MÁRCIO SETO YU YUEN

EFEITO DO LASER DE DIODO DE 808nm COMO COADJUVANTE AO TRATAMENTO PERIODONTAL NA REDUÇÃO DE PERIODONTOPATÓGENOS

São Paulo

2009

Márcio Seto Yu Yuen

Efeito do laser de Diodo de 808nm como coadjuvante ao tratamento periodontal na redução de periodontopatógenos

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

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Assoc. Giorgio De Micheli

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Seto MYY. Efeito do laser de Diodo de 808nm como coadjuvante ao tratamento periodontal na redução de periodontopatógenos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo ____/____/____

Banca Examinadora

1)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação: _____

Julgamento:_____Assinatura_____

2)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação: _____

Julgamento:_____Assinatura_____

3)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação: _____

Julgamento:_____Assinatura_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Julieta e Seto**, pelo amor, paciência e apoio em todos os momentos. Muito obrigado por suas sábias lições de esperança, perseverança e dignidade durante toda a minha vida. Seus ensinamentos e exemplos de pessoas me ajudaram a conquistar este título.

Aos meus irmãos **Betty e Marcelo**, pela amizade, união, respeito e compreensão em todos os momentos.

À minha amada esposa **Celina**, pelo incentivo, apoio, companheirismo, paciência e cumplicidade no momentos felizes e difíceis de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao **Prof. Assoc. Giorgio De Micheli** orientador desta dissertação, a quem muito admiro por sua sabedoria, apoio e compreensão. Meu agradecimento pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal, pela confiança em mim depositada e por ter acreditado que este trabalho era possível.

Ao **Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata e à Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata** agradeço em primeiro lugar por me acolherem em seu laboratório mostrando o caminho da ciência com empenho e sabedoria. Obrigado pela amizade construída ao longo desses anos, por me incentivarem na busca do crescimento, sendo exemplos de competência, garra, determinação e disciplina.

Aos meus sogros **Takeshi e Hiromi** pela paciência e compreensão ao longo desses anos.

À querida amiga **Silvia Linard Marcelino Friggi** por toda a sua dedicação, disponibilidade e empenho em todos os momentos em que precisei no intuito de chegar à excelência. Ao amigo **Marco Alexandre Friggi** pela compreensão durante o desenvolvimento desta tese. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

À **Profa. Dra. Nívea Maria de Freitas e** ao **Clécio** que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos mais que amigos **Raquel e Júlio Cesar Sato** que muito me ensinaram. Muito obrigado por sua amizade.

Ao doutorando **Lidio Gonçalves Lima Neto**, você faz parte desta conquista. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni** pela oportunidade de realizar um sonho. Agradeço por todos os ensinamentos recebidos durante o curso.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da FOUSP, **Prof. Assoc. Giorgio De Micheli, Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo** (*in memoriam*), **Prof. Emérito José Hildebrando Todescan, Prof. Assoc. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima, Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Dr. Marco Antonio Paupério Georgetti, Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, Profa. Dra. Marina Clemente Conde, Prof. Dr. Kota Nakae e Prof. Dr. Cesário Antonio Duarte** por todo o conhecimento em Periodontia.

À banca examinadora da pré-defesa da dissertação **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti e Profa. Dra. Marina Clemente Conde** por acrescentar experiências e enriquecer o trabalho.

Aos meus amigos de turma da pós graduação: **Osmar Shizuo Okuda, Rodrigo Carlos Nahás de Castro Pinto e Rodrigo Albuquerque Basilo dos Santos.** Muito obrigado pela amizade e companheirismo durante o nosso curso.

