo controle apresentou maiores níveis desta citocina quando comparados com o início do estudo e sete dias, enquanto que o grupo teste conseguiu se manter em estabilidade quando comparado a análise inicial. Dessa maneira, observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos aos três meses ($p= 0,04$) e doze meses ($p= 0,03$).

Figura 5.5 – Níveis de IL-1 β (pg/ μ l) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle. Início, 7 dias, 3 meses e 12 meses. Dados expressos em média $\pm$ DP; a - $p<0,001$ comparados aos valores do início do estudo b - $p<0,001$ comparados ao valor dos 7 dias

No início do estudo, bolsas residuais de pacientes de ambos os grupos experimentais apresentavam níveis semelhantes de IL-8 presentes no fluido gengival. Após sete dias do tratamento experimental sítios que receberam a PDT demonstraram uma leve redução nos níveis dessa citocina, redução esta que passou a ser significativa ($p=0,04$) após três meses, quando comparada ao grupo controle (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Níveis da IL-8 (pg/μl) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle. Início, 07 dias, 03 meses e 12 meses. Dados expressos em média $\pm$ DP; * $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo controle

Com relação aos níveis de TNF- α , a análise do fluido gengival revelou não haver diferença entre os grupos em qualquer momento do estudo ($p > 0,05$).

Figura 5.7 – Níveis de TNF- α (pg/μl) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle. Início, 7 dias, 3 e 12 meses após o tratamento. Dados expressos em média $\pm$ DP

No início do estudo não foi observada uma detecção significativa em relação aos níveis da IFN- γ no fluido gengival dos pacientes de ambos os grupos. Nos tempos experimentais seguintes, foi encontrada uma significativa ($p < 0,001$) presença dessa citocina em relação ao início do estudo, porem sem diferença ($p > 0,05$) entre os grupos PDT e controle.

Figura 5.8 – Níveis de IFN- γ (pg/μl) no FG dos pacientes do grupo PDT e controle no início, 7 dias, 3 e 12 meses após o tratamento. Dados expressos em média $\pm$ DP; a - $p < 0,001$ comparados aos valores do início do estudo.

Para a análise da IL-4, durante todos os períodos experimentais os dois grupos não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$).

Figura 5.9 – Níveis de IL-4 (pg/μl) no FG dos pacientes do grupo PDT e controle no início, 7 dias, 3 e 12 meses após o tratamento. Dados expressos em média $\pm$ DP

A análise da figura 5.10 sugere que a terapia fotodinâmica promoveu um aumento dos níveis da IL-10 aos três meses quando comparados ao início e sete dias, esse mesmo aumento não se observou no grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 5.10 – Níveis de IL-10 (pg/μl) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle. Início, 7 dias, 3 meses e 12 meses. Dados expressos em média $\pm$ DP; a - $p < 0,001$ comparados aos valores do início do estudo; b - $p < 0,01$ comparados aos valores dos 7 dias

A partir da análise da figura 5.11, nota-se que ao longo dos períodos experimentais os grupos PDT e controle apresentaram uma redução significativa dos níveis da IL-1ra em relação ao período inicial (P), entretanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ao longo do estudo(p).

Figura 5.11– Níveis de IL-1ra (pg/μl) no FG dos pacientes do grupo PDT e controle. Início, 7 dias, 3 meses e 12 meses. Dados expressos em média $\pm$ DP; a- $p < 0,05$ comparados aos valores do início do estudo

Para os níveis de FGF, o grupo PDT apresentou um aumento progressivo no fluido gengival até os três meses de terapia, seguindo com uma queda aos 12 meses. O grupo controle apresentou um aumento progressivo dos seus níveis até os 12 meses, entretanto não houve diferença significativa entre eles em qualquer momento.

Figura 5.12– Níveis da FGF (pg/μl) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle. Início, 7 dias, 3 meses e 12 meses. Dados expressos em média $\pm$ DP; $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo controle

Aos sete dias do procedimento experimental, a PDT promoveu um aumento estatisticamente significativo ($p=0,04$) dos níveis de VEGF no grupo teste. Nos períodos experimentais de três e doze meses não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 5.13 – Níveis de VEGF (pg/μl) no fluido gengival dos pacientes PDT e controle. Início, 7 dias, 3 e 12 meses após o tratamento. Dados expressos em média $\pm$ DP; *- $p < 0,05$ comparados aos valores do grupo controle

5.3 Avaliação dos efeitos adversos

EVA	Início	7 dias	3 meses	6 meses	9 meses
PDT	1,47 ± 1,84	0,47 ± 1,26	1,11 ± 1,17	0,92 ± 1,30	4,36 ± 0,54
Controle	1,00 ± 1,49	0,13 ± 0,47	0,45 ± 0,64	0,69 ± 0,77	0,62 ± 1,01
P (Teste t)	>0,05	>0,05	0,04*	>0,05	>0,05

Tabela 5.14 – Escala visual analógica para percepção dos efeitos adversos. Dados expressos em média ± DP; * P < 0,05

Para a análise dos questionários dos efeitos adversos realizados durante as consultas, observou-se que aos três meses do estudo o grupo que recebeu a intervenção apresentou um maior desconforto ao procedimento experimental quando comparado ao grupo controle (P = 0,04) (Tabela 5.14).

6 DISCUSSÃO

Atualmente a PDT é considerada uma abordagem terapêutica adjuvante e promissora para o tratamento periodontal (Braun et al., 2008; Campos et al., 2013). No entanto, a literatura dispõe de poucos dados sobre o papel da PDT na modulação da resposta inflamatória em pacientes com doença periodontal (Kolbe et al., 2014). Dessa maneira, o presente estudo se propôs a avaliar a PDT como terapia complementar ao tratamento de bolsas periodontais residuais de pacientes em manutenção periodontal, através da avaliação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento os quais estão associados respectivamente a presença e cicatrização da doença periodontal.

