VERÔNICA FRANCO DE CARVALHO

**Terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas residuais de pacientes em
manutenção periodontal: um ensaio clínico aleatório controlado**

São Paulo

2014

VERÔNICA FRANCO DE CARVALHO

**Terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas residuais de pacientes em
manutenção periodontal: um ensaio clínico aleatório controlado**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, 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 da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Carvalho, Verônica Franco de.

Terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal: um ensaio clínico aleatório controlado / Verônica Franco de Carvalho; orientador Giorgio De Micheli. -- São Paulo, 2014.

70 p. :il.: fig., tab., graf. ; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Laser. 3. Reação em cadeia por polimerase. 4. Doenças periodontais. I. De Micheli, Giorgio. II. Título.

Carvalho VF. Terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal: um ensaio clínico aleatório controlado. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Lilian e Ricardo, numa singela tentativa de
retribuir tudo que já fizeram por mim;*

*Ao André e Carolina que me fazem
sentir plena.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Giorgio De Micheli, sempre de portas abertas, confiou na minha capacidade e me permitiu conduzir este estudo tão complexo.

À Profa. Marina Clemente Conde, orientadora que sentou no mocho semanalmente conosco, responsável pela elaboração e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Claudio Mendes Pannuti, imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho, me faltam palavras de agradecimento por toda ajuda prestada desde o início do projeto até o presente momento, me guiando e acalmando na condução deste ensaio clínico.

À equipe de pesquisa, composta por pessoas especiais na essência em tratar doentes periodontais, com ética, técnica e coração. Especialmente Priscila Vivas da Cruz Andrade e Michelle de Franco Rodrigues, minhas parceiras de pulso até o fim desta grande jornada. E ainda, pessoas que passaram por mais ou menos tempo e deixaram sua imensa contribuição, enriquecendo este trabalho e me eternizando de gratidão: Mariana Albolea Lubisco, Vanessa Tubero Euzebio Alves, Marcello Sirolli Ferreira, Donata de Souza, e da mesma forma as alunas de iniciação científica: Claudia Monteiro Orellana, Thais Claudino Lage, Amália Cristina de Souza Cataruci, Ananda Fini, Andresa Gonçalves, Camila de Luca.

Aos Profs. Mario Hiroyuki Hirata e Rosário Dominguez Crespo Hirata, que nos deram suporte técnico e intelectual num ambiente totalmente desconhecido, permitindo a execução da análise microbiológica em seu Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. E neste contexto, agradeço a técnica Cristina Fajardo, que com sua paciência e atenção pode nos auxiliar demais na rotina de bancada. E as precursoras da empreitada da odontologia no LABMAD, Daniele Salami Lourenção e Ariana Soares Rodrigues, sem as quais eu não poderia ter iniciado o processo laboratorial. Foram as responsáveis por otimizar e padronizar as reações para os patógenos periodontais, das quais usufrui. Daniele me ensinou desde pipetar até analisar a reação de PCR em tempo real. E ainda, Mariana Rocha Guglielmetti, uma grande companheira para desafios, com atitude e organização necessárias para dominar o trabalho laboratorial, o acaso nos aproximou com sucesso.

À FAPESP, pelo Auxílio à Pesquisa (2009-53934-5), fundamental para o desenvolvimento do estudo.

Às Profas. Marcia Mayer e Marinella Holzhausen Caldeira pela significativa contribuição no exame de qualificação.

Aos pacientes, que se voluntariaram, e acreditaram no benefício do tratamento periodontal, e ainda muitas vezes se entusiasmaram em participar de uma pesquisa científica. Especialmente, aos 34 participantes que fielmente compareceram e colaboraram até os 12 meses de acompanhamento, gratos pela conquista da saúde periodontal.

Ao meu grande mestre, Prof. Marco Antonio Paupério Georgetti, sempre exemplo para minha formação como periodontista e professora, extrapolando a técnica e o conhecimento, me ensina a leveza dessas duas profissões tão gratificantes.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da FOU SP, Giuseppe Alexandre Romito, Luiz Antonio Pugliese Alves de Lima, João Batista César Neto, Marinella Holzhausen Caldeira, Luciana Saraiva, e aos meus professores de Periodontia da FOU SP, Francisco Emilio Pustiglioni, Koto Nakae, Cesário Antonio Duarte, Roberto Moreira Fraga Lofufo (*in memorian*), Silvia Rosana Carneiro (*in memorian*), Rosana Gerab Tramontina, meus sinceros agradecimentos por todo conhecimento transmitido ao longo de tantos anos.

Aos amigos que conquistei em todo processo da pós-graduação, e o tornaram mais fácil e nobre, Selma Tera Romagnol, Daniele Salami Lourenção, Vanessa Tubero Euzebio Alves, Ecinele Francisca Rosa, Mariana Rocha Guglielmetti, Marcello Sirolli Ferreira, Ricardo Takiy Sekiguchi, Cassia Tiemi Fukuda Nakashima, Priscila Corraini, Valeria Gondim Silva, Ivan Munhoz Pasin, Giovane Hisse Gomes, Hsu Shao Feng.

Aos colegas e amigos professores da Disciplina de Periodontia da UNINOVE, especialmente Eliane Matsura e Dacio Antonio Pantano Junior, que me acolheram num novo universo de trabalho, e me deram um exemplo de sucesso; e unidos a Renato Araujo Prates, nossa missão fica prazerosa diante da coerência de atitudes e valores da equipe. E aos professores da pós-graduação da UNINOVE, Renato Araujo Prates e Cristiane Miranda França, que me deram oportunidade para mais um novo desafio na pesquisa científica.

A minha sócia e amiga, Juliana Civolani Cardoso Araújo, não consigo descrever minha gratidão por toda ajuda que me ofereceu e suporte que me deu.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Lilian e Ricardo, pelo amor e educação que me deram, e me fizeram pronta para encarar as dificuldades e maravilhas da vida. Ensinaram-me a ética e perseverança, ingredientes fundamentais para a execução e conclusão deste trabalho.

Ao meu irmão, Maurício, que me acompanha desde sempre, e junto com Fádhia, trouxeram mais luz à nossa família: Chico e Julio.

Ao André, que me ensina e faz crescer, e divide comigo a alegria da vida.

RESUMO

Carvalho VF. Terapia fotodinâmica no tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal: um ensaio clínico aleatório controlado [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia da Terapia Fotodinâmica (PDT) no tratamento de bolsas residuais de pacientes portadores de periodontite crônica em manutenção periodontal, através da avaliação de parâmetros clínicos e microbiológicos. Um ensaio clínico aleatório controlado duplo-cego paralelo foi conduzido para avaliar 34 pacientes com periodontite crônica, que foram submetidos ao tratamento periodontal convencional e apresentaram pelo menos quatro sítios com bolsas residuais na reavaliação. Os pacientes foram alocados em grupo teste (PDT) e grupo controle (sham) aleatoriamente. A terapia fotodinâmica foi realizada através da irrigação subgengival com azul de metileno (0,01%), e a irradiação com laser de diodo a 660nm, 90J/cm² por 90s. A intervenção foi feita no início do estudo, aos 3, 6 e 9 meses. Os parâmetros clínicos foram avaliados no início, 3, 6 e 12 meses após o tratamento. A coleta de placa subgengival foi feita antes da intervenção, uma semana após, 3, 6 e 12 meses depois. A avaliação microbiológica foi feita a partir da detecção e quantificação de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pela reação de polimerase em cadeia em tempo real. Todos os parâmetros clínicos avaliados apresentaram melhora significativa durante o estudo, porém não houve diferença significativa entre os grupos. Em relação à análise microbiológica, não houve diferença entre os grupos em nenhum momento do estudo. Porém, houve redução significativa de *T. forsythia* no grupo teste aos 6 meses, e aumento significativo de *P. gingivalis* no mesmo grupo aos 12 meses. Dentro dos parâmetros do laser e fotossensibilizador utilizados neste estudo, a PDT não demonstrou ter efeito benéfico adicional no tratamento de bolsas periodontais residuais.

Palavras chave: Doenças periodontais. Laser. Terapia fotodinâmica. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Carvalho VF. Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal maintenance patients: a randomized controlled clinical trial [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

The aim of this study was to investigate the effectiveness of Photodynamic Therapy (PDT) in the treatment of residual pockets of chronic periodontitis patients in periodontal maintenance, by assessing clinical and microbiological parameters. A randomized clinical controlled double-blind parallel trial was performed to assess 34 periodontal patients, who received conventional periodontal treatment and presented residual pockets at revaluation. The patients were allocated to test (PDT) and control (sham) group randomly. The photodynamic therapy was performed by subgingival irrigation with methylene blue (0.01%), and diode laser irradiation (660nm, 90j/cm²) during 90s. The intervention was performed at baseline, 3, 6 and 9 months. The clinical parameters were evaluated at baseline, 3, 6 and 12 months. The subgingival plaque sampling was collected before intervention, a week after, 3, 6 and 12 months later. The detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was achieved by means of the real time polymerase chain reaction. All clinical parameters showed significant improvement during the study, but there was no significant difference between groups. The microbiological analyses showed no differences between groups in any time of study. There was a significant reduction of *T. forsythia* in test group at 6 months, and a significant increase of *P. gingivalis* in test group at 12 months. Considering the laser and photosensitizer used in this trial, PDT failed to demonstrate additional benefits in residual pockets treatment.