Aos meus colegas de pós graduação: **Vanessa Tubero Euzebio Alves, Ana Karina Pinto de Andrade, Cássio Volponi Carvalho, Giovane Hissé Gomes, Leandro Chambrone, Flávia Sukekava, André Micheletti Hespanhol, Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando, Ariana Soares Rodrigues, Cássia Tiemi Fokuda Nakashima, Fernando Hayashi, Fernando Peixoto Soares, Hsu Shao Feng, Priscila Coraini, Silvia Linard Marcelino Friggi, Ricardo Taki Sekiguchi, Valéria Gondin da Silva, Carlos Cherque Bernado, Verônica Carvalho, Christiane Yorika, Danieli Salami, Sabrina Rosa Grande, Juliana Cleaver Aun,**

Caroline Gomes Paixão, Ecinele Francisca Rosa, Luciana Ávila Maltagliati e Isabela Maria Porto Araujo Britto pela amizade no decorrer do curso**.**

Aos **Profs. Dr. Carlos de Paula Eduardo** e **Dr. Christian Apel** pelo apoio.

Às **Profas. Dras. Ilíria Feist e Ana Vitória Imbromito** pela colaboração e incentivo.

Aos queridos **Lili, Jô e Haroldo** obrigado pela atenção tantas vezes concedidas.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular: **Lídio Gonçalves Lima Neto, André Ducati Luchessi, Vivian Nogueira Silbiger, Álvaro Nishikawa, Evelyn Anzai Kanto e Paulo Henrique Large Carbone** pelo auxílio e paciência, muito obrigado.

À profa. de inglês **Andrea Cristofaro**, você faz parte desta conquista, muito obrigado.

Às queridas tias **Ayako Tabata e Rosamaria Giberti de Figueiredo Mello** pela amizade e atenção concedidas durante este período.

Aos meus **familiares** que sempre me incentivaram na conquista deste título.

Aos queridos amigos **Yara e Sato** por me receberem tão bem em seu laboratório me dando oportunidade de aprendizado e realização profissional.

Aos Professores **Oswaldo Scopin, Ronaldo Hirata e Sidney Kina** pela confiança em mim depositada e pelas oportunidades profissionais.

Aos amigos **Sérgio Siqueira, Ariovaldo Stefani, Fábio Fuji, Flávio Zoega, Lilian Licati, Guilherme Itigawa, Cristian Higashi, Jimmy Liu, Antônio Sakamoto Jr., Simone Magalhães, Luiz Akaki, Eduardo Matheus, Camila Matheus, Carla Arita, Joseane Pacheco, Paulo Chung, Paulo Henrique Braz, Akira Koza,**

Evelyn e Leonardo Rufatto, exemplo de profissionalismo, obrigado pela amizade e momentos de aprendizado.

Aos protéticos **Marcos Celestrini e Luiz Alves Ferreira**, obrigado pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

À técnica do Laboratório de Biologia Molecular **Cristina Moreno Sajardo**, obrigado por toda a ajuda recebida.

Às secretárias da Disciplina de Periodontia: **Márcia Aparecida dos Santos, Marília Carmago Gomes, Gilmara Luisa Hortêncio e Vera Lúcia Cordeiro dos Santos Almeida** pela amizade e colaboração, muito obrigado.

Às bibliotecárias da FOUSP: **Maria Aparecida Pinto, Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana e Gláuci Elaine Damásio Fidelis** muito obrigado pelo auxílio na revisão deste trabalho, sempre dispostas a ajudar.

À **FAPESP**, pelo auxílio financeiro indispensável para a execução deste trabalho.

À todos os pacientes que participaram desta pesquisa pois sem eles nenhuma dessas páginas estariam completas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

Seto MYY. Efeito do laser de Diodo de 808nm como coadjuvante ao tratamento periodontal na redução de periodontopatógenos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar, o efeito do laser de Diodo 808nm como coadjuvante ao tratamento periodontal na redução de periodontopatógenos *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Foram selecionados vinte e quatro pacientes portadores de periodontite crônica neste estudo de boca dividida, duplo cego e randomizado. Dois sítios uniradiculares de cada paciente foram utilizados e divididos em dois grupos experimentais: TESTE - raspagem alisamento polimento corono radicular (RAPCR) associado à duas aplicações de laser de Diodo de alta potência (comprimento de onda de 808nm, 1,5 Watts, 597,1 W/cm^2, durante 20 segundos no modo contínuo). A primeira aplicação foi realizada 24 horas após RAPCR e a segunda após sete dias; CONTROLE – foi realizado o mesmo procedimento porém sem a aplicação do laser. O biofilme subgengival foi coletado antes do tratamento e seis semanas após a segunda aplicação do laser. A avaliação microbiológica foi feita através da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real para a quantificação de *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia*. A comparação entre os grupos não demonstram diferenças estatisticamente significantes (p<0,05). Concluiu-se que, dentro dos limites deste estudo, a aplicação do laser de Diodo de 808nm como coadjuvante ao tratamento periodontal não reduziu de forma significativa os

periodontopatógenos: *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* quando comparado à RAPCR.