Ao analisar a PCS nos sítios experimentais, durante os períodos de avaliações, observou-se um comportamento semelhante entre o grupo teste e o grupo controle, é importante ressaltar que os dois grupos apresentaram benefícios em relação ao início do estudo, entretanto apenas o grupo controle apresentou uma redução significativa estatisticamente aos 12 meses de estudo quando comparado aos 3 meses, apesar do uso da Florida Probe ter ajudado a detectar a diferença intra-grupos, essa diferença não é relevante clinicamente (Neto et al., 2001). A Florida Probe foi utilizada com o intuito de padronizar a força durante as sondagens e dessa forma, possibilitar um exame periodontal com maior acurácia (Sild et al., 1987). Em relação ao NCI, o grupo controle obteve diferenças intra-grupos e ambos os grupos obtiveram ganho de inserção aos três meses e doze meses quando comparados ao início do estudo. Para a análise do índice de sangramento e do índice de placa, pode-se perceber que embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos para ambos os índices, o grupo PDT apresentou um resultado mais favorável quando comparado ao grupo controle. Esses resultados mostram que tanto a raspagem quanto a PDT, trouxeram benefícios clínicos adicionais no tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal.

De acordo com (Zhong et al., 2007; Tabibzadeh et al., 2008) os diferentes parâmetros clínicos (profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção, índice de sangramento e índice de placa) apresentam variações compatíveis com a severidade e a extensão da doença periodontal, portanto cada indivíduo apresenta

normalmente diferentes níveis de biomarcadores inflamatórios (Zhong et al., 2007; Tabibzadeh et al., 2011). Dessa maneira, para equalizar esses fatores, os indivíduos nos grupos teste e controle foram pareados de acordo com sexo, idade e PCS dos sítios experimentais antes da análise imunológica.

As citocinas IL-1 α e IL-1 β são conhecidas pelos seus efeitos pró-inflamatórios e sua capacidade de indução na reabsorção óssea (Van Dyke et al., 1993). De modo interessante, no presente estudo, observou-se que apenas o grupo controle apresentou um aumento progressivo dos níveis dessas citocinas até os 12 meses de seguimento. Este resultado pode ser comparado ao resultado encontrado por Lui et al. (2011), que apresentou uma maior redução da expressão da IL-1 β no fluido gengival nas análises de uma semana e um mês após aplicação da terapia no grupo teste e também ao resultado mostrado no estudo de Luchesi et al. (2013) o qual apontou para uma diminuição constante dos níveis da IL-1 β no grupo teste e uma tendência ao aumento no grupo controle. Esses achados podem ser justificados através de evidências na literatura que sugerem que a PDT leva ao aumento da atividade imunomoduladora dos tecidos, ao diminuir o estímulo dos linfócitos T e inativar importante marcadores pró-inflamatórios da doença periodontal consequentemente, gerando uma redução do número de células inflamatórias após terapia em pacientes com periodontite (Braham et al., 2009; Séguier et al., 2010).

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória que está presente em altos níveis no fluido gengival de pacientes com doença periodontal (Gamonal et al., 2000). Neste estudo, aos três meses do procedimento experimental, o grupo teste apresentou níveis reduzidos deste biomarcador quando comparado ao grupo controle. De modo semelhante, tanto o estudo de Luchesi et al. (2013) quanto Kolbe et al. (2014) apresentaram uma redução significativa dos níveis da IL-8 no grupo teste, aos três meses de seguimento. Interessantemente, ao utilizar a terapia fotodinâmica em um protocolo semelhante ao do presente estudo (660nm, 60 mW – fotossensibilizador azul de metileno 0,01%), Franco et al. (2014) não encontraram uma resposta positiva para essa interleucina na avaliação de 30 dias após a aplicação da PDT. A redução dos níveis de IL-8 obtidos neste estudo, bem como as descritas na literatura (Luchesi et al., 2013; Kolbe et al., 2014), podem estar relacionada à capacidade da PDT em modular a resposta do hospedeiro e influenciar as propriedades imunoestimuladoras de células apresentadoras de antígenos como proposto por Séguier et al. (2010).

O TNF- α é considerado um importante marcador da doença periodontal devido ao seu papel na destruição dos tecidos periodontais (Graves;Cochran, 2003). O presente estudo não apresentou diferenças significantes entre os grupos PDT e controle em nenhum momento experimental para esse mediador inflamatório. Os mesmos resultados foram obtidos por Sorkhdini et al. (2013) na sua avaliação de três semanas e três meses após a aplicação da PDT e por Oliveira et al. (2009) três meses após a aplicação da terapia em pacientes com periodontite agressiva. Por outro lado, Pourabbas et al. (2014), encontraram níveis significantemente reduzidos desta citocina no grupo controle três meses após a aplicação da PDT e ainda Andrade et al. (2009) , apresentaram uma diferença significativa dos níveis da referida citocina no grupo teste, trinta dias após a aplicação da PDT em bolsas residuais de pacientes com periodontite agressiva.

Níveis de IFN- γ não apresentaram diferença significativa entre os grupos PDT e controle, entretanto diferenças intra-grupos foram observadas nos dois grupos em relação ao início do estudo, onde quantidades ínfimas dessa citocina foram detectadas em ambos os grupos. Dessa maneira, nas análises subsequentes, ambos os grupos apresentaram diferenças significativas quando comparados ao início do estudo. Esses achados relacionados ao momento inicial do estudo não condizem com a relevância da presença do IFN- γ e sua associação com sítios periodontalmente comprometidos (Figueredo et al., 2008), uma vez que o equilíbrio da IFN- γ e da IL-4 está relacionado com o controle da inflamação periodontal (Tsai et al., 2007). Assim sendo, os nossos resultados em relação ao IFN- γ são confrontados pelo estudo de Giannopoulou et al. (2012) o qual apresentou níveis elevados de IFN- γ no início do estudo e uma redução significativa dos níveis desta citocina no grupo PDT aos dois meses de acompanhamento e ainda, o estudo da Luchesi et al. (2013), o qual demonstrou um aumento expressivo desse biomarcador apenas no grupo controle aos três meses de seguimento de estudo.