Keywords: Periodontal disease. Laser. Photodynamic therapy. Polimerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1–	Modelo experimental.....	28
Figura 4.2–	a) Medida da distância da união esmalte-cimento à margem gengival; b) Profundidade clínica de sondagem.....	29
Figura 4.3–	Coleta de placa subgengival e <i>pool</i> de amostras.....	29
Figura 4.4–	O fotossensibilizador é dispensando na bolsa periodontal.....	32
Figura 4.5–	Irradiação com o laser.....	32
Figura 4.6–	Curva padrão para a espécie <i>A. actinomycetemcomitans</i> ($R^2= 0.99$; $slope= -3.33$)	37
Figura 4.7–	Curva padrão para a espécie <i>P. gingivalis</i> ($R^2= 1$; $slope = -3.52$).....	37
Figura 4.8–	Curva padrão para a espécie <i>T. forsythia</i> ($R^2= 1$; $slope= -3.49$).....	38
Figura 4.9–	Curva padrão para a espécie <i>T. denticola</i> ($R^2= 0.99$; $slope= -3.50$)....	38
Figura 5.1–	Fluxograma dos participantes da pesquisa.....	40
Figura 5.2 –	Frequência de redução das bolsas.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1– Sequências de iniciadores e sondas utilizadas nas reações de produção de controles internos e nas reações das amostras.....	36
Tabela 5.1– Características demográficas dos participantes (média e desvio padrão).....	41
Tabela 5.2– Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS, NCI, IPV e IS.....	42
Tabela 5.3– Média desvio padrão (DP) e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS e NCI: bolsas moderadas.....	43
Tabela 5.4– Média desvio padrão (DP) e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS e NCI: bolsas profundas.....	44
Tabela 5.5– Extensão (número de sítios) com aumento de PCS, sem redução de PCS, com redução de PCS de até 2mm, com redução de PCS de 3mm ou mais, com perda de inserção, sem ganho de inserção, ganho de inserção de até 2mm e com ganho de inserção de 3mm ou mais, entre os exames de reavaliação e 12 meses.....	44
Tabela 5.6– Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação à quantidade de <i>Aa</i> , <i>Pg</i> , <i>Tf</i> e <i>Td</i> (transformação logarítmica na base de 10).....	45
Tabela 5.7– Média e desvio padrão da escala EVA nos grupos teste e controle (medidas em cm).....	46
Tabela 5.8 – Média e desvio padrão dos sítios com sangramento á sondagem e PCS maior ou igual a 5 mm na reavaliação.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Nucleotídeo Adenina
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C	Nucleotídeo Citosina
<i>C. gingivalis</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid/ ácido desoxirribonucleico</i>
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
G	Nucleotídeo Guanina
He-Ne	Hélio-Neônio
IPV	Índice de placa visível
IS	Índice de sangramento à sondagem
LED	<i>Light emitting diode</i>

Laser	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
NCI	Nível clínico de inserção
PBS	<i>Phosphate buffered saline/</i> Tampão salino fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction/</i> Reação em cadeia da polimerase
PDT	<i>Photodynamic therapy/</i> Terapia fotodinâmica
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PCS	Profundidade clínica de sondagem
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
T	Nucleotídeo Timina
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	milímetro
nm	nanómetro
ng	nanograma
ml	mililitro
μl	microlitro
μg	micrograma
mM	milimolar
s	segundo
μs	microsegundo
mW	miliwatt
Hz	hertz
%	porcentagem
≥	maior ou igual
°C	grau Celsius
J/cm ²	joule por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Estudos <i>in vitro</i>.....	19
2.2 Estudos em animais.....	22
2.3 Estudos em humanos.....	23
3 PROPOSIÇÃO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Delineamento do estudo.....	26
4.2 Aspectos éticos.....	27
4.3 Modelo experimental.....	28
4.4 Coleta de dados clínicos e microbiológicos.....	28
4.4.1 Avaliação clínica.....	28
4.4.2 Avaliação microbiológica.....	29
4.5 Protocolo de tratamento.....	30
4.5.1 Procedimento experimental.....	31
4.5.2 Procedimento de coleta duplo-cego.....	33
4.5.3 Avaliação após tratamento.....	33
4.5.4 Percepção de efeitos adversos.....	34
4.6 Análise da microbiota subgengival.....	34
4.6.1 Extração de DNA das amostras de placa subgengival.....	34
4.6.2 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCR em tempo real).....	35
4.7 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Análise secundária.....	46
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES.....	65
ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal tem como causa principal o acúmulo de biofilme dental nas superfícies dos dentes, capaz de produzir uma reação inflamatória nos tecidos periodontais (Løe et al., 1965; Socransky; Haffajee, 2002). O tratamento periodontal consiste primordialmente no rigoroso controle dos micro-organismos deste biofilme, tanto pela eliminação dos fatores que facilitam seu acúmulo como pela descontaminação da superfície radicular, obtida por meio da raspagem e alisamento radicular (Kaldahl et al., 1996; Claffey et al., 1990). O rigoroso controle de placa pelo paciente previne a recolonização da superfície dental pelo biofilme (Quirynen et al., 2005; Gomes et al., 2008).

Em alguns casos a infecção periodontal não é resolvida apenas com a instrumentação das superfícies dentais. Isso se atribui à presença de alguns patógenos periodontais - como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* - que possuem a capacidade de invasão tecidual, podendo penetrar em tecidos moles (Socransky; Haffajee, 2002). Além disso, outros micro-organismos podem colonizar tecidos duros (Adriaens et al., 1998), sítios não periodontais (Quirynen et al., 2001) e locais de difícil acesso para instrumentação (Rateitschak et al., 1992). A persistência dessas espécies bacterianas na superfície radicular pode facilitar a recolonização de sítios já tratados (Petersilka et al., 2002), e acarretar, posteriormente, na recidiva da doença (Cobb, 2002).

A bolsa periodontal residual, ou seja, sítio com profundidade clínica de sondagem (PCS) maior ou igual a 5 mm após tratamento inicial, fornece um ambiente favorável a recolonização por periodontopatógenos e apresenta maior risco de perda de inserção (Westfeld et al., 1998; Claffey; Egelberg, 1995; Renvert; Persson, 2002) e de perda do respectivo dente (Matulienė et al., 2008). Nessas circunstâncias, a obtenção de parâmetros clínicos compatíveis com saúde requer, eventualmente, a execução de procedimentos complementares, como cirurgias para redução de bolsa (Pedrazzoli et al., 1991) ou uso de antimicrobianos (Van Winkelhoff et al., 1996).

A antibioticoterapia sistêmica como coadjuvante ao tratamento periodontal busca eliminar os micro-organismos persistentes da bolsa periodontal após a instrumentação radicular (Socransky; Haffajee, 2002). Essa terapia, entretanto, não

é amplamente utilizada devido à possibilidade de resistência bacteriana e da sua limitação em penetrar na matriz extracelular do biofilme dental (Herrera et al., 2008).

Uma alternativa seria o uso da antibioticoterapia local, através de dispositivos contendo antimicrobianos, inseridos na bolsa periodontal (Cortelli et al., 2006), mas os estudos prévios deixam dúvida do benefício adicional no emprego de antimicrobiano local (Eickholz et al., 2005; Ratka-Krüger et al., 2005; Cortelli et al., 2006; McColl et al., 2006; Paolantonio et al., 2008; Bogren et al., 2008; Tomasi et al., 2008).

Para superar as limitações da raspagem e alisamento radicular, e com o intuito de reduzir ainda mais a carga bacteriana de sítios acometidos pela doença periodontal, a Terapia Fotodinâmica (PDT) tem sido investigada para redução de patógenos periodontais, já que é um método não invasivo, de rápida aplicação local, baixo custo, e não promove resistência bacteriana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A terapia fotodinâmica envolve a associação da luz laser a um corante, o fotossensibilizador. O biofilme subgengival é impregnado pelo agente fotossensibilizante que, quando irradiado pela luz laser com comprimento de onda ressonante, torna-se excitado. A reação transfere energia às moléculas de oxigênio da célula bacteriana. O oxigênio singlete e outros radicais livres formados são altamente reativos 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.

2.1 Estudos *in vitro*

A atuação da terapia fotodinâmica em biofilme dental foi comprovada por estudos *in vitro*. Dobson e Wilson (1992) avaliaram a sensibilização de micro-organismos orais em biofilme, através da irradiação com laser de baixa intensidade (He-Ne, 632,8 nm). Os autores mostraram que os fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina foram eficientes na eliminação de *S. sanguis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, após a irradiação de 30 s.

Sarkar e Wilson (1993) avaliaram amostras de placa subgengival de pacientes com periodontite crônica. As amostras foram irradiadas com luz do laser He-Ne, na presença ou ausência de 50µg/ml de azul de toluidina. A associação fotossensibilizador/laser conseguiu uma redução significativa na viabilidade dos micro-organismos (aeróbios, anaeróbios, anaeróbios pigmentados de preto, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*), o que não foi observado na presença do fotossensibilizador sem irradiação.

Wilson et al. (1993) investigaram a quantidade de patógenos periodontais mortos pela luz do laser de baixa intensidade logo após o tratamento destes organismos por agentes fotossensibilizantes. Azul de metileno (25µg/ml) e de azul de toluidina (25µg/ml) foram efetivos na destruição de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, quando associados a aplicação do laser He-Ne por 80 s.

A fim de determinar se o efeito bactericida na PDT seria dose-dependente ou dependente do comprimento de onda, Chan e Lai (2003) estudaram culturas de micro-organismos orais sensibilizados por azul de metileno a 0,01%. A irradiação das colônias foi feita por Laser de He-Ne (638,2 nm, 30 mW) e diodo (660 nm, 100 mW e 830 nm, 100 mW). Concluíram que o melhor resultado em termos de redução da viabilidade de micro-organismos foi obtida com o laser diodo a 660nm, por 60s (densidade de energia de 21,2 J/cm²). Nestas condições houve redução de 95% de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*, e de 95-100% para *P.gingivalis*, *P. intermedia* e *S. sanguis*.

Pfitzner et al. (2004) investigaram o efeito de 3 fotossensibilizadores na viabilidade dos patógenos *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *C. gingivalis*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*. Os fotossensibilizadores utilizados continham sua base estrutural como das porfirinas e melhor ligação com a parede celular bacteriana, diluídos em soro fisiológico na concentração de 5 mM. Os micro-organismos em cultura foram expostos aos agentes fotossensibilizantes por 15 min, e irradiados com laser diodo de comprimento de onda de 662 nm. As densidades de energia utilizadas foram 5,3 J/cm² (60 s, 0,088 W) e 20,1 J/cm² (60 s, 0,335 W). Todos os fotossensibilizadores, na concentração final de 10 µM, foram capazes de eliminar totalmente os micro-organismos anaeróbios *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *C. gingivalis*. O efeito sobre *E. corrodens* foi menor, sendo observada redução considerável somente com densidade de energia de 20 J/cm². Para *A. actinomycetemcomitans* o efeito da irradiação após sensibilização com quaisquer dos corantes foi insignificante.