Palavras-chave: Periodontopatógenos, PCR em tempo real, Taqman, Laser de Diodo, Periodontite crônica

Seto MYY. The effect of Diode laser 808nm associated in periodontal treatment in the reduction of periodontalpathogens [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, by real-time polymerase chain reaction, the effect of Diode laser 808nm as an adjuvant in the reduction of *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* in to periodontal treatment. Twenty-four patients with chronic periodontitis the study designs was split-mouth, double blind and ramdomized controlled trial. Two sites from uniradicular teeth of each patient were used and divided in two experimental groups: TEST – scalling and root planing (SRP) associated with two high power Diode laser application (wavelength of 808nm, 1,5W at the display (597,1 W/cm^2) for 20 seconds in the continuous-wave mode) the first laser application was 24 hours after SRP and the second seven days later; CONTROL – a similar procedure without laser application. The subgingival biofilm was colleted before treatment and six weeks after the second laser application. The microbiologic evaluation was done by real-time polymerase chain reaction for the quantification of *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*. The comparison between the groups did not show significant differences (p<0,05). Within the limits of this study, it can be concluded that Diode laser 808nm application as an adjuvant in the periodontal treatment did not reduce the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* when compared by scaling root planning.

Keywords: Periodontopathogens, Real time PCR, Taqman, Diode laser, Chronic periodontitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Medidor energia (Energy Meter, Fidmaster – Coherent Inc. Santa Clara - USA).....39

Figura 4.2 - Laser de Diodo 808nm (ZAP Solftlase, Plesant Hill USA).....40

Figura 4.3 - Cronograma de forma resumida.....42

Figura 4.4 -Curva padrão para *Porphyromonas gingivalis* (500 a 10^8 cópias por μl).....48

Figura 4.5 Curva padrão para *Treponema denticola* (500 a 10^8 cópias por μl).....48

Figura 4.6 Curva padrão para *Tannerella forsythia* (100 a 10^7 cópias por μl).....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados na PCR em tempo real.....50

Tabela 4.2 - Sondas utilizadas na PCR em tempo real utilizando a tecnologia TaqMan®.....50

Tabela 5.1 - Comparação inter e intragrupo entre as médias (± desvio-padrão) e as medianas (valor mínimo e valor máximo) referente à presença da bactéria *Porphyromonas gingivalis* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle) valores absolutos em quantidade de cópias/mL..... 54

Tabela 5.2 - Comparação inter e intragrupo entre as médias (± desvio-padrão) e as medianas (valor mínimo e valor máximo) referente à presença da bactéria *Treponema denticola* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle) valores absolutos em quantidade de cópias/mL.....55

Tabela 5.3 - Comparação inter e intragrupo entre as médias (± desvio-padrão) e as medianas (valor mínimo e valor máximo) referente à presença da bactéria *Tannerella forsythia* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle) valores absolutos em quantidade de cópias/mL.....55

Tabela 5.4 - Comparação inter e intragrupo entre as proporções das concentrações bacterianas para *Porphyromona gingivalis, Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle) 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16s rRNA	RNA ribossomal de 16S
A	refere-se ao nucleotídeo Adenina
AAP	"American Academy of Periodontology" / Academia Americana de Periodontia
ATCC	American Type Culture Collection
AsGa	Arseneto de gálio
BamHI	Enzima de Restrição Extraída do Microorganismo *Bacillusamyloliquefaciens* H
C	refere-se ao nucleotídeo Citosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cy3 5'	Fluorocromos cianina 3
Cy5 5'	Fluorocromos cianina 5
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucléico
dNTP	Solução de 2'- deoxinucleotídeos 5'- trifosfato: dATP, dTTP, dCTP e dGTP deoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
E.coli	*Escherichia coli*