A IL-4 tem um papel bem estabelecido na modulação da doença periodontal como um potente regulador da função dos macrófagos e inibidor da secreção de algumas citocinas pró-inflamatórias (Te Velde et al., 1990). Além disso, este mediador inflamatório tem mostrado um papel importante na indução, produção e secreção de colágeno (Aoudjehane et al., 2008). No presente estudo, ambos os grupos não apresentaram alterações nos níveis da IL-4 ao longo do tempo. Esses resultados foram semelhantes aos achados de Andrade et al. (2013), o qual também

não apresentou diferenças entre os grupos na avaliação de 21 dias. Por outro lado, Luchesi et al. (2013) apresentaram um aumento significativo dos níveis de IL-4 nos grupos teste e controle aos seis meses após a intervenção.

Dados na literatura demonstram que a IL-10 tem um papel protetor importante na doença periodontal ao atenuar a resposta do hospedeiro, promovendo uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da atividade de células T (Gartel et al., 2004; Greggi et al., 2011). No presente estudo, o grupo que recebeu a PDT apresentou um aumento estatisticamente significativo dos níveis de IL-10 em relação ao início e sete dias após a intervenção, apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos. Os resultados relacionados a IL-10 no presente estudo são comparáveis aos resultados de Luchesi et al. (2013) na sua análise de seis meses, na qual o grupo PDT apresentou um aumento dos níveis de IL-10. Entretanto, diferem dos achados de Andrade et al. (2013) na sua avaliação após 21 dias e Franco et al. (2014) na análise de 30 dias.

A citocina IL-1ra atua regulando antagonicamente a IL-1. Dessa forma, existe uma correlação positiva entre a sua redução, a melhora dos parâmetros clínicos e o término do tratamento periodontal (Slotwinska et al., 2013). Ao avaliar os níveis da IL-1ra neste estudo, uma redução significativa foi observada nos dois grupos durante todos os tempos do estudo, quando comparados ao início. Este resultado difere ao encontrado por Giannopoulou et al. (2012), o qual não apresentou diferenças intra-grupos e entre grupos em nenhum momento do estudo.

Para também avaliar a influência da PDT na cicatrização da ferida periodontal, foram quantificados os biomarcadores FGF e VEGF. Os fatores de crescimento desempenham um papel crucial na reparação periodontal, ao mesmo tempo o uso do laser de baixa potência pelo seu caráter bioestimulador, pode estimular e acelerar esse processo. (Mester et al., 1971; Wahl et al., 1983). Diversos estudos na literatura *in vitro* ou em animais demonstram resultados positivos para o FGF e VEGF após o uso do laser de baixa potência (Corazza et al., 2007; Feng et al., 2012; Hakki et al., 2012; Basso et al., 2013; Szymanska et al., 2013).

O VEGF é um potente estimulador da angiogênese, sua produção é ativada em ambiente celular com pouca concentração de oxigênio, condição comum nos processos inflamatórios (Kipshidze et al., 2001). Outro fator importante é o FGF que promove quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células reparadoras, através do estímulo de fibroblastos e células endoteliais (Webb et al., 1998). Neste estudo,

apesar do aumento progressivo dos níveis de FGF no grupo teste, não foram obtidas alterações significativas intra-grupos e entre-grupos após a PDT, contrastando com os resultados de Saygun et al. (2008), no qual foram observados um aumento dos níveis de FGF nos grupos que receberam irradiação única e por dois dias seguidos, ambos com laser de baixa potência sem uso de corante, em relação ao grupo controle. No estudo de Franco et al. (2014) na análise de 30 dias após a aplicação da terapia, foi observado um aumento significativo dos níveis de FGF no grupo teste, sendo que todos os pacientes foram submetidos a quatro sessões da PDT com intervalos de sete dias.

Diversas investigações demonstraram que o laser de baixa potência pode aumentar a proliferação de fibroblastos (Marques et al., 2004; Damante et al., 2008; Saygun et al., 2008), no entanto, os resultados são conflitantes em relação ao número ideal de aplicações e os efeitos de uma dose única. Apesar de Kömerik et al. (2003), através de um estudo em cães, sugerirem que a PDT não seria a terapia mais adequada para o auxílio na cicatrização de feridas, no presente estudo, após sete dias da aplicação da PDT, o grupo teste apresentou um aumento significativo dos níveis de VEGF, gerando uma diferença significativa entre os grupos. Mesmo que essa diferença não tenha sido mantida ao longo do tempo, este achado indica que a PDT pode estimular a angiogênese e a cicatrização da ferida periodontal na fase inicial pós-raspagem, 60 dias após o tratamento periodontal não cirúrgico.

Disparidades entre resultados sobre o papel da terapia fotodinâmica quanto ao perfil mediador da inflamação são descritos por vários estudos (Oliveira et al., 2009; Marcacinni et al., 2010; Souza et al., 2013; Pourabbas et al., 2014), entretanto é importante ressaltar que, as condições clínicas como o tempo de atuação e concentração do fotossensibilizador nos tecidos, alteração do pH, presença de exsudato e fluido gengival no ambiente subgengival podem influenciar a eficácia da terapia (Wilson, 2004). Dessa maneira, a comparação entre os diversos estudos é dificultada pela vasta quantidade de protocolos de aplicação, como diversos parâmetros do laser, diferentes fotossensibilizadores e concentrações, e pelas variações nas condições clínicas periodontais e tratamentos periodontais empregados.

A escolha do aparelho de laser utilizado neste estudo foi baseada no sistema de entrega do laser e por entendermos que o acesso ao interior das bolsas periodontais com a fibra óptica seria facilitado, reforçando a ideia de que a irradiação

direta traria uma significativa redução da carga microbiana e inflamatória dos tecidos. Para a escolha do azul de metileno de 0,01% como fotossensibilizador, levou-se em consideração a sua eficácia e segurança de acordo com a literatura (Usacheva et al., 2001; Shih; Huang, 2011) além da disponibilidade no mercado. O protocolo (660 nm, 40 mW, 90 J/cm²) foi utilizado de acordo com o fabricante, o qual baseia-se no estudo de Marroti et al. (2008).