Prates et al. (2007) avaliaram, *in vitro*, a eficácia do corante verde de malaquita como agente fotossensibilizador, o qual é utilizado frequentemente por periodontistas para a evidenciação do biofilme dental. Neste estudo o fotossensibilizador foi utilizado na concentração de 0,01%, e a fonte de luz foi o laser diodo, com comprimento de onda de 660 nm. As energias testadas foram de 5,4 J/cm² (30 mW, 3 min) e 9 J/cm² (30 mW, 5 min). Os experimentos mostraram, respectivamente, a eliminação de 97,2% e 99,9% das colônias de *A. actinomycetemcomitans*.

Souza (2007) demonstrou, *in vitro*, o excelente potencial do laser e LED associados ao azul de toluidina (0,01%) na sensibilização letal de *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*.

Qin et al. (2008) avaliaram o efeito do azul de toluidina na PDT com laser diodo em micro-organismos coletados da placa supragengival de humanos. A amostra consistiu da coleta de placa supragengival de 20 indivíduos portadores de periodontite, cultivadas em meio seletivo. O agente fotossensibilizante azul de toluidina foi testado em diluições seriadas, em concentrações variando de 0,01 a 5 mg/ml. O melhor efeito foi observado com a concentração de 1 mg/ml, com irradiação de 12 J/cm² e intensidade de luz de 212 mW/cm². Ainda assim, os autores observaram que o efeito variou de amostra para amostra, com redução microbiana entre 85 e 99% em 14 das 20 amostras, e de cerca de 47% em 6 amostras.

Fontana et al. (2009) avaliaram amostras de placa subgengival de indivíduos com periodontite crônica, comparando o efeito da PDT (25 µg/ml de azul de metileno, irradiado por luz laser vermelho 665 nm) em espécies na forma planctônica e em biofilme. E num segundo momento, o biofilme foi exposto a 25 ou 50 µg/ml de azul de metileno e irradiação. A PDT inviabilizou 63% das espécies em suspensão, e em biofilme atingiu 32% de morte bacteriana. As amostras expostas a luz ou ao fotossensibilizador isoladamente não tiveram redução bacteriana significativa, assim como o uso do azul de metileno a 25 µg/ml.

Matevski et al. (2003) observaram a eficácia da PDT em cultura de *P. gingivalis* na presença de soro e sangue para simular o ambiente *in vivo*. A PDT apresentou atividade bactericida significativa utilizando 12,5 µg/ml de azul de toluidina irradiado com 10 J/cm² de laser de He-Ne.

Portanto, a atuação da terapia fotodinâmica em biofilme dental está comprovada por estudos *in vitro* (Dobson; Wilson, 1992; Sarkar; Wilson, 1993; Fontana et al., 2009). Os estudos mostraram que o oxigênio singleto é capaz de agir diretamente nas moléculas da matriz extracelular do biofilme, degradando polissacarídeos, deixando os micro-organismos vulneráveis ao efeito fotoquímico, diferentemente dos antibióticos (Soukos et al., 2003; Konopka; Goslinski, 2007). A terapia fotodinâmica também age na alteração da permeabilidade da membrana celular (Bhatti et al., 1998), na redução da atividade bacteriana através da atuação em fatores de virulência como lipopolissacarídeos e proteases (Kömerick et al., 2000). Como o mecanismo antimicrobiano não é específico para espécies bacterianas o micro-organismo não desenvolve resistência bacteriana, o que pode trazer muitos benefícios se comprovada sua eficácia.

Os corantes azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita atuam como agentes fotossensibilizadores capazes de provocar morte celular de patógenos periodontais - *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* – quando submetidos à PDT (Wilson et al., 1993; Chan; Lai, 2003; Souza, 2007; Prates et al., 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 receberam também 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). Cada agente é inofensivo isoladamente, mas quando combinados produzem substâncias citotóxicas e podem destruir células de maneira seletiva (Sharman et al., 1999).

2.2 Estudos em animais

A efetividade da PDT na redução de patógenos periodontais foi confirmada por estudos em animais (Kömerick et al., 2003; Sigusch et al., 2005; Almeida et al., 2007; Qin et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Prates et al., 2011), e Cargnelutti (2007) observou uma redução significativa da atividade osteoclástica, tanto em ratos tratados com tratamento mecânico quanto em ratos tratados com PDT.

Kömerick et al. (2003) demonstraram em ratos a penetração do fotossensibilizador no tecido epitelial sem provocar ulceração e inflamação do tecido conjuntivo, indicando a segurança do método para os tecidos periodontais. Da mesma forma, Qin et al. (2008) observaram redução dos sinais de inflamação sem prejuízo dos tecidos periodontais. Luan et al. (2009) também demonstraram, em ratos, que a PDT é uma terapia antimicrobiana segura aos tecidos adjacentes normais, ao observarem ausência de tecido necrótico e inflamatório na gengiva, dentina, polpa e osso alveolar. O tempo de vida das espécies reativas de oxigênio é muito curto, por volta de $0,02\mu s$, e sua limitada migração garante a ação local da PDT (Meisel; Kocher, 2005). E ainda, o uso do laser de baixa intensidade para a fotoativação do fotossensibilizador garante que não haverá prejuízo térmico aos

tecidos do hospedeiro. 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, assim como já demonstraram estudos *in vitro* anteriormente citados.

O uso do laser de baixa intensidade é capaz de acelerar o processo de reparação tecidual, que atua como biomodulador (Woodruff et al., 2004; Damante et al., 2008; Almeida-Lopes et al., 2001; Garcia et al., 2010; Sperandio et al., 2010). A meta-análise sobre promoção de reparação tecidual pelo laser de baixa intensidade mostra que esta é uma ferramenta efetiva na reparação tecidual através da aceleração da síntese de colágeno, da redução da inflamação e do estímulo da proliferação de fibroblastos gengivais, dependendo da dose de energia aplicada (Woodruff et al., 2004). Prates et al. (2011) demonstraram, em ratos, que a PDT promoveu melhor reparação periodontal, observada pela organização de colágeno, infiltrado inflamatório e perda óssea. Qin et al. (2008) mostraram menor infiltrado inflamatório no grupo que recebeu PDT, em relação ao grupo de ratos que recebeu apenas raspagem.

Portanto, os resultados de estudos pré-clínicos suportam o uso da PDT como terapia antimicrobiana na cavidade oral, com eficácia e segurança.

2.3 Estudos em humanos

Os estudos clínicos trazem resultados controversos em relação aos benefícios do uso da PDT como coadjuvante ao tratamento periodontal, como já observado em revisões sistemáticas sobre o tema (Atieh, 2010; Azarpazhooh et al., 2010; Sgolastra et al., 2013).

Internacionalmente são utilizados, na maior parte dos ensaios clínicos (Braun et al., 2008; Chondros et al., 2009; Christodoulides et al., 2008; Polansky et al., 2009; Lulic et al., 2009; Sigush et al., 2010; Cappuyns et al., 2012), o sistema Helbo Blue® (Helbo Photodynamic Systems GmbH, Grieskirchen, Austria) de PDT, que usa como fotossensibilizador um cloridrato de fenotiazina a 10mg/ml e um laser diodo emitindo luz em 670nm. Outro sistema utilizado é o chamado Periowave® (Ondine Biopharma Corporation, Vancouver, BC, Canada) que emprega azul de metileno a 1mg/ml e

laser emitindo luz em 660nm (Andersen et al., 2007; Ge et al., 2011; Müller Campanile et al., 2013). E ainda não existe um consenso a respeito dos benefícios da PDT no tratamento periodontal.

Alguns ensaios clínicos nacionais empregaram sistemas de PDT brasileiros. Theodoro et al. (2012) utilizaram o Biowave® (Kondortech Equipment, São Carlos, SP, Brasil) que emite laser no comprimento de onda de 660nm, potência 30 mW por 150s por sítio, associado ao azul de toluidina a 0,1mg/ml para tratamento periodontal inicial coadjuvante a raspagem. Os autores não observaram benefícios clínicos adicionais do emprego da PDT, e observaram menor redução de patógenos periodontais com 180 dias de avaliação. Campos et al. (2013) empregaram o Theralase® (DMC, São Carlos, SP, Brasil), numa potência de 60mW, emitindo luz a 660 nm, associado ao azul de metileno a 10mg/ml para tratamento de bolsas residuais, e obtiveram melhores resultados clínicos no grupo que recebeu PDT adjuvante ao tratamento convencional. Balata et al. (2013) empregaram outro sistema da DMC, o Photon Lase III® (DMC, São Carlos, SP, Brasil) que emite laser num comprimento de onda de 660 nm, potência 100mW utilizado por 60 s por sítio, associado ao azul de metileno numa concentração de 0,005%. Os autores não observaram efeitos adicionais do emprego da PDT nos 1, 3 e 6 meses de avaliação.

Oliveira et al. (2007) empregaram o sistema Helbo Blue® comparado a um grupo que recebeu apenas raspagem, para tratamento de periodontite agressiva. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

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, analisadas em longo período por dados clínicos e microbiológicos com métodos quantitativos reprodutíveis.

O presente estudo propõe aplicar a PDT em sítios que receberam tratamento periodontal convencional previamente e apresentam bolsas residuais após a reavaliação.

3 PROPOSIÇÃO

Verificar a eficácia da Terapia Fotodinâmica como terapia complementar ao tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal, através da avaliação de parâmetros clínicos periodontais e quantificação de patógenos periodontais, durante 12 meses de acompanhamento.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir, as etapas do desenvolvimento do estudo.

4.1 Delineamento do estudo

Este protocolo de pesquisa foi delineado de acordo com os critérios de um ensaio clínico do CONSORT Statement (Schulz et al., 2010) e está registrado no www.clinicaltrial.gov (NTC01034501) - anexo A.

Para este ensaio clínico aleatório controlado duplo-cego paralelo, 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, um nível de significância de 5%, seriam necessários 17 sujeitos por grupo, esperando-se um desvio padrão de 1,0 mm no NCI. 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. Estes procuraram previamente atendimento odontológico nas Clínicas da Disciplina de Periodontia da FOU SP.

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.
- Índice de placa $\leq 30\%$ na reavaliação.

Critérios de exclusão

- Necessidade de antibioticoterapia profilática (Wilson et al., 2007).
- Pacientes diabéticos, fumantes, imunodeprimidos, gestantes ou lactantes.
- Uso de medicação que interfira na reparação dos tecidos periodontais, descrito na literatura.
- Tratamento periodontal prévio e/ou uso de antibiótico, nos últimos 6 meses.
- Presença de discrepâncias oclusais severas e/ou uso de aparelhos ortodônticos.
- Dentes com lesão endodôntica, dentes pilares ou retentores de próteses.
- Dentes com mobilidade grau II e III, e dentes com lesão de furca.