EcoRI	*Escherichia coli* RI
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
G	refere-se ao nucleotídeo Guanina
GaAlAs	arseneto de gálio e alumínio (laser de diodo com emissão em λ = 810nm)
HCl	Ácido clorídrico
IP	Índice de Placa
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactosídeo
KCl	Cloreto de potássio
LASER	*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LB	Meio Cultura Luria Bertani
LEC	linha esmalte cemento
LEC-MG	Linha esmalte cemento – margem gengival
LELO	Laboratório Especial de Laser em Odontologia
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCI	Nível Clínico de Inserção
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amonio
OHB	Orientação de higiene bucal
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salino

PCR	*polymerase chain reaction* / Reação em Cadeia da Polimerase
PCS	Profundidade Clínica de Sondagem
Pg	*Porphyromonas gingivalis*
pH	Potencial hidrogeniônico
RAPCR	Raspagem Alisamento Polimento Corono Radicular
Rnase	Ribonuclease
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SS	Sangramento à Sondagem
T	refere-se ao nucleotídeo Timina
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
Td	*Treponema denticola*
TE	Tampão Tris-EDTA
Tf	*Tannerela forsysthia*
Tris	Tris-hidroximetil-Aminometano / ácido clorídrico
US	Aparelho de ultra-som
UV	Luz ultra-violeta
X-gal	5-bromo-4cloro-3-indoil-B-D-galactosídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
CW	continuos wave / onda contínua
°C	Graus Celsius
Hz	Hertz
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
μg	unidade de medida referente a Micrograma
μL	unidade de medida referente a Microlitro
μL/mL	Microlitro por mililitro
μm	unidade de medida referente a Micrometro
μM	unidade de medida referente a Micromolar
μmol/L	Micromol por litro
mA	unidade de medida referente a Miliampere
mg	unidade de medida referente a Miligrama
mg/mL	Miligrama por Mililitro
min	unidade de medida referente a Minuto
mm	unidade de medida referente a Milímetro
mm/s	Milímetros por segundo
mL	unidade de medida referente a Mililitro
mM	unidade de medida referente a Milimolar
M	unidade de medida referente a Molar ou Molaridade
n	unidade de medida referente a Numero
ng	unidade de medida referente a Nanograma

nm	unidade de medida referente a Nanômetro
nmol/L	Nano mol por litro
pM	unidade de medida referente a Picomolar
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundo
U	Unidade enzimática
V	Volt
W	Watt

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO.....22

2 REVISÃO DA LITERATURA.....24

2.1 Doença periodontal.....24

2.2 Laser de Diodo.....27

3 PROPOSIÇÃO.....34

4 MATERIAL E MÉTODOS.....35

4.1 Seleção dos pacientes.....35

4.2 Delineamento do estudo e casuística.....36

4.3 Detalhamento dos procedimentos e grupos experimentais.....37

4.4 Laser de Diodo.....40

4.5 Coleta da amostra.....40

4.6 Preparo das amostras para extração do DNA genômico.....43

4.7 Ensaio da PCR para amplificação de fragmentos de DNA dos periodontopatógenos: *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia*.....43

4.8 Ligação do fragmento dos genes obtidos pela PCR com o plasmídeo..44

4.9 Preparo das bactérias competentes.....45

4.10 Transformação da *E. coli* com o plasmídeo recombinante.....45

4.11 Extração do DNA plasmidial.....46

4.12 Análise do controle interno na quantificação do DNA e curva padrão...47

4.13 Estudo da quantificação dos periodontopatógenos: *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia*.....49

4.14 Otimização do ensaio de PCR em tempo real.....50

4.15 PCR em tempo real.....51

4.16 Análise estatística.....52

5 RESULTADOS.....53

6 DISCUSSÃO.....57

7 CONCLUSÕES.....65

REFERÊNCIAS.....66

ANEXOS.....75

1 INTRODUÇÃO

Apesar do conhecimento sobre a etiologia bacteriana da doença periodontal ter crescido significativamente nos últimos anos (VAN WINKELHOFF; BOUTAGA, 2005), diferentes tipos de tratamento que interferem na microbiota subgengival têm sido sugeridos.