O processamento das amostras pelo ensaio Luminex foi escolhido por se tratar de uma técnica de alto rendimento e precisão, o que possibilitou a análise dos dez mediadores inflamatórios presentes em uma única amostra. Dessa maneira, os custos por analitos e o tempo dos processamentos se tornaram relativamente baixos quando comparados aos imuno-ensaios convencionais.

Em relação aos efeitos adversos, embora a análise estatística tenha mostrado diferença significativa aos três meses de estudo, durante os atendimentos nenhum paciente solicitou o uso de anestesia para irrigação do fotossensibilizador ou irradiação com o laser. Portanto, pode-se entender que o grau de desconforto dos pacientes em ambos os grupos foi baixo, como já observado em estudos anteriores (Cappuyns et al., 2012; Müller Campanile et al., 2013).

Este estudo mostrou que a PDT, quando utilizada dentro dos parâmetros descritos, apresentou uma redução significativa de quatro dos dez mediadores inflamatórios avaliados. Incluindo a capacidade antimicrobiana da PDT (de Almeida et al., 2007; Qin et al., 2008; Prates et al., 2011; Theodoro et al., 2012), os resultados obtidos encorajam a utilização dessa terapia como um recurso adicional no tratamento da doença periodontal, principalmente no que diz respeito ao controle da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, entretanto mais estudos são necessários para que se possa amplificar a sua relevância e determinar protocolos mais eficazes.

7 CONCLUSÃO

O uso da PDT como coadjuvante ao tratamento de bolsas periodontais residuais de pacientes em manutenção periodontal resultou na modulação das citocinas IL-1 α e IL-1 β .

REFERÊNCIAS¹

AAP. Guidelines for periodontal therapy..J Periodontol. 1998 Mar;69(3):405-8

Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. J Periodontol. 1988 Apr;59(4):222-30.

Agarwal S, Chandra CS, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L, Baran C. Regulation of Periodontal Ligament Cell Functions by Interleukin-1b. Infect Immun.1998; 66(3):932-7.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dent J. 1975;25(4):229-35

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol.1999; 4:1-6.

de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontol. 2007 Mar;78(3):566-75.

de Andrade AK, Feist IS, Pannuti CM, Cai S, Zezell DM, De Micheli G. Nd:YAG laser clinical assisted in class II furcation treatment. Lasers Med Sci. 2008 Oct;23(4):341-7.

Andrade P, Garlet G, Silva J, Fernandes P, Milanezi C, Novaes AB Jr A, Palioto D, Grisi M, Taba M Jr, Sousa SI. Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression.: a human study. J Photochem Photobiol B. 2013 (5)119-125.

Angaji M, Gelskey S, Nogueira-Filho G, Brothwell D. A systematic review of clinical efficacy of adjunctive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. J Periodontol. 2010 Nov;81(11):1518-28.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

Aoudjehane L, Pissaia A Jr, Scatton O, Podevin P, Massault PP, Chouzenoux S, Soubrane O, Calmus Y, Conti F. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest.* 2008 Sep;88(9):973-85.

Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb;28(2):367-74.

Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009 Nov;80(11):1790-8.

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008;35:877–84.

Bostanci N, Allaker R, Johansson U, Rangarajan M, Curtis MA, Hughes FJ, McKay IJ. Interleukin-1alpha stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Feb;22(1):52-60.

Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou C, Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012 Sep;27(5):979-86.

Claffey N, Egelberg J. Clinical indicators of probing attachment loss following initial periodontal treatment in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1995 Sep;22(9):690-6.

Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, Casarin RC, Cirano FR, Saraceni CH, Casati MZ. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):317-24.

Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho- Campos J, Silva-Filho VJ, Thedei G. Photodynamic Therapy reduces bone resorption and decrease inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg* 2011; 29:735-740.

Cortelli JR, Querido SM, Aquino DR, Ricardo LH, Pallos D. Longitudinal clinical evaluation of adjunct minocycline in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2006 Feb;77(2):161-6.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg*. 2007 Apr;25(2):102-6.

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Oct;10(4):742-80.

Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2003;18(1):51-5.

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2009 Nov;24(6):885-91.

Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol 2000*. 2004;35:42-52.

de Andrade AK, Feist IS, Pannuti CM, Cai S, Zezell DM, De Micheli G. Nd:YAG laser clinical assisted in class II furcation treatment. *Lasers Med Sci*. 2008 Oct;23(4):341-7.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol*. 1992 Nov;37(11):883-7.

Euzebio Alves VT, de Andrade AK, Toaliar JM, Conde MC, Zezell DM, Cai S, Pannuti CM, De Micheli G. Clinical and microbiological evaluation of high intensity diode laser adjunct to non-surgical periodontal treatment: a 6-month clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan;17(1):87-95.

Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. *Cell Signal*. 2012 Jun;24(6):1116-25

Figueredo CM, Rescala B, Teles RP, Teles FP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS, Gustafsson A. Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Apr;23(2):173-6.

Franco EJ, Pogue RE, Sakamoto LH, Cavalcante LL, Carvalho DR, de Andrade RV. Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014 Mar;11(1):41-7.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1535-45.

Garcez A. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent*. 2003(57)223-25.

Garlet GP, Martins W, Fonseca BA, Ferreeira BR, Silva J. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclasts factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004;31(8)671-78.

Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontol Res*. 2014 Oct;49(5):584-94.

Giannopoulou C, Cappuyns I, Cancela J, Cionca N, Mombelli A. Effect of photodynamic therapy, diode laser, and deep scaling on cytokine and acute-phase protein levels in gingival crevicular fluid of residual periodontal pockets. *J Periodontol*. 2012 Aug;83(8):1018-27.

Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8):1592-600.

Glavind L, Löe H. Errors in the clinical assessment of periodontal destruction. *J Periodontol Res*. 1967;2(3):180-4.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):391-401.

Gregghi SL. Avaliação quantitativa das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e do TGF- β , presentes na saliva de pacientes com periodontite, antes e após a submissão a psicoterapia- análise comparativa com pacientes controle. 2011 [Tese de livre docência]

Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. J Dent. 2004 Sep;32(7):511-20.

Gómez C, Domínguez A, García-Kass AI, García-Núñez JA. Adjunctive Nd:YAG laser application in chronic periodontitis: clinical, immunological, and microbiological aspects. Lasers Med Sci. 2011 Jul;26(4):453-63.

Greenstein G, Caton J, Polson AM. Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. J Periodontol. 1981 Aug;52(8):420-5.

Hakki SS, Bozkurt SB. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. Lasers Med Sci. 2012 Mar;27(2):325-31.

Haypek P, Zezzel DM, Bachmann L, Marques MM. Interaction between high-power diode laser and dental root surface. Thermal, morphological and biocompatibility analysis. J Oral Laser Appl. 2006;(6):1-9.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004 May;3(5):436-50.

Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):45-66.

Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? Periodontol 2000. 2009;50:90-126.

Karlsson MR, Diogo Löfgren CI, Jansson HM. The effect of laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in subjects with chronic periodontitis: a systematic review. J Periodontol. 2008 Nov;79(11):2021-8.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17.

Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med*. 2001;28(4):355-64.

Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, Nociti FH Jr, Ambrosano GM, Cirano FR, Pimentel SP, Casati MZ. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2014 Aug;85(8):e277-86.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007 Aug;86(8):694-707. Review. Erratum in: *J Dent Res*. 2007 Nov;86(11):1126.

Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Mar;47(3):932-40.

Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006;25(1-2):487-504.

Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;30(5):365-9.

Lynch S. The role of growth factors in periodontal repair and regeneration. In *Periodontal Regeneration: current status and direction*. 1994 (Polson A. Ed.) Quintessence, Chicago. 179-98.

Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011 Feb;46(1):89-96.

Luchesi VH, Pimentel SP, Kolbe MF, Ribeiro FV, Casarin RC, Nociti FH Jr, Sallum EA, Casati MZ. Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2013 Aug;40(8):781-8.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2004;34(3):260-5.

Marroti J, Pigozzo MN, Nakamae AEM. Terapia fotodinâmica no tratamento da peri-implantite. *Implant News*. 2008;5(4):401-05.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005 May 13;79(2):159-70.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*. 1971 Oct;122(4):532-5.

Müller Campanile VS, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombelli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lasers Med Sci*. 2013 May 10. [Epub ahead of print]

Neto JB, Filho GR, Tramontina VA, Sallum EA, Nociti FH Jr, Sallum AW. Millimeter marks and probe tip diameter standardisation from commercially available periodontal probes. A comparative study. *J Int Acad Periodontol*. 2001 Jul;3(3):57-60.

Offenbacher S, Collins JG, Heasman PA. Diagnostic potential of host response mediators. *Adv Dent Res*. 1993 Aug;7(2):175-81.

Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S2-10.

Oliveira R, Schwartz-Filho H, Novaes Jr A, Garlet G, Souza R, Taba M, Souza S, Ribeiro F. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid preliminar results. *J. Periodontolgy*. 2009(80):98-05.

Ozcelik O, Cenk Haytac M, Kunin A, Seydaoglu G. Improved wound healing by low-level laser irradiation after gingivectomy operations: a controlled clinical pilot study. *J Clin Periodontol*. 2008 Mar;35(3):250-4.

Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):108-20.

Pedrazzoli V, Kilian M, Karring T, Kirkegaard E. Effect of surgical and non-surgical periodontal treatment on periodontal status and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 1991 Sep;18(8):598-604.

Pejcic A, Kojovic D, Kesic L, Obradovic R. The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2010 Feb;28(1):69-74.

Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, Gomes L, Ribeiro MS. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B*. 2007 Jan 3;86(1):70-6.

Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MP, Ribeiro AC, Ribeiro MS. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(12):835-44.

Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2005 Feb;76(2):187-93.

Pourabbas R, Kashefimehr A, Rahmanpour N, Babaloo Z, Kishen A, Tenenbaum HC, Azarpazhooh A. Effects of photodynamic therapy on clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2014 Sep;85(9):1222-9.

Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. 2005 Jul;32(7):714-9.

Querido S, Cortelli J. Antimicrobianos Locais como adjunto à terapia periodontal. *Rev. Biociênc*. 2003;9:27-34.

Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2008 Apr;43(2):162-7.

Raghavendra M, Koregol A, Bhola S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S102-9

Raisz LG, Rodan GA, . Principles of bone biology. San Diego: Academic Press, 1996: 647-59.

Renvert S, Persson GR. A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2002;29(3):82-9.

Saglam M, Kantarci A, Dundar N, Hakki SS. Clinical and biochemical effects of diode laser as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):37-46.

Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 1993 May;28(3):204-10.

Sanz I, Alonso B, Carasol M, Herrera D, Sanz M. Nonsurgical treatment of periodontitis. *J Evid Based Dent Pract*. 2012 Sep;12(3 Suppl):76-86.

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*. 2000 Feb;108(1):29-34.

Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2008 Apr;23(2):211-5.

Segelnick SL, Weinberg MA. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? *J Periodontol*. 2006 Sep;77(9):1598-601.

Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, Corrêa VM, Coulomb B, Tedesco AC. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photobiol B*. 2010 Dec 2;101(3):348-54.

Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:77-93.

Schindl A, Neumann R. Low intensity laser therapy is an effective treatment for recurrent herpes simplex infection. Results from a randomized double blind placebo controlled study. *J Invest Dermatol* 1999;113(2):221-3.

Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvasc Res*. 2002 Sep;64(2):240-6.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:158-72.

Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Szathmari L, Georg T, Becker J. In vivo and in vitro effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planing on periodontally diseased root surfaces: a comparative histologic study. *Lasers Surg Med*. 2003;32(5):359-66.

Segelnick SL, Weinberg MA. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? *J Periodontol*. 2006 Sep;77(9):1598-601.

Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. *Lasers Surg Med*. 2007 Jul;39(6):551-9.

Shih MH, Huang FC. Effects of photodynamic therapy on rapidly growing nontuberculous mycobacteria keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jan 5;52(1):223-9.

Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*. 2005 Jul;76(7):1100-5.

Sild E, Bernardi F, Carnevale G, Milano F. Computerized periodontal probe with adjustable pressure. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1987;7(4):53-62.

Slotwinska S. The interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and soluble tumor necrosis factor receptor I (sTNF RI) in periodontal disease. *Open Journal of Immunology*. 2013;3:10-16.

Souza, GR. "Análise comparativa da emissão de luz por led e lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas. Estudo *in vitro*" Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, 2007

Souza SL, Andrade PF, Silva JS, Tristão FS, Rocha FA, Palioto DB, Grisi MF, Taba M Jr, Novaes AB Jr. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor- β 1 levels in the gingival crevicular fluid. *Photomed Laser Surg*. 2013 Feb;31(2):65-71

Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003;33(3):161-8.

Sorkhdini P, Moslemi N, Jamshidi S, Jamali R, Amirzargar AA, Fekrazad R. Effect of hydrosoluble chlorine-mediated antimicrobial photodynamic therapy on clinical parameters and cytokine profile in ligature-induced periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 2013 Jun;84(6):793-800.

Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, Zalewski P, Newton JL, Gryko L, Zajac A, Rosc D. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *J Physiol Pharmacol*. 2013 Jun;64(3):387-91.

Tabibzadeh Z, Roayaee AM, Ghaforian BM, Akbarzadeh BAR. The correlation between smoking and the concentration of IL-1 β in crevice fluid of patients suffering from chronic periodontitis. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2011.Jan;12(1):52-9.

Te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*. 1990 Oct 1;76(7):1392-7.

Theodoro LH, Sampaio JE, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and Diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. *J Periodontal Res.* 2006 Oct;41(5):381-90.

Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, Spolidório DM, de Toledo BE, Garcia VG. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci.* 2012 Jul;27(4):687-93.

Tonetti MS, Muller-Campanile V, Lang NP. Changes in the prevalence of residual pockets and tooth loss in treated periodontal patients during a supportive maintenance care program. *J Clin Periodontol.* 1998 Dec;25(12):1008-16.

Tonetti MS, Claffey N; European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:210-3.

Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Eickholz P, Fourmouzis I, Topoll H, Vangsted T, Wallkamm B. Effects of a single topical doxycycline administration adjunctive to mechanical debridement in patients with persistent/recurrent periodontitis but acceptable oral hygiene during supportive periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2012 May;39(5):475-82.

Tomasi C, Koutouzis T, Wennström JL. Locally delivered doxycycline as an adjunct to mechanical debridement at retreatment of periodontal pockets. *J Periodontol.* 2008 Mar;79(3):431-9.

Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci.* 2007 Jan;23(1):1-7.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29(2):165-73.

Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. *J Periodontol.* 1993 Aug;64(8):792-806.

Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000. 1996 Feb;10:45-78.

Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):406-11.

Wahl SM, Gately CL. Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell continuous T cell line origin. *J Immunol*. 1983 Mar;130(3):1226-30.

Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J*. 2003 Sep;48(3):146-55

Webb C, Dyson M, Lewis WH. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. *Lasers Surg Med*. 1998;22(5):294-301.

Westfelt E, Rylander H, Dahlén G, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the progression of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1998 Jul;25(7):536-41.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):412-8.

Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993 Jun;8(3):182-7.

Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, Enwemeka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*. 2004 Jun;22(3):241-7.

Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, Van der Weijden FA. The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *J Periodontol*. 2013 Mar;84(3):332-51.

Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol*. 2007 Apr;34(4):285-93.

ANEXO A - Tabelas (Média e Desvio padrão) dos mediadores avaliados.

Tabela 5.4 - Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de IL-1 α

IL-1α(pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	686,86 $\pm$ 116,17	486,51 $\pm$ 64,06	769,52 $\pm$ 202,69	476,44 $\pm$ 78,50
Controle	582,48 $\pm$ 90,38	783,22 $\pm$ 97,26	1750,33 $\pm$ 446,40 ^{a, b}	752,21 $\pm$ 86,54 ^c
P (Anova)	>0,05	0,03*	0,03*	0,02*

a - diferença estatística em relação ao baseline.(p<0,01)

b- diferença estatística em relação a 7 dias.(p<0,05)

c- diferença estatística em relação aos 3 meses.(p<0,05)

* Significativo ao nível alfa de 5%

Tabela 5.5- Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de IL-1 β

IL-1β(pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	336,19 $\pm$ 57,60	294,36 $\pm$ 56,81	264,89 $\pm$ 79,70	428,51 $\pm$ 81,13
Controle	327,06 $\pm$ 62,21	308,89 $\pm$ 54,42	451,03 $\pm$ 76,82	837,57 $\pm$ 134,33 ^{a,b}
P (Anova)	>0,05	>0,05	0,04*	0,03*

a - diferença estatística em relação ao baseline.(p<0,001)

b- diferença estatística em relação aos 7 dias.(p<0,001)

* Significativo ao nível alfa de 5%

Tabela 5.6-Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de IL-8

IL-8 (pg/μl)	Início	07 dias	3 meses	12 meses
PDT	502,28 $\pm$ 85,21	485,52 $\pm$ 137,34	321,54 $\pm$ 85,58	414,44 $\pm$ 120,28
Controle	505,10 $\pm$ 99,05	560,06 $\pm$ 84,36	595,98 $\pm$ 111,89	553,17 $\pm$ 83,95
P (Anova)	>0,05	>0,05	0,04*	>0,05