4.2 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FOU SP (protocolo 211/2008), anexo B. Os indivíduos que participaram deste estudo leram, entenderam e assinaram o termo de consentimento livre-esclarecido aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FOU SP (apêndice A).

4.3 Modelo experimental

Figura 4.1- Modelo experimental

4.4 Coleta de dados clínicos e microbiológicos

Os procedimentos de coleta dos parâmetros clínicos periodontais e das amostras de placa subgengival estão descritos a seguir.

4.4.1 Avaliação clínica

Os parâmetros clínicos analisados foram: índice de placa visível (IPV) (Ainamo; Bay, 1975), índice de sangramento à sondagem (IS) (Greenstein et al., 1981), profundidade clínica de sondagem (PCS) (Glavind; Löe, 1967), nível clínico de inserção (NCI) (Glavind; Löe, 1967). Para maior precisão na obtenção dos dados clínicos, uma sonda computadorizada de pressão controlada (Florida Probe System®, Florida Probe Corporation – Gainesville, FL, EUA) foi utilizada por um examinador treinado e calibrado (figura 4.2). 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 4.2 – a) Medida da distância da união esmalte-cimento à margem gengival; b) Profundidade clínica de sondagem

4.4.2 Avaliação microbiológica

O exame microbiológico foi realizado a partir das amostras de placa bacteriana subgengival coletadas das bolsas periodontais dos sítios experimentais. Para a coleta da placa subgengival, foi feito isolamento relativo dos dentes com gaze. (figura 4.3).

Figura 4.3 – Coleta de placa subgengival e *pool* de amostras

A placa bacteriana supragengival foi removida com gaze estéril, e a amostra de placa subgengival foi obtida introduzindo-se pontas de papel absorvente estéreis (Tanari #30, SP, Brasil) no interior da bolsa periodontal, sendo mantidas em posição

por 30 s (Hartroth et al., 1999). As pontas foram transferidas para o interior de microtubos de centrifugação de 1,5 ml (Axygen Scientific, CA, EUA) estéreis devidamente identificados. Os tubos contendo as amostras, em *pool* (figura 4.3), foram estocados a -20°C no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

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 forma de periograma completo através do programa Florida Probe System®.

Subsequentemente foi realizado tratamento periodontal convencional (orientação de higiene bucal, eliminação de fatores que retêm placa, raspagem e aplainamento corono-radicular). Através do 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 – EMS, 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 foram fornecidos também, e o paciente orientado a utilizá-los diariamente de maneira individualizada para cada região. A instrução de higiene e motivação eram feitas 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 – SP, Brasil) e o mesmo aparelho de ultrassom

com pontas próprias para áreas subgengivais (pontas EMS®: DS-011A, DS-16A, DS-003A, DS-011A) sob anestesia local, por um especialista em periodontia com experiência, até que fossem obtidas superfícies dentais livres de cálculo.

- 5) Revisão: realizada uma sessão para a revisão da raspagem subgengival, com o objetivo de eliminar todo o cálculo residual e, realizar controle de placa supra e subgengival de todos os sítios para desorganizar biofilme de maneira homogênea e simultânea na cavidade bucal.

Seis semanas após o término do tratamento (Segelnick; Weinberg, 2006), foi feita a reavaliação através de outro exame periodontal completo. Foram considerados sítios experimentais, aqueles que apresentaram, na reavaliação, profundidade clínica de sondagem (PCS) ≥ 5 mm, com ou sem sangramento à sondagem. 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 este critério de elegibilidade nesta fase do estudo foram excluídos da análise.

Os sujeitos foram aleatoriamente alocados para grupo teste ou controle, de acordo com uma sequência aleatória gerada por computador usando blocos de 4. 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 coleta de placa subgengival destes quatro sítios selecionados foi feita previamente ao procedimento experimental.

4.5.1 Procedimento experimental

Os pacientes foram alocados em dois grupos com diferentes intervenções, a seguir:

1. Grupo teste: Os dentes foram submetidos à terapia fotodinâmica (PDT), sob isolamento relativo com roletes de algodão:

Fotossensibilização: Irrigação subgengival em toda extensão do dente, por meio de seringa descartável desde o fundo da bolsa, com 1 ml do fotossensibilizador azul de metileno a 0,01% (Chimiolux®, Hypofarma, Belo Horizonte, MG, Brasil), o qual atuou por 5 min. (tempo pré-irradiação, de acordo com o fabricante). O excesso de corante extravasado foi lavado com água (figura 4.4).

Figura 4.4 - O fotossensibilizador é dispensado na bolsa periodontal

Irradiação: Introdução da fibra óptica (200 µm de diâmetro) no interior da bolsa periodontal, previamente demarcada com o comprimento da PCS do sítio. Acionamento do aparelho de laser diodo (Laser Hand® – MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm, potência máxima 40 mW, por 90 s, com dose de 90 J/cm², e movimentação da ponta da fibra de apical para cervical (figura 4.5).

Figura 4.5 - Irradiação com o laser

2. Grupo controle: os dentes 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).

Devido à possível perda de energia e com o intuito de padronizar a energia aplicada nos sítios estudados, antes de cada irradiação, foi usado um medidor de energia (Laser Check®, Coherent Molelectron Portland, EUA).

4.5.2 Procedimento de coleta duplo-cego

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

4.5.3 Avaliação após tratamento

Após uma semana do procedimento experimental, foi feita a segunda coleta de placa subgengival dos sítios experimentais. Essa avaliação microbiológica teve o objetivo de comparar a microbiota subgengival antes e após o procedimento experimental. O intervalo de uma semana se fez necessário para que não haja material genético de células bacterianas inviáveis, que possa ser identificado pela real time PCR logo após o procedimento experimental.

Após a reavaliação, os indivíduos tiveram consultas de controle periódico a cada 3 meses, durante 12 meses. Além da avaliação clínica e coleta de placa subgengival nos intervalos de 3, 6 e 12 meses, os grupos receberam as respectivas intervenções. Ainda, 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 2 mm, este seria excluído da análise.

4.5.4 Percepção de efeitos adversos

Através de um questionário de efeitos adversos (Apêndice B), 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 exame bucal para verificar a incidência de lesões ou eventos adversos, na cavidade bucal dos participantes. Os participantes também foram arguidos a respeito de possíveis sintomas.

4.6 Análise da microbiota subgengival

As amostras de placa subgengival foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.6.1 Extração de DNA das amostras de placa subgengival

A extração de DNA das amostras de placa subgengival foi feita através do uso de um kit de extração de DNA (QiaAmp DNA minikit® – Qiagen, Hilden, Alemanha). As amostras de placa subgengival coletadas em cones de papel e que estavam armazenadas em tubos de centrifugação (1,5 ml) no freezer a -20° C, foram esmagadas no interior do microtubo até que ficassem submersas em 200 µl de

solução tampão (PBS) e permaneceram em agitador por 12h (overnight). No fluxo laminar, uma série de reagentes (proteinase K, buffer AL, etanol, buffer AW1, AW2 e AE) foi adicionada aos tubos que passaram por centrifugação e aquecimento de acordo com o protocolo do fabricante. E, por fim, as amostras de DNA ficaram eluídas em solução tampão (buffer AE), e foram estocadas no freezer -20° C, em tubos devidamente identificados.

4.6.2 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

A detecção e quantificação das bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram realizadas a partir do material genético extraído das amostras de placa subgingival, pela PCR em tempo real utilizando sistema TaqMan® de qPCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações da PCR em tempo real foram otimizadas a partir de um protocolo anteriormente desenvolvido pelo grupo de pesquisa (Lourenção, 2010; Rodrigues et al., 2012). No volume final de 20µl foi inserido 0,5µl de cada oligonucleotídeo iniciador (*sense* e *anti-sense*), 0,5µl de sonda TaqMan®, 10,0µl de TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 6,5µl de água estéril e 2,0µl de solução de DNA da amostra. A reação de amplificação foi obtida pelo equipamento Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com as seguintes etapas: um ciclo a 95° C por 20 segundos, 40 ciclos a 95° C por 3 segundos e um ciclo a 60° C por 30 segundos.

Os iniciadores utilizados se hibridizaram a quase todas as sequências 16S do RNA ribossômico das bactérias. As especificidades dos iniciadores foram confirmadas empregando o programa BLAST do National Center for Biotechnology Information Sever (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As sondas TaqMan® foram escolhidas e avaliadas pelo Primer Express® Software Version 2.0 ABI (Rodrigues et al., 2012).

As sequências de todos os iniciadores e sondas utilizados estão na tabela 4.1.

Tabela 4.1- Sequências de iniciadores e sondas utilizadas nas reações de produção de controles internos e nas reações das amostras

Espécie bacteriana*	seqüência (5'-3')	Cepa ATCC	Número de acesso
Pg		49417	AF118634
Sense	ACC TTA CCC GGG ATT GAA ATG		
anti-sense	CAA CCA TGC AGC ACC TAC ATA GAA		
Sonda	ATG ACT GAT GAT GGT GAA AAC CGT CTT CCC TTC		
Td		33521	AJ277354
Sense	CCG AAT GTG CTC ATT TAC ATA AAG GT		
anti-sense	GAT ACC CAT CGT TGC CTT GGT		
Sonda	TGA GTA ACG CGT ATG TAA CCT GCC CGC		
Tf		43037	AM039448
Sense	AGC GAT GGT AGC AAT ACC TGT C		
anti-sense	TTC GCC GGG TTA TCC CTC		
Sonda	CCG CGA CGT GAA ATG GTA TTC CTC		
Aa		29522	AB017807
Sense	GCA GGA TCC ATA TTA AAT CTC CTT GT		
anti-sense	GCG GTC GAC AAC CTG ATA ACA GTA TT		
Sonda	CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GCC		

*Pg=Porphyromonas gingivalis, Tf=Tannerella forsythia, Td=Treponema denticola, Aa=Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Diluições seriadas (10^{10} a 10^1) do plasmídeo recombinante foram processadas pela PCR em tempo real, para a obtenção da curva padrão de cada espécie bacteriana analisada (figuras 4.6, 4.7, 4.8, 4.9). A curva padrão foi utilizada como parâmetro para quantificação de cada bactéria em cada amostra clínica. As diluições das cópias dos plasmídeos foram o controle positivo da reação, enquanto que o controle negativo foi feito pela substituição da alíquota de DNA pela mesma quantidade de água estéril.