Partindo desta perspectiva, o tratamento periodontal está baseado em remoção mecânica do biofilme dental da superfície radicular através da RAPCR. Este procedimento, de forma geral conduz à melhora dos parâmetros clínicos periodontais (SUVAN, 2005; YUKNA et al., 1997), porém a complexidade da anatomia radicular, bolsas profundas e dentes multiradiculares com envolvimento de furca representam um grande desafio para a redução desse biofilme através de uma adequada instrumentação mecânica (FLEMMIG et al., 1998).

Deste modo a literatura sugere tratamentos coadjuvantes a RAPCR para compensar as suas limitações, com o objetivo de promover uma superfície biocompatível com os tecidos periodontais. Estudos realizados demonstraram que o uso de aparelhos ultra-sônicos, jatos abrasivos e lasers de alta potência podem auxiliar na redução do biofilme dental da superfície radicular (ISHIKAWA; BAEHNI, 2004; KOZLOVSKY; SOLDINGER; SPERLING, 1989; SCHWARZ et al., 2003; TUNKEL; HEINECKE; FLEMMIG, 2002).

Dentre esses tratamentos associados, a aplicação do laser na periodontia pode ser eficaz como coadjuvante ao tratamento periodontal (AOKI et al., 2004). Na literatura alguns autores sugerem o uso do laser na redução bacteriana em bolsas periodontais

(BEN HATIT et al., 1996; COBB, 1996; MORITZ et al., 1998) e o condicionamento da superfície radicular aumentando a adesão e a proliferação de fibroblastos (FEIST et al., 2003; THEODORO; SAMPAIO; HAYPEK, 2006).

O laser de Diodo apresenta um comprimento de onda de 805 a 980nm deste modo o seu coeficiente de absorção é dado por tecidos ou bactérias pigmentadas de preto, entretanto é pouco absorvido pelo tecido duro (AOKI et al., 2004). Ele é formado por circuitos semicondutores, o que possibilita a compactação dos equipamentos com potências suficientes para uma atividade clínica adequada, é um equipamento portátil, fácil de ser utilizado e com custo bem inferior quando comparado aos outros tipos de laser (DE MICHELI 2006).

Outros estudos *in vitro* demostram que o efeito do laser de Diodo de alta potência quando aplicado na superfície radicular não causaram efeitos danosos aos tecidos adjacentes e ao tecido pulpar. Entretanto na literatura não existem estudos *in vivo* que avaliam o efeito do laser de Diodo como coadjuvante a RAPCR na redução microbiana dos periodontopatógenos *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* analisada pela PCR em tempo real.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal crônica é uma infecção polimicrobiana caracterizada pela perda de inserção do tecido de suporte devido à presença do biofime dental, sendo o principal fator etiológico. Bactérias patogênicas são essenciais para iniciar a doença periodontal, porém cada paciente responde diferente a agressão bacteriana. Apenas 20% da variabilidade na expressão das doenças periodontais pode ser explicada pelo componente bacteriano (HART; KORNMAN, 1997).

Uma das principais características clínicas da doença periodontal crônica é a presença do biofime supra e subgengival. A etiologia bacteriana é complexa e possui uma variedade de microrganismos que podem ser responsáveis pelo início da doença. Na cavidade bucal foram identificadas mais de 500 espécies distintas (COBB et al., 1996). Em 1998, Socransky et al. dividiram os microrganismos em complexos e os relacionaram com as condições patológicas dos tecidos periodontais. Dentre estes, os microrganismos do complexo vermelho são considerados importantes na etiopatogenia da doença periodontal.