* Significativo ao nível alfa de 5%

Tabela 5.7 Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de VEGF

TNF-α (pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	2,74 $\pm$ 0,42	2,93 $\pm$ 0,72	3,56 $\pm$ 0,58	1,81 $\pm$ 0,32
Controle	2,50 $\pm$ 0,32	3,35 $\pm$ 0,89	4,78 $\pm$ 1,19	3,18 $\pm$ 0,59
P (Anova)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Tabela 5.8 Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de IFN- γ

IFN-γ (pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	0,0044 $\pm$ 0,0008	2,43 $\pm$ 0,50 ^a	2,59 $\pm$ 0,34 ^a	1,94 $\pm$ 0,41 ^a
Controle	0,0041 $\pm$ 0,0007	2,49 $\pm$ 0,28 ^a	2,69 $\pm$ 0,57 ^a	2,27 $\pm$ 0,49 ^a
P (Anova)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

a - diferença estatística em relação ao baseline.(p<0,01)

Tabela 5.9 - Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de IL-4

IL-4(pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	3,77 $\pm$ 0,74	6,29 $\pm$ 0,79	5,41 $\pm$ 0,52	5,09 $\pm$ 0,64
Controle	3,95 $\pm$ 0,50	6,38 $\pm$ 1,13	5,07 $\pm$ 0,98	4,36 $\pm$ 0,54
P (Anova)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Tabela 5.10 - Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de IL-10

IL-10(pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	0,050 $\pm$ 0,008	0,094 $\pm$ 0,026	0,35 $\pm$ 0,05 ^{a,b}	0,23 $\pm$ 0,07
Controle	0,056 $\pm$ 0,024	0,236 $\pm$ 0,112	0,38 $\pm$ 0,12	0,24 $\pm$ 0,05
P (Anova)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

a - diferença estatística em relação ao baseline.(p<0,001)

b- diferença estatística em relação a 7 dias.(p<0,01)

Tabela 5.11 Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de IL-1ra.

IL-1ra(pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	16340,87 $\pm$ 3575	3796,87 $\pm$ 534,15 ^a	3605,19 $\pm$ 408,06 ^a	4410,60 $\pm$ 853,48 ^a
Controle	15294,73 $\pm$ 3096	4401,79 $\pm$ 928,12 ^a	4219,56 $\pm$ 1112,4 ^a	3677,76 $\pm$ 567,20 ^a
P (Anova)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

a - diferença estatística em relação ao baseline.(p<0,001)

Tabela 5.12 Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de FGF

FGF (pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	17± 2,38	19,17±2,83	26,92±3,91	26,11±4,25
Controle	16,97±2,24	19,91±3,42	25,91±5,70	31,16±5,84
P (Anova)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Tabela 5.13 Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação ao nível de VEGF

VEGF(pg/μl)	Início	7 dias	3 meses	12 meses
PDT	40,89±3,23	67,16±11,60	64,54±12,26	51,08±5,29
Controle	41,45±6,47	45,05±9,74	68,47±10,19	57,20±11,18
P (Anova)	>0,05	0,04*	>0,05	>0,05

* Significativo ao nível alfa de 5%

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – FOU SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

Verônica
E.M.

PARECER DE APROVAÇÃO
FR - 225521
211/2008

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"Terapia fotodinâmica como coadjuvante ao tratamento não cirúrgico da periodontite crônica: ensaio clínico randomizado"**, de responsabilidade das Pesquisadoras **Verônica Franco de Carvalho**, Vanessa Tubero Euzébio Alves, Mariana Albolea e Marina Clemente Conde, sob orientação do(a) Prof(a). Dr(a). Giorgio De Micheli.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 11 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO C - Adendo ao Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – FOUSP

Anexo II

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
FR 225521
Protocolo 211/08

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente à inclusão da coleta de amostra do fluido gengival, da pesquisa para: "**Terapia fotodinâmica como coadjuvante ao tratamento não cirúrgico da periodontite crônica: ensaio clínico randomizado**"; de responsabilidade dos Pesquisadores Verônica Franco De Carvalho, Vanessa Túbero Euzébio Alves, Mariana Albolea e Marina Clemente Conde, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Prof. Dr. Giorgio de Micheli.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2010.

Profa. Dra. **Marcia Turolla Wanderley**
Coordenadora do CEP-FOUSP

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

“Terapia fotodinâmica como coadjuvante ao tratamento não-cirúrgico da periodontite crônica: ensaio clínico randomizado.”

As informações abaixo são para esclarecer e pedir a sua participação voluntária nesse estudo que tem por finalidade avaliar possíveis benefícios de um tratamento complementar para doença periodontal.

O laser que será utilizado nessa pesquisa é o Diodo, associado a um corante para sensibilizar as bactérias que são encontradas nas bolsas periodontais, no que se denomina “Terapia Fotodinâmica”. Esta terapia será utilizada como auxiliar no tratamento convencional da doença periodontal, pois em estudos prévios ela demonstrou ter capacidade de reduzir o número de bactérias que estão relacionadas à doença.

Os pacientes que participarão deste estudo responderão a um questionário de saúde, e passarão pelo seguinte protocolo:

- Termo de consentimento livre e esclarecido
- Exame clínico – serão coletados alguns dados sobre o estado clínico periodontal dos dentes. Dependendo do grau de inflamação da gengiva poderá levar a algum desconforto na região, o qual desaparecerá após a remoção da sonda.
- Exame radiográfico – serão feitas 14 radiografias periapicais. Em poucos casos alguns pacientes relatam náuseas, dependendo da área da cavidade bucal em que o filme radiográfico está em contato.
- Diagnóstico – feito sem a presença do paciente, por meio dos dados obtidos nos exames realizados.
- Procedimentos básicos periodontais – tratamento que inclui raspagem, alisamento coronário-radicular, o qual será feito sob anestesia local, por meio de instrumentos ultra-sônicos e manuais, e orientação de higiene bucal.
- Exames complementares microbiológicos – serão coletadas amostras da placa bacteriana subgengival. O exame é praticamente indolor, poucos pacientes relatam uma leve sensação de pressão no local.