O limite mínimo de quantificação estabelecido foi de 10 cópias, e o máximo de 10^8 para todas as espécies bacterianas, exceto para *T. denticola* que teve seu limite máximo de 10^7 . As amostras, controles positivos e negativos foram processados em triplicatas e os valores médios foram utilizados para o cálculo dos níveis bacterianos. A eficiência da reação de quantificação para a curva padrão respeitava os limites entre 110% e 90% de eficiência, com *slope* entre -3.30 e -3.52 e coeficiente de correlação $R^2 \geq 0,98$ (entre 0.99 e 1). Para que a reação seja confiável e tenha alta

eficiência, a inclinação da curva padrão deve ser próxima a -3.3 (*slope*) (Livak; Schmittgen, 2001).

Figura 4.6 – Curva padrão para a espécie *A. actinomycetemcomitans* ($R^2 = 0.99$; *slope* = -3.33)

Figura 4.7 – Curva padrão para a espécie *P. gingivalis* ($R^2 = 1$; *slope* = -3.52)

Figura 4.8 – Curva padrão para a espécie *T. forsythia* ($R^2= 1$; $slope= -3.49$)

Figura 4.9 – Curva padrão para a espécie *T. denticola* ($R^2= 0.99$; $slope= -3.50$)

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram computados, e submetidos à análise estatística utilizando o programa estatístico SPSS versão 10.0 (SPSS, IBM, Armonk, New York, USA). Foram calculadas as médias dos grupos teste e controle.

Para as variáveis PCS, NCI, IPV e IS foi utilizado um modelo linear generalizado (ANOVA de medidas repetidas e teste Newman-Keuls) para verificar se existem diferenças entre os grupos e alterações entre os tempos experimentais.

A comparação entre os grupos teste e controle, com relação à quantidade das bactérias, foi feita por meio de ANOVA de medidas repetidas, e as comparações múltiplas foram feitas com o teste de Newman-Keuls.

A frequência de sítios com aumento de PCS e sítios com aumento de NCI (perda de inserção) foi detectada pelo teste de Fischer. E a frequência de sítios sem alteração de PCS e NCI, e com redução de PCS e NCI (ganho de inserção) foi detectada pelo teste do qui-quadrado.

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%. A análise foi realizada segundo a intenção de tratar. O desfecho primário foi considerado NCI, enquanto que as outras variáveis (PCS, IPV, IS e quantidade de bactérias, efeitos adversos) foram consideradas desfechos secundários.

5 RESULTADOS

Durante o período de recrutamento, de março de 2010 a agosto de 2012, foram examinados 483 voluntários; destes 86 indivíduos foram recrutados para o tratamento periodontal convencional (fase pré-estudo), de acordo com os critérios de elegibilidade. Depois da reavaliação periodontal, 38 pacientes foram incluídos e 34 completaram os 12 meses de acompanhamento; quatro participantes foram perdidos no seguimento (Figura 5.1).

Figura 5.1- Fluxograma dos participantes da pesquisa

A média de idade dos 34 participantes da pesquisa que completaram 12 meses de acompanhamento foi $48,22 \pm 9,52$ anos para o grupo teste e $51,88 \pm 8,13$ para o grupo controle. O intervalo da idade dos pacientes estava entre 35 e 68 anos. Havia 11 mulheres e sete homens no grupo teste e, seis mulheres e dez homens no grupo controle (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Características demográficas dos participantes (média e desvio padrão)

Variáveis	Grupo Teste (n=18)	Grupo Controle (n=16)
Idade (anos)	48,22 $\pm$ 9,52	51,88 $\pm$ 8,13
Gênero feminino (%)	11 (61,1)	6 (37,5)

*diferença inter-grupos significativa a 5% (ANOVA)

Tabela 5.2 – Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS, NCI, IPV e IS

BOCA TODA		Pré estudo	Reavaliação			
PCS (mm)	Teste (n=18)	3,58 ± 1,09	2,68 ^A ± 0,58			
	Controle (n=16)	3,45 ± 0,98	2,78 ^A ± 0,92			
	P	0,66	0,72			
NCI (mm)	Teste (n=18)	4,17 ± 1,15	3,36 ^A ± 0,72			
	Controle (n=16)	4,29 ± 1,18	3,99 ^A ± 1,37			
	P	0,74	0,09			
IPV (%)	Teste (n=18)	54,21 ± 23,50	18,26 ^A ± 8,86			
	Controle (n=16)	47,11 ± 27,82	12,21 ^A ± 8,22			
	P	0,25	0,33			
IS (%)	Teste (n=18)	45,42 ± 23,07	16,00 ^A ± 9,97			
	Controle (n=16)	37,63 ± 23,40	12,89 ^A ± 7,64			
	P	0,17	0,58			
SÍTIOS EXPERIMENTAIS		Reavaliação	3m	6m	12m	Diferença reavaliação-12 meses
PCS (mm)	Teste (n=18)	4,79 ± 0,47	3,70 ^A ± 0,85	3,41 ^A ± 0,93	3,55 ^A ± 0,92	1,24
	Controle (n=16)	4,87 ± 0,74	3,39 ^A ± 0,76	3,48 ^A ± 0,70	3,23 ^A ± 0,77	1,64
	P	0,75	0,76	0,80	0,75	
NCI (mm)	Teste (n=18)	5,56 ± 0,83	4,61 ^A ± 1,13	4,44 ^A ± 1,06	4,60 ^A ± 1,11	0,96
	Controle (n=16)	5,87 ± 1,39	4,78 ^A ± 1,44	4,78 ^A ± 1,44	4,33 ^A ± 1,21	1,54
	P	0,46	0,68	0,92	0,79	
IPV (%)	Teste (n=18)	18,05 ± 23,95	12,50 ± 22,08	16,67 ± 21,00	12,50 ± 17,68	5,55
	Controle (n=16)	18,75 ± 29,58	10,93 ± 18,18	09,33 ± 12,50	6,25 ± 19,36	12,5
	P	0,92	0,97	0,85	0,82	
IS (mm)	Teste (n=18)	58,33 ± 29,70	19,44 ^A ± 21,95	31,94 ^A ± 29,46	23,61 ^A ± 21,82	34,72
	Controle (n=16)	42,18 ± 19,83	17,18 ^A ± 23,66	23,43 ^A ± 19,29	15,63 ^A ± 22,13	26,55
	P	0,06	0,78	0,55	0,86	

^A diferença intra-grupo significativa em relação ao baseline (Newman-Keuls test)

A tabela 5.2 mostra que o tratamento periodontal promoveu redução de PCS, ganho clínico de inserção, redução no índice de placa e redução no número de sítios com sangramento a sondagem nos dois grupos, antes do tratamento experimental. As alterações nos dois grupos foram significativas. Não houve diferença entre os grupos para qualquer parâmetro.

Após a reavaliação, foi observada redução significativa de PCS após 3, 6 e 12 meses. A diferença entre a reavaliação e 12 meses foi de 1,24 mm no grupo teste (PDT) e de 1,64 mm no grupo controle (sham). Não houve diferença entre os grupos com relação às médias de PCS em qualquer momento do estudo.

Também foi observado ganho clínico de inserção significativo nos dois grupos, comparando-se a reavaliação com os exames de 3, 6 e 12 meses. No grupo teste foi observado ganho de inserção de 0,96 mm, e no grupo controle um ganho de 1,54 mm. Não houve diferença entre os grupos com relação às médias de NCI em qualquer momento do estudo.

Houve uma pequena e não significativa redução de IPV nos dois grupos, sem diferenças entre os grupos. Com relação a IS, uma redução significativa foi verificada nos dois grupos, porém sem diferenças inter-grupos.

Tabela 5.3 – Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS e NCI: bolsas moderadas

			Reavaliação	3 meses	6 meses	12 meses
PCS (mm)	Teste (n=18)	Média ± DP	4,60 ± 0,40	3,53 ^A ± 0,76	3,31 ^A ± 0,85	3,32 ^A ± 0,96
	Controle (n=16)	Média ± DP	4,76 ± 0,50	3,31 ^A ± 0,71	3,49 ^A ± 0,69	3,24 ^A ± 0,77
	p		0,53	0,80	0,88	0,98
NCI (mm)	Teste (n=18)	Média ± DP	5,37 ± 0,68	4,45 ^A ± 1,07	4,26 ^A ± 0,95	4,33 ^A ± 1,03
	Controle (n=16)	Média ± DP	5,76 ± 1,15	4,71 ^A ± 1,33	4,81 ^A ± 1,43	4,50 ^A ± 1,43
	p		0,33	0,79	0,73	0,90

^A diferença intra-grupo significativa em relação ao baseline (Newman-Keuls test)

Quando avaliadas apenas as bolsas que apresentavam PCS moderada (PCS entre 4 e 6 mm) no exame de reavaliação, observou-se redução de PCS e ganho de inserção significativos após 3, 6 e 12 meses nos dois grupos. Não houve diferença entre os grupos em nenhum momento do estudo (tabela 5.3).

Tabela 5.4 – Média, desvio padrão (DP) em mm e comparação dos grupos experimentais com relação à PCS e NCI: bolsas profundas

			Reavaliação	3 meses	6 meses	12 meses
PCS (mm)	Teste (n=5)	Média $\pm$ DP	7,20 $\pm$ 0,44	6,20 $\pm$ 1,64	5,40 $\pm$ 1,51	6,60 $\pm$ 1,14
	Controle (n=2)	Média $\pm$ DP	7,00 $\pm$ 0,00	3,50 ^A $\pm$ 2,12	2,50 ^A $\pm$ 0,70	2,50 ^A $\pm$ 0,70
	p		0,88	0,67	0,13	0,14
NCI (mm)	Teste (n=5)	Média $\pm$ DP	8,40 $\pm$ 1,34	7,00 $\pm$ 1,00	7,00 $\pm$ 1,41	8,20 $\pm$ 1,30
	Controle (n=2)	Média $\pm$ DP	7,00 $\pm$ 0,00	3,50 ^A $\pm$ 2,12	3,00 ^A $\pm$ 1,41	2,50 ^A $\pm$ 0,70
	p		0,88	0,67	0,13	0,14

^A diferença intra-grupo significativa em relação ao baseline (Newman-Keuls test)

Quando avaliadas apenas as bolsas que apresentavam PCS severa ($PCS \geq 7$ mm) na reavaliação, observou-se redução de PCS nos dois grupos. O grupo teste apresentou uma redução não significativa de 0,60 mm (reavaliação-12meses). No grupo controle foi observada redução significativa após 3, 6 e 12 meses (4,50 mm). No entanto, não houve diferença entre os grupos (tabela 5.4).