Os estudos de Löe, Theilade e Jensen (1965) e Theilade et al. (1966) evidenciaram que a ocorrência de alterações inflamatórias no tecido gengival eram induzidas pelo biofilme, confirmando a relação entre causa e efeito do biofilme e o início da gengivite. Após esses estudos passou-se a acreditar que a doença periodontal era

causada pelo biofilme dental e que a presença de qualquer tipo de microrganismo subgengival poderia contribuir para a destruição do tecido. Este conceito posteriormente ficou conhecido como a hipótese da placa não-específica.

Portanto, até a década de 1970, de acordo com esta hipótese, o tratamento periodontal era baseado na redução do biofilme dental, ou seja, acreditava-se que a composição da placa era similar de paciente para paciente e de sítio para sítio.

Listgarten (1976) estudou a microbiota de dentes extraídos de pacientes saudáveis e portadores de gengivite ou periodontite e observaram diferenças na composição do biofilme. Em pacientes saudáveis houve uma predominância de espécies Gram-positivas, e em pacientes com gengivite ou periodontite a predominância foi de espécies Gram-negativas.

Desta forma, ao longo dos anos, pesquisadores dedicaram muitos esforços para coletar, cultivar e classificar microrganismos dos diversos sítios da cavidade bucal, e em diversos estudos observaram a composição bacteriana de pacientes portadores de doença periodontal crônica utilizando diferentes técnicas microbiológicas (LOESCHE, 1976; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000).

Este desequilíbrio da microbiota quando atuada de forma crônica, gera no hospedeiro um processo celular e molecular que é explicado através da patogênese da doença periodontal (PRESHAW; SEYMOUR; HEASMAN, 2004; SALVI; LANG, 2005; TATAKIS; KUMAR, 2005).

De acordo com Socransky et al. (1998) que classificaram as associações bacterianas em complexos microbianos do biofilme subgengival através de sondas de DNA (Checkboard DNA-DNA Hybridization), o complexo vermelho é composto por bactérias anaeróbias, estritas, Gram-negativas: *Porphyromonas gingivalis, Treponema*

denticola e Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus). Essas bactérias podem ocasionar perdas de inserções e o aumento da profundidade clínica de sondagem, induzindo e acelerando o processo inflamatório (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994).

A identificação de periodontopatógenos associada aos diferentes quadros de doença periodontal se torna especialmente desafiadora diante da grande quantidade de espécies que habitam a microbiota bucal. Algumas são de difícil coleta, isolamento e cultivo, pois são anaeróbias estritas localizadas em áreas de bolsas profundas cujo acesso é mais dificultado. Como as bactérias patogênicas estão presentes em grande quantidade nos sítios ativos, uma outra dificuldade para a identificação das mesmas seria a necessidade de determinação do novo surto ativo da doença, onde há destruição tecidual e a predominância dos fatores de virulência bacteriano através dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Segundo Paster et al. (2001), em seu estudo estimaram que a cavidade bucal de um indivíduo adulto hospede cerca de 700 espécies bacterianas distintas. Entre essas, 500 foram encontradas em amostras de biofilme subgengival apresentando uma película fina que adere firmemente ao dente (COSTERTON, 1995; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

O tratamento da doença periodontal visa à biocompatibilização da superfície radicular através da remoção do biofilme e do cálculo através da raspagem e alisamento corono radicular, possibilitando o restabelecimento da saúde periodontal (BADERSTEN; NILVÉUS; EGELBERG, 1984; LINDHE; NYMAN, 1984; WAERHAUG, 1978).

2.2 LASER DE DIODO

A palavra LASER é o acrônimo em inglês de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação. O conceito do LASER foi proposto por Einstein em 1917 demonstrando que a luz consiste em ondas de energia chamada fóton. Cada fóton tem uma energia que corresponde às freqüências de onda, quanto maior a freqüência, maior a energia conduzida por esta onda (COLUZZI, 2000).

Os lasers são classificados de acordo com a potência de emissão da radiação podendo ser: laser de alta (cirúrgicos), média e baixa intensidade (terapêuticos). O laser de alta potência é utilizado principalmente em incisões em tecidos moles ou em tecidos duros (remoção de osso). O seu funcionamento está baseado em uma ação fototérmica de corte, vaporização, coagulação e esterilização dos tecidos.