- Aplicação do laser e corante – não necessita anestesia, pois os pacientes não relatam dor durante a aplicação, a qual dura em torno de 2 minutos.
- Controles periódicos no decorrer do estudo – serão realizados procedimentos de remoção de placa bacteriana por meio de polimento com taça de borracha e pasta abrasiva e ultra-som, nos intervalos de tempo pré- estabelecidos.

Todos os procedimentos empregados fazem parte de um tratamento periodontal rotineiro, com exceção da aplicação o laser e do corante que só pertencem ao estudo.

Qualquer intercorrência que venha a acontecer, como dor, sensibilidade ou outros desconfortos gerados pelo tratamento, o paciente terá todo o amparo necessário podendo entrar em contato com um dos membros da equipe de pesquisa, pelos telefones fornecidos ao início do estudo.

A identificação do paciente será preservada de forma que seu nome não constará nas publicações subseqüentes à pesquisa, nem será citado em cursos, palestras ou aulas expositivas. Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo.

O paciente não efetuará nenhum pagamento por sua participação nesta pesquisa, porém receberá o benefício de um tratamento periodontal completo.

Fica esclarecido que o paciente terá o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, de forma a imperar seu livre-arbítrio. Da mesma forma, o paciente que não se mostrar cooperador durante o estudo será excluído da pesquisa.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo).

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

Nome completo: _____

Data de nascimento: _____ RG: _____ Data da expedição: _____

Endereço: _____

_____Cidade/UF: _____

CEP: _____ Telefones: _____

Declaro estar de pleno acordo com os termos acima, e opto pela participação voluntária na pesquisa supra-citada.

São Paulo, de de .

Assinatura do paciente

APÊNDICE B - Anamnese completa

Seção: Prof. Giorgio De Michelis

SAÚDE GERAL

PERGUNTA	SIM	NAO
1) Está em tratamento médico?		X
2) Foi submetido a alguma cirurgia?	X	
3) Teve ou tem alguma destas doenças:		
a) Hepatites		X
b) Tuberculose		X
c) Problema cardíaco		X
d) Diabetes		X
e) Febre reumática		X
4) Toma anticoagulante (AAS)?		X
5) É fumante?		X
6) Pressão alta?		X
7) Sofre dos rins ou bexiga?		X
8) Tem com frequência algum tipo de hemorragia?		X
9) Aparecem manchas roxas no corpo com frequência?		X
10) Anemia?		X
11) Tem alguma alergia?	X	
12) Alergia a que: <i>Camarão</i>		
13) Já recebeu transfusão de sangue?		X
14) Tem doença sexualmente transmissível (AIDS)?		X
15) Tem tonturas?		X
16) Tem convulsões?		X
17) Menstruação está normal? <i>n convém</i>		
18) Está grávida? <i>n convém</i>		
19) Toma anticoncepcional? <i>n convém</i>		
20) Está na menopausa? <i>n convém</i>		
21) Medicamentos em uso: <i>—</i>		X

PARTE ODONTOLÓGICA

Queixa do paciente: *"Não estou satisfeito com a aparência dos dentes, muito brancos."*

PERGUNTA	SIM	NAO
1) Já teve ferida nos lábios ou língua que demoraram para sarar?		X
2) Come muito doce?		X
3) Toma muito refrigerantes?	X	
4) Tem hábito de ranger ou apertar os dentes?		X
5) Tem sangramento gengival?	X	
6) Tem dor nas gengivas?	X	
7) Tem dentes abalados?	X	
8) Quantas vezes por dia escova os dentes? <i>3 vezes</i>		
9) Usa escova: dura () média () mole (X) Pasta: <i>Colgate</i>		
10) Utiliza fio ou fita dental? <i>às vezes</i>		
11) Quantas vezes por dia? <i>2 vezes por semana</i>		
12) Usa outros métodos de limpeza? <i>às vezes; bochecho</i>		
13) Quais?		
14) Bochechos?		
15) Já fez aplicação tópica de flúor?		X

APÊNDICE C – Periograma completo realizado pela Florida Probe

APÊNDICE D – Questionário de efeitos adversos

QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS

Nome:_____ data:_____

☐ baseline ☐ 7 dias ☐ 3 meses ☐ 6 meses ☐ 9 meses ☐ 12 meses**SINTOMAS:**

DOR

0_____10

Outros sintomas:

Intra-oral: ☐ inchaço ☐ sensibilidade dentária ☐ manchasExtra-oral: ☐ dor de cabeça ☐ desconforto ao mastigar☐ outros_____**SINAIS:**Intra-oral: ☐ edema ☐ ulceração ☐ eritema ☐ manchasExtra-oral: _____ ☐ outros_____

APÊNDICE E - Auxílio à pesquisa FAPESP

Número do Processo	2010/20157-3 - Projeto de Pesquisa - Regular
Situação	Em Execução
Grupo de Financiamento	Auxílio à Pesquisa
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular - Fluxo Contínuo
Beneficiário	Giorgio De Micheli
Responsável	Giorgio De Micheli
Data Início	01/05/2011
Duração	30 mês(es)
Nome da Instituição	Faculdade de Odontologia/FO/USP
Departamento / Área	Estomatologia
Data de Abertura	19/12/2010
Área de Alocação de Recursos	Saúde
Processos Relacionados	
Nenhum processo relacionado cadastrado	

Projeto - Identificação

Título em Português
AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA AO TRATAMENTO NÃO-CIRÚRGICO DA PERIODONTITE CRÔNICA
Título em Inglês
IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFECTS OF PHOTODYNAMIC THERAPY ASSOCIATED WITH PERIODONTAL NON-SURGICAL TREATMENT IN CHRONIC PERIODONTITIS