Houve um ganho de inserção não significativo de 0,2 mm no grupo teste, enquanto que o grupo controle apresentou ganho significativo de 4,50 mm após 12 meses (tabela 5.4).

Tabela 5.5 – Extensão (número de sítios) com aumento de PCS, sem redução de PCS, com redução de PCS de até 2mm, com redução de PCS de 3mm ou mais, com perda de inserção, sem ganho de inserção, ganho de inserção de até 2mm e com ganho de inserção de 3mm ou mais, entre os exames de reavaliação e 12 meses

Extensão (n e % de sítios)	PCS				NCI			
	com aumento	sem alteração	com redução até 2mm	com redução 3mm ou mais	com perda	sem alteração	com ganho de até 2mm	com ganho de 3mm ou mais
Teste (n=72 sítios)	06 (8,3%)	16 (22,2%)	36 (50%)	14 (19,4%)	08 (11,1%)	20 (27,8%)	33 (45,8%)	11 (15,3%)
Controle (n=64 sítios)	04 (6,2%)	09 (14,1%)	35 (54,7%)	16 (25%)	07 (10,9%)	12 (18,7%)	29 (45,3%)	16 (25%)
p	0,44 ^A	0,31 ^B	0,70 ^B	0,56 ^B	0,59 ^A	0,30 ^B	0,92 ^B	0,22 ^B

^A teste de Fisher

^B teste do qui-quadrado

No grupo teste, dentre os 72 sítios experimentais, 22,2% não apresentaram alteração em PCS entre a reavaliação e o exame de 12 meses; 50% tiveram redução de até 2 mm, e 19,4% apresentaram redução de 3mm ou mais e 8,3%

tiveram aumento de PCS. No grupo controle, a porcentagem de sítios sem alteração, com redução de até 2 mm, com redução de 3 mm ou mais e com aumento de PCS foi respectivamente de 14,1%, 54,7%, 25% e 6,2%. Não houve associação significativa entre grupo e número de sítios em cada uma das categorias acima (tabela 5.5).

Com relação à NCI, o grupo teste apresentou 27,8% de sítios sem alteração após 12 meses, 45,8% com ganho de até 2 mm, 15,3% com ganho de 3 mm ou mais, e 11,1% com perda de NCI. Por sua vez, no grupo controle, foram observados 18,7% de sítios sem alteração após 12 meses, 45,3% de sítios com ganho de até 2 mm, 25% de sítios com ganho de 3mm ou mais e 10,9% com perda de NCI. Também não houve associação significativa entre grupo e número de sítios em cada uma das categorias acima (tabela 5.5).

Tabela 5.6 – Média, desvio padrão e comparação entre os grupos com relação à quantidade de cópias *Aa*, *Pg*, *Tf* e *Td* (transformação logarítmica na base de 10)

			Reavaliação	7 dias	3 meses	6 meses	12 meses
Aa	Teste (n=18)	Média ± DP	4,09 ± 0,83	4,42 ± 0,96	4,52 ± 1,06	3,98 ± 0,97	4,71 ± 1,04
	Controle (n=16)	Média ± DP	4,74 ± 1,34	4,76 ± 1,20	4,50 ± 1,51	4,00 ± 1,09	4,42 ± 1,43
	p		0,67	0,95	0,96	0,97	0,95
Pg	Teste (n=18)	Média ± DP	2,32 ± 2,10	2,15 ± 1,92	2,83 ± 1,67	2,69 ± 1,67	3,59 ^A ± 1,92
	Controle (n=16)	Média ± DP	1,30 ± 1,63	1,45 ± 1,89	1,79 ± 2,11	1,44 ± 1,65	1,93 ± 2,16
	P		0,69	0,70	0,57	0,47	0,11
Tf	Teste (n=18)	Média ± DP	2,80 ± 1,63	2,00 ± 1,33	1,85 ± 1,37	1,29 ^A ± 1,26	1,99 ± 1,43
	Controle (n=16)	Média ± DP	2,22 ± 1,76	1,49 ± 1,59	1,53 ± 1,42	1,39 ± 1,33	1,83 ± 1,50
	P		0,25	0,91	0,80	0,83	0,95
Td	Teste (n=18)	Média ± DP	3,45 ± 2,32	2,92 ± 1,79	3,57 ± 2,03	3,18 ± 2,60	4,38 ± 2,58
	Controle (n=16)	Média ± DP	2,96 ± 2,33	2,78 ± 2,45	3,97 ± 2,13	3,06 ± 2,24	4,20 ± 2,75
	p		0,92	0,85	0,62	0,88	0,82

^A diferença intra-grupo significativa em relação a reavaliação

Aa=*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pg*=*Porphyromonas gingivalis*, *Tf*=*Tannerella forsythia*, *Td*=*Treponema denticola*

Não houve alteração na quantidade de *A. actinomycetemcomitans* ao longo do tempo, tanto no grupo experimental como controle. Não houve diferença entre os grupos com relação às médias de *A. actinomycetemcomitans* em qualquer momento do estudo (tabela 5.6).

Com relação à *P. gingivalis*, no grupo teste foi observado aumento significativo na quantidade desta espécie bacteriana, entre a reavaliação e o exame

de 12 meses. No grupo controle houve um aumento não significativo estatisticamente ao longo do tempo, porém na média, não houve diferença entre os grupos em qualquer momento do estudo (tabela 5.6).

No grupo teste foi verificada diminuição significativa de *T. forsythia* entre a reavaliação e o exame de 6 meses, seguida de um novo aumento aos 12 meses, porém sem atingir os valores iniciais. No grupo controle também foi observada uma redução, embora não significativa, entre a reavaliação e o exame de 6 meses, seguida por um novo aumento. Não houve diferença entre os grupos em qualquer momento do estudo (tabela 5.6).

Com relação aos níveis de *T. denticola*, tanto no grupo teste como no controle foi observada uma redução inicial não significativa, seguida de um aumento não significativo até os 12 meses. Não houve diferença entre os grupos em qualquer momento do estudo (tabela 5.6).

Tabela 5.7 – Média e desvio padrão da escala EVA nos grupos teste e controle (medidas em cm)

	Reavaliação	7 dias	3 meses	6 meses	9 meses
Teste (n=18)	1,47 ± 1,84	0,47 ± 1,26	1,11 ± 1,17	0,92 ± 1,30	1,03 ± 1,45
Controle (n=16)	1,00 ± 1,49	0,13 ± 0,47	0,45 ± 0,64	0,69 ± 0,77	0,62 ± 1,01
P (teste t)	0,39	0,28	0,04*	0,54	0,34

* significativo ao nível alfa de 5%

Houve diferença significativa na escala EVA entre os grupos aos 3 meses (p=0,04) (tabela 5.7).

5.1 Análise secundária

A tabela 5.8 mostra uma análise secundária dos resultados, onde foram incluídos apenas os sítios que apresentavam sangramento à sondagem e PCS maior ou igual a 5 mm na reavaliação.

Tabela 5.8 – Média e desvio padrão dos sítios com sangramento á sondagem e PCS maior ou igual a 5 mm na reavaliação

		Reavaliação	3 meses	6 meses	12 meses	p
PCS	Teste (n=14)	5.70 ± 0.78	4.20 ^A ± 1.77	4.29 ^A ± 1.67	4.13 ^A ± 2.08	0.04
(mm)	Controle (n=14)	5.42 ± 0.75	3.84 ^A ± 1.56	3.42 ^A ± 1.55	3.40 ^A ± 1.23	<0.001
	p	0.34	0.57	0.17	0.26	
NCI	Teste (n=14)	6.39 ± 1.50	4.83 ^A ± 1.68	5.08 ^A ± 1.72	6.39 ± 1.50	-
(mm)	Controle (n=14)	6.89 ± 1.44	5.09 ^A ± 1.99	5.30 ^A ± 2.18	7.14 ± 1.56	0.47
	p	0.38	0.71	0.77	0.19	
IP	Teste (n=14)	05.35 ± 20.04	01.78 ± 6.68	01.78 ± 6.68	00.00 ± 00.00	0.33
(%)	Controle (n=14)	19.64 ± 36.92	25.00 ± 42.74	07.14 ± 26.72	00.00 ± 00.00	0.07
	p	0.21	0.06	0.47	-	
SS	Teste (n=14)	100.00 ± 00.00	17.85 ^A ± 31.66	37.50 ^A ± 40.13	37.50 ^A ± 44.66	<0.001
(%)	Controle (n=14)	100.00 ± 00.00	23.21 ^A ± 42.13	16.07 ^A ± 36.17	14.28 ^A ± 36.31	<0.001
	p	-	0.70	0.15	0.14	

^A diferença intra-grupo significativa em relação a reavaliação

Uma redução significativa em PCS foi observada no grupo teste (p=0,04) e no grupo controle (p<0.001). No entanto, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados (p>0.05).

Em relação ao NCI, não houve alteração significativa ao longo do tempo no grupo teste, e no grupo controle houve um aumento não significativo. Não houve diferença entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados (p>0.05).

Não houve alteração significativa ao longo do tempo em relação a IP, entre os grupos. Em relação a sangramento à sondagem, uma redução significativa foi observada em ambos os grupos (p<0.001), porém, sem diferença entre eles.

Figura 5.2 – Frequência de redução das bolsas

A figura 5.2 mostra a análise de frequência de redução de bolsa, dos sítios com sangramento à sondagem e PCS maior ou igual a 5 mm na reavaliação. O grupo teste demonstrou menor frequência de sítios com bolsas maiores que 4 mm ao longo do tempo, ou seja, maior redução de bolsas, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), pelo teste do qui-quadrado.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da PDT no tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal. Após avaliação clínica e microbiológica, feitas aos 3, 6 e 12 meses de acompanhamento, a hipótese de que a PDT traria benefícios adicionais ao tratamento não cirúrgico de bolsas residuais foi rejeitada. Áreas com limitações de acesso à instrumentação durante o tratamento periodontal não cirúrgico, como bolsas profundas, requerem alguma complementação terapêutica, e ainda assim as bolsas residuais representam maior dificuldade para obtenção de melhores resultados quando comparados a sítios ainda não tratados (Badersten et al., 1984). Tal dificuldade já foi demonstrada por estudos que utilizaram antimicrobianos em gel no interior nas bolsas residuais (Eickholz et al., 2005; McColl et al., 2006).