As principais características do laser são: luz monocromática (uma única cor, correspondendo a um comprimento de onda do espectro eletromagnético), raios colimados (caráter direcional do feixe em mesma direção, permitindo que uma grande quantidade de energia seja transmitida a um alvo preciso) e raios coerentes (todos os raios da luz do LASER caminham paralelos no tempo e no espaço).

Na década de 60, o primeiro laser foi construído pelo físico Theodore Maiman (Hughes Research Laboratories), porém o seu emprego não estava claro como foi relatado na literatura (TUNÉR; HODE, 1998). A partir deste momento outros lasers de diversos comprimentos de onda foram desenvolvidos: laser de Nd: YAG 1.064nm em 1961, o laser de Argônio 457 - 501nm em 1964, laser de Dióxido de carbono 10.6μm

(CO_2) em 1965, laser de Érbio 2.64nm (Er:YAG) e Er,Cr:YSGG 2.780nm em 1989 que possibilitaram a utilização em diversos segmentos.

Em 1962, o físico Dr. Robert N. Hall e sua equipe desenvolveram o primeiro laser de Diodo no Centro de Desenvolvimento de Pesquisa General Electric (Schenectady / New York) e meses após, Dr. Nick Holonyak Jr. apresentou o primeiro laser de Diodo de comprimento de onda visível.

A primeira pesquisa com o laser na Odontologia foi em 1972 conduzida por Stern & Sogannaes que utilizaram o laser de Rubi em seu experimento irradiando a superfície da dentina e do esmalte. Os resultados não foram favoráveis pois houve um aquecimento excessivo durante a irradiação causando a carbonização dos tecidos, além do aparecimento de microfraturas.

No final da década de 80 o emprego do laser na Periodontia era apenas para os procedimentos cirúrgicos. Nestas duas últimas décadas, o laser de Diodo passou por diversos desenvolvimentos tecnológicos, pois, além de sua capacidade de redução microbiana, seu custo e tamanho reduzidos facilitaram sua aplicação nas diversas áreas de pesquisa. Este tipo de laser apresenta como meio ativo um sólido semicondutor associado ao Alumínio, Gálio e Arseneto, e a energia elétrica gerada é transformada em feixe de luz laser. O comprimento de onda do laser de Diodo de alta intensidade pode variar de 805 a 980nm (espectro infravermelho), sua potência de saída geralmente atua de 2 a 10W, podendo ser emitidos no modo pulsado ou contínuo, na forma de contato ou não e dependendo da sua indicação clínica. O sistema de aplicação deste laser é através de uma fibra óptica utilizada em contato com os tecidos, portanto, facilitando a aplicação em regiões de difícil acesso como no interior da bolsa periodontal. A ponta da fibra deve ser previamente clivada e limpa

durante o procedimento para que sua efetividade não seja alterada. O seu comprimento de onda apresenta baixo coeficiente de absorção na água e hidroxiapatita, portanto, não promovem a ablação de tecidos duros devido à fraca interação com as estruturas mineralizadas sem produzir danos térmicos aos tecidos. Por outro lado, o seu comprimento onda apresenta um alto coeficiente de absorção por tecidos pigmentados (CHANTHABOURY; IRINAKIS, 2005).

O primeiro estudo piloto *in vivo* na periodontia com o uso do laser de Diodo de alta intensidade 805nm foi realizado por Moritz et al. (1997), que avaliaram o efeito do laser em relação aos parâmetros clínicos periodontais e microbiológicos da *Aggregatibacter actinomycetencomitans, Prevotella intermedia, Porphyromonas gingivalis* e a quantidade de bactérias presentes. A amostra consistia em 50 pacientes com doença periodontal com profundidade clínica de sondagem de 4mm. Os pacientes foram subdividos em 2 grupos: G1 - teste (Laser + Raspagem) com 37 pacientes e G2 - controle (Raspagem) com 13 pacientes. O laser foi aplicado paralelo ao longo eixo do dente, com movimentos de varredura de apical para coronário, foram utilizados os seguintes parâmetros: 2,5W, 50Hz, 10ms no modo pulsado. Os resultados microbiológicos do grupo teste demonstraram uma redução de 57,7% *Actinobacillus actinomycetencomitans,* 55,9% *Prevotella intermedia,* 62,2% *Porphyromonas gingivalis* e 71,2% na concentração total de bactérias presentes nas amostras. No grupo controle a redução na concentração total de bactérias foi de 25%. Concluíram que o laser de Diodo foi mais efetivo na redução de espécies bacterianas envolvidas na doença periodontal.

No ano seguinte Moritz et al. (1998), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do laser de Diodo 805nm em bolsas periodontais associado à raspagem. Os parâmetros clínicos periodontais microbiológicos e uma avaliação semi quantitativa de *Aggregatibacter actinomycetencomitans, Prevotella intermedia e Porphyromonas gingivalis* foram avaliados. Os 46 pacientes foram avaliados e subdivididos em 2 grupos: G1 - teste (Raspagem + Laser) com 34 pacientes e G2 - controle (Raspagem + Bochecho com água oxigenada) com 12 pacientes. No G1 o laser foi aplicado com uma fibra de 400μm com os seguintes parâmetros: 2,5W, 50Hz, 10 ms no modo pulsado, paralelo ao longo eixo do dente com movimentos de apical para coronário. Os resultados demonstraram uma maior redução do número de bactérias no grupo G1 quando comparado ao grupo G2. Os autores concluíram que o laser de Diodo associado à raspagem reduziu periodontopatógenos.

Em um outro estudo *in vitro* Kreisler et al. (2001) avaliaram o efeito do laser de Diodo GaAlAs 810nm na taxa de adesão das células do ligamento periodontal. Foram preparados 150 segmentos radiculares 4 a 5mm x 2 a 3mm com uma espessura de 1mm de dentes humanos extraídos. As amostras foram irradiadas perpendicularmente por uma fibra de 600μm e o parâmetro usado do laser foi 1W, em modo contínuo por 20 seg. Os resultados demonstraram que a aplicação do laser de Diodo não causou nenhuma alteração detectável. Portanto não houve alteração no padrão de crescimento celular entre os grupos.

Theodoro et al. (2003) estudaram o efeito do laser de Er:YAG e do laser de Diodo 810nm após irradiar a superfície radicular através de uma análise térmica e morfológica. As amostras consistiram de 15 dentes extraídos por doença periodontal.

Os dentes foram raspados e alisados com instrumentos manuais e divididos em 3 grupos de 5 espécimes cada. O grupo I foi irradiado perpendicularmente com o laser de Er:YAG 100mJ/pulso, 10Hz, ponta de 1,3mm, focado, em contato com a superfície irradiada e com refrigeração contínua. O Grupo II foi irradiado perpendicularmente com laser de Diodo por 1W, pulsado, com intervalo de 0.05ms com uma fibra de 320μm e o Grupo III foi irradiado com laser de Diodo da mesma forma alterando a potência para 1,4W. Concluíram que a aplicação do laser de Er:YAG e o laser de Diodo utilizando os parâmetros estudados não induz ao aumento da temperatura pulpar e as irregularidades da superfície radicular foram mais observadas após a irradiação com o laser de Er:YAG.

Schwarz et al. (2003) realizaram avaliação *in vivo* e *in vitro* dos efeitos do laser de Er:YAG e de Diodo GaAlAs 810nm comparado ao tratamento periodontal. Foram utilizados 24 dentes uniradiculares (n= 48 faces) com PCS $\geq$ 8 mm. Os dentes foram divididos em 3 grupos: Grupo I foi tratado com laser de Er:YAG 160mJ/pulso, 10 pulsos por seg, ponta biselada 0,5 x 1,65mm em um ângulo de 15 - 20° no sentido corono-apical em contato com a superfície radicular sob irrigação contínua. O Grupo II foi tratado com laser de Diodo 810nm 1,8W, no modo pulsado, 10Hz e uma fibra de 600μm e no Grupo III foi realizado RAPCR. Concluíram que o laser de Diodo não foi capaz de remover o cálculo dental.

Borrajo et