O presente estudo demonstrou melhoras significativas em todos os parâmetros clínicos avaliados na fase pré-estudo, em que o tratamento não-cirúrgico de remoção de cálculo e biofilme foi empregado em pacientes com periodontite crônica, conforme estudos clássicos anteriores (Badersten et al., 1981; Badersten et al., 1984; Badersten et al., 1987). Após a reavaliação, quando o protocolo experimental foi empregado e a hipótese do estudo testada, também foram observadas melhoras significativas nos parâmetros clínicos avaliados a cada 3 meses ao longo dos 12 meses de acompanhamento, em ambos os grupos experimentais, porém sem diferenças significativas entre eles. O índice de sangramento à sondagem reduziu 34,72% no grupo teste e 26,55% no grupo controle, embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos (Tabela 5.2). A PDT demonstrou resultado mais favorável em relação a esta variável que reflete inflamação tecidual e pode ser um preditor de perda de inserção adicional (Lang et al., 1990). Em relação às variáveis PCS e NCI, quando avaliadas em bolsas moderadas, cuja PCS na reavaliação variava entre 4 a 6 mm, houve redução da profundidade ao longo do tempo, mas sem diferença entre os grupos (Tabela 5.3). Ao avaliar as bolsas severas, cuja PCS na reavaliação era maior ou igual a 7 mm, o grupo teste não apresentou redução significativa quando comparado aos 12 meses, tampouco houve ganho de inserção significativo, diferentemente do grupo controle que mostrou redução de PCS e ganho de NCI significativos aos 3, 6 e 12 meses de

análise (Tabela 5.4). Ainda, ao analisar os sítios experimentais em relação à alteração da PCS e NCI, dentro das categorias estabelecidas, não houve associação entre grupo e o número de sítios em cada categoria, ou seja, o comportamento dos sítios foi semelhante tanto no grupo teste como no grupo controle (Tabela 5.5). Portanto, os resultados clínicos deste estudo demonstram que o uso da PDT, neste protocolo de utilização de acordo com o fabricante à época de desenvolvimento deste projeto de pesquisa, não trouxe benefícios adicionais no tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal. Mesmo com a análise secundária, onde apenas sítios com sangramento à sondagem e PCS maior ou igual a 5 mm na reavaliação, foram incluídos (Tabela 5.8 e figura 5.2), não houve diferença entre os grupos ao longo do estudo.

Nossos resultados clínicos vão de encontro aos resultados de alguns estudos que avaliaram a PDT em bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal. Rühling et al. (2010), Polansky et al. (2009) e Chondros et al. (2009) aplicaram uma única vez a PDT em bolsas residuais, e não observaram diferenças significativas nos parâmetros clínicos entre os grupos que receberam PDT e os grupos que receberam raspagem com ultrassom, embora o último estudo tenha observado diferença significativa favorável à PDT em relação a sangramento à sondagem. Cappuyns et al. (2012) também não observaram melhores resultados clínicos da PDT em 6 meses de acompanhamento, quando comparada com instrumentação subgingival com curetas, ambos os grupos receberam debridamento com ultrassom prévio à intervenção. O estudo de Cappuyns et al. (2012) é o que mais se aproxima aos parâmetros do laser utilizados no presente estudo (660 nm, 40 mW), o que permite melhor comparação entre os resultados dos dois estudos. No presente estudo foram realizadas 4 aplicações de PDT como tratamento de manutenção, uma a cada 3 meses. Por outro lado, Lulic et al. (2009) aplicaram 5 vezes a PDT num intervalo menor entre as aplicações e obtiveram resultados satisfatórios em todos os parâmetros analisados quando comparados ao controle que recebeu apenas irradiação, mas tal estudo incluiu apenas 10 pacientes. Campos et al. (2013) observaram maior redução de PCS e sangramento à sondagem no grupo que recebeu PDT após a instrumentação com curetas, em 3 meses de análise de apenas 13 pacientes. Müller Campanile et al. (2013) também demonstraram maior redução de bolsa no grupo que recebeu duas aplicações de PDT seguidas de instrumentação ultrassônica, quando comparado aos grupos que receberam uma

aplicação de PDT ou nenhuma, na avaliação de 27 pacientes em 3 meses . E ainda, Mongardini et al. (2014) observaram maior redução da PCS no grupo que recebeu PDT seguida da raspagem subgengival, em uma semana de avaliação. Este tempo de avaliação não é comparável aos dos estudos longitudinais mencionados anteriormente, inclusive o presente estudo, já que uma semana é precoce para avaliação de resultados clínicos (Segelnick; Weinberg, 2006). Portanto os estudos que demonstraram benefício clínico adicional da PDT no tratamento de bolsas residuais apresentaram de alguma forma limites metodológicos (número de pacientes ou tempo de avaliação) para extrapolarmos suas conclusões.

Ainda assim, o tempo para reavaliação dos pacientes foi considerado uma limitação deste trabalho (Segelnick; Weinberg, 2006). Uma vez que, melhoras significativas foram observadas em todos os parâmetros clínicos periodontais em ambos os grupos depois da reavaliação. Portanto, podemos inferir que os tecidos periodontais ainda estavam em fase de reparação depois de 6 semanas do término do tratamento periodontal inicial, considerado um tempo insuficiente para reavaliação dos pacientes.

Em relação aos resultados da avaliação microbiológica, a melhor condição obtida no presente estudo foi para a espécie bacteriana *T. forsythia*, que apresentou uma redução, ainda que não significativa estatisticamente, nos dois grupos. Para *T. denticola* houve uma redução inicial não significativa, seguida de um aumento aos 12 meses, nos dois grupos. Para *P. gingivalis* houve um aumento significativo desta espécie aos 12 meses, no grupo teste. Para *A. actinomycetemcomitans* não houve alteração em nenhum momento do estudo e em nenhum grupo. Dessa maneira, este estudo mostrou que, dentro dos parâmetros utilizados, a PDT não acrescentou benefícios aos sítios experimentais em relação à quantidade de patógenos periodontais avaliados. Outros estudos, que utilizaram técnicas de quantificação de micro-organismos por sonda de DNA pela PCR real time, corroboram nossos resultados. Polansky et al. (2009) observaram redução significativa de *P. gingivalis*, porém sem diferença entre os grupos, e para *T. denticola* e *T. forsythia* não houve diferença significativa na redução em nenhum dos grupos. Para Müller Campanile et al. (2013) não houve redução significativa de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. intermedia* e *P. micra* em nenhum dos grupos em 3 e 6 meses. Rühling et al. (2010) mostraram redução significativa de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. intermedia* e *F.*

nucleatum imediatamente após a PDT, porém retornaram aos níveis iniciais na avaliação de 3 meses. Para Chondros et al. (2009), a quantidade de *T. denticola* aumentou significativamente no grupo teste aos 3 e 6 meses, *A. actinomycetemcomitans* reduziu não significativamente apenas no grupo controle aos 6 meses. Para *P. gingivalis* a redução - não significativa - foi maior no grupo controle aos 6 meses. Mongardini et al. (2014) apresentaram maior redução significativa no grupo teste apenas para *F. nucleatum*, embora todos os outros patógenos avaliados tivessem suas quantidades reduzidas nos dois grupos, em uma semana de avaliação. Por outro lado, Cappuyns et al. (2012) observaram benefícios adicionais da PDT na redução significativa de *P. gingivalis*, *T. denticola*, e *T. forsythia* em 2 semanas de avaliação.

É importante ressaltar que as condições clínicas como tempo de atuação e concentração do fotossensibilizador nos tecidos, alteração do pH e presença de exsudato e fluido gengival no ambiente subgengival, podem influenciar na atuação da PDT (Wilson, 2004). Dessa maneira, os resultados promissores da eliminação dos patógenos periodontais com PDT dos estudos *in vitro* (Dobson; Wilson, 1992; Sarkar; Wilson, 1993; Chan; Lai, 2003; Kömerick et al., 2003; Souza, 2007; Prates et al., 2007; Qin et al., 2008; Fontana et al., 2009) não têm sido tão evidentes no emprego da PDT em bolsas periodontais, de maneira geral. Tanto em bolsas residuais como em tratamentos iniciais, os resultados clínicos e microbiológicos da utilização da PDT ainda são controversos (Andersen et al., 2007; Braun et al., 2008; Chondros et al., 2009; Christodoulides et al., 2008; Polansky et al., 2009; Lulic et al., 2009; Ge et al., 2011; Sigush et al., 2010; Cappuyns et al., 2012; Müller Campanile et al., 2013). A comparação entre os diversos estudos, para buscar um melhor entendimento de resultados semelhantes ou mesmo controversos, é dificultada pela vasta quantidade de protocolos de aplicação da PDT como diferentes parâmetros do laser, diferentes fotossensibilizadores e concentrações, e pelas diferenças em condições clínicas periodontais e tratamentos periodontais empregados.

No presente estudo, a amostragem da placa subgengival para análise em PCR real time foi feita em *pool*, da mesma forma que outros estudos anteriores discutidos (Chondros et al., 2009; Polansky et al., 2009; Rühling et al., 2010). Este tipo de coleta pode limitar a análise individual de cada sítio na comparação dos dados clínicos na evolução do estudo, como foi mostrado nas Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5. Portanto, a análise microbiológica está relacionada com os dados clínicos do

indivíduo como unidade estatística, conforme analisados na Tabela 5.2, em que a média dos sítios representa o indivíduo.

O grupo controle, deste estudo, recebeu uma simulação da PDT (procedimento sham), além do controle de placa supragengival nos sítios experimentais e cuidados de manutenção periodontal para estes pacientes (Gomes et al., 2008). Com base em estudos anteriores (Wilson et al., 1993; Chan; Lai, 2003; Sarkar; Wilson, 1993; Qin et al., 2008; Almeida et al., 2007; Sharman et al., 1999) que demonstraram a ineficiência da irrigação com fotossensibilizador sem irradiação na redução de patógenos periodontais, não foi incluído um grupo com apenas irrigação de fotossensibilizador nem apenas irradiação com laser.

Para a escolha do fotossensibilizador e aparelho de laser utilizados levou-se em consideração que, no momento da elaboração do projeto de pesquisa, o fotossensibilizador disponível no mercado era o azul de metileno na concentração de 0,01%, e sabe-se que o pico de absorção de energia para o azul de metileno se dá com a emissão do laser no comprimento de onda de 660 nm (Souza, 2007; Núñez, 2007). A opção do aparelho de laser nacional foi feita também devido ao sistema de irradiação do laser com fibra óptica, o que facilitaria o acesso ao interior das bolsas periodontais, reforçando a hipótese de que traria uma significativa redução da carga microbiana e consequente reparação tecidual mais rápida. Na prática, a fibra ótica se mostrou de difícil inserção e movimentação em bolsas nas faces linguais, principalmente nos sítios distais de dentes posteriores.

Em relação aos efeitos adversos (Tabela 5.7), embora a análise estatística tenha mostrado diferença significativa aos 3 meses de estudo, os valores na escala EVA são muito próximos ao valor zero (11 mm), e nenhum paciente solicitou anestesia para irrigação do fotossensibilizador ou irradiação com o laser. Assim, podemos inferir que o grau de desconforto dos pacientes em ambos os grupos foi muito baixo, o que assegura a PDT livre de eventos adversos, como já observado em estudos anteriores (Cappuyns et al., 2012; Müller Campanile et al., 2013).

Dessa maneira, este estudo mostrou que a PDT, quando utilizada dentro dos parâmetros descritos, falhou em apresentar eficácia no tratamento de bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal. Tal fato não descarta a hipótese de que a PDT pode ser benéfica no tratamento da periodontite, mas ainda não foram encontrados protocolos ideais para sua aplicação no ambiente subgengival.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, foram observadas melhoras clínicas em todos os parâmetros avaliados em ambos os grupos. Porém, não foram encontrados benefícios adicionais com o uso da PDT, no protocolo utilizado, para tratamento de bolsas residuais tanto nos parâmetros clínicos como nos níveis de patógenos periodontais avaliados.

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;59:222-30.

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

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.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. Laser Surg Med. 2001;29(2):179-84.

Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planning. J Clin Dent. 2007;18(2):34-8.

Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. Lasers Med Sci. 2010 Jul;25(4):605-13.

Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. J Periodontol. 2010 Jan;81(1):4-14.

Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. J Clin Periodontol. 1981 Feb;8(1):57-72.

¹ De acordo com estilo Vancouver

Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1984 Jan;11(1):63-76.

Badersten A, Niveus R, Egelberg J. 4-year observations of basic periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1987 Sep;14(8):438-44.

Balata ML, Andrade LP, Santos DB, Cavalcanti AN, Tunes Uda R, Ribeiro Édel P, Bittencourt S. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci*. 2013 Mar-Apr;21(2):208-14.

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol*. 1998 Sep;68(3):370-6.

Bogren A, Teles RP, Torresyap G, Haffajee AD, Socransky SS, Wennström JL. Locally delivered doxycycline during supportive periodontal therapy: a 3-year study. *J Periodontol*. 2008;79:827-35.

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.

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.

Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou , Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Laser Med Sci*. 2012 Sep; 27(5):979-86. doi: 10.1007/s10103-011-1027-6.

Cargnelutti T. Estudo comparativo da influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana e da remoção mecânica de biofilme no processo periodontal inflamatório induzido em hamsters [dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2007.

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

Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2009;24:681-8.

Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2008;79:1638-44.

Claffey N, Nylund K, Kiger, Garrett S, Egelberg J. Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth for probing attachment loss. 3 ½ years of observation following initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1990;17:108-14.

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

Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 2:6-16.

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

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2008;24:885-91.

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.

Eickholz P, Kim TS, Schacher B, Reitmeir P, Bürklin T, Ratka-Krüger P. Subgingival topical doxycycline versus mechanical debridement for supportive periodontal therapy: a single blind randomized controlled two-center study. *Am J Dent*. 2005 Dec;18(6):341-6.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, Boussios CI, Kent R, Goodson JM, Tanner AC, Soukos NS. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009 Dec;44(6):751-9.

Garcia VG, de Lima MA, Okamoto T, Milanezi LA, Júnior EC, Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. *Lasers Med Sci.* 2010 Mar;25(2):221-8.

Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, Xie Y, Liu D. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planning in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:33-7.

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

Gomes SC, Nonnenmacher C, Susin C, Oppermann RV, Mutters R, Marcantonio RA. The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2008 Dec;79(12):2297-304.

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.

Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14:326-30.

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.

Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol.* 1996;67(2):93-102.

Kömerick N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence of Gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000;72(5):676-80.

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.

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

Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol.* 1990 Nov;17(10):714-21.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analyses of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36(3):177-87.

Lourenção DS. Detecção e quantificação de bactérias no biofilme subgingival de indivíduos com diferentes formas de doença periodontal [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG, Lin J, Zhou CN. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci.* 2009 Mar;24(2):162-6.

Lulic M, Leiggener Gorog I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009 Aug;36(8):661-6.

Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):428-35.

Matuliene G, Pjetursson BE, Salvi GE, Schmidlin K, Brägger U, Zwahlen M, Lang NP. The influence of residual pockets on progression of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8):685-95.

McColl E, Patel K, Dahlen G, Tonetti M, Graziani F, Suvan J, Laurell L. Supportive periodontal therapy using mechanical instrumentation or 2% minocycline gel: a 12 month randomized, controlled, single masked pilot study. *J Clin Periodontol*. 2006 Feb;33(2):141-50.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 2005;79:159-70.

Mongardini C, Di Tanna GL, Pilloni A Light-activated disinfection using a light-emitting diode lamp in the red spectrum: clinical and microbiological short-term findings on periodontitis patients in maintenance. A randomized controlled split-mouth clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):1-8.

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. Doi:10.1007/s10103-013-1337-y.

Núñez SC. Estudo da dinâmica da fotoagregação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação a eficiência fotodinâmica [tese]. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2007.

Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol*. 2007 Jun;78(6):965-73.

Oliveira RR, Novaes Jr AB, Garlet GP, Souza RF, Taba Jr M, Sato S, Souza SLS, Palioto DB, Grisi MFM, Feres M. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Laser Med Sci*. 2011;26:359-67.

Paolantonio M, D'Angelo M, Grassi RF, Perinetti G, Piccolomini R, Pizzo G, Annunziata M, D'Archivio, D'Ercole S, Nardi G, Guida L. Clinical and microbiologic effects of subgingival controlled-release delivery of chlorhexidine chip in the treatment of periodontitis: a multicenter study. *J Periodontol*. 2008;79:271-82.

Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodonto.l* 2002;28:56-71.

Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004 Oct;75(10):1343-9.

Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009 Jul;36(7):575-80.

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 Dec;29(12):835-44.

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.

Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 2001;28(6):499-507.

Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, Steenberghe D. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res.* 2005;84(4):340-4.

Rateitschack-Pluss EM, Schwartz JP, Guggenheim R, Duggelin M, Rateitschak KH. Non-surgical periodontal treatment: Where are the limits? An SEM study. *J Clin Periodontol* 1992;19:240-244.

Ratka-Krüger P, Schacher B, Bürklin T, Böddinghaus B, Holle R, Renggli HH, Eickholz P, Kim TS. Non-surgical periodontal therapy with adjunctive topical

doxycycline: a double-masked, randomized, controlled multicenter study. II. Microbiological results. J Periodontol. 2005;76:66-74.

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; discussion 90-1.

Rodrigues AS, Lourenção DS, Lima Neto LG, Pannuti CM, Hirata RD, Hirata MH, Lotufo RF, De Micheli G. Clinical and microbiologic evaluation, by real-time polymerase chain reaction, of non-surgical treatment of aggressive periodontitis associated with amoxicillin and metronidazole. J Periodontol. 2012 Jun;83(6):744-52.

Rühling A, Fanghänel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, Kocher T. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. Clin Oral Investig. 2010 Dec;14(6):637-44.

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.

Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapies: Basic principles and clinical applications. Drug Discov Today. 1999;4:507-17.

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

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

Sigush BW, Engelbrecht M, Völpe A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum* – infected periodontal patients. J Periodontol. 2010;81:975-81.

Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R, Monaco A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol. 2013 May;40(5):514-26.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutics targets. *Periodontology* 2000. 2002;28:12-55.

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.

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]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Sperandio FF, Simões A, Aranha AC, Corrêa L, Orsini Machado de Sousa SC. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. *Photomed Laser Surg*. 2010 Oct;28(5):581-7.

Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ*. 2010;340:c332.

Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GHG, Pontes AEF, Zuza EP, Spolidório DMP, Toledo EBC, Garcia VG. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Laser Med Sci*. 2012;27(4):687-93. doi10.1007/s10103-011-0942-x.

Tonetti MS, Claffey N. 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;79:431-9.

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

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;25:536-41.

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.

Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, Bolger A, Cabell CH, Takahashi M, Baltimore RS, Newburger JW, Strom BL, Tani LY, Gerber M, Bonow RO, Pallasch T, Shulman ST, Rowley AH, Burns JC, Ferrieri P, Gardner T, Goff D, Durack DT. Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 2007 Oct 9;116(15):1736-54.

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;22:241-47.

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 ultrassônicos 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 ultrassom, 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 subsequentes 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. Prof. 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 - Questionário de efeitos adversos

QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS

Nome: _____ data: _____

☐ baseline ☐ 7 dias ☐ 3 meses ☐ 6 meses ☐ 9 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 _____

Anexo A - Registro do ensaio clínico

ClinicalTrials.gov
Protocol Registration System

Protocol Registration Receipt
12/16/2009

Adjunctive Photodynamic Therapy in Treatment of Chronic Periodontitis

This study is not yet open for participant recruitment.

Verified by University of Sao Paulo, December 2009

Sponsored by:	University of Sao Paulo
Information provided by:	University of Sao Paulo
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT01034501

ClinicalTrials.gov
Protocol Registration System

Protocol Registration Receipt
08/04/2011

Adjunctive Photodynamic Therapy in Treatment of Chronic Periodontitis

This study is currently recruiting participants.

Verified by University of Sao Paulo, August 2011

Sponsor:	University of Sao Paulo
Collaborators:	
Information provided by:	University of Sao Paulo
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT01034501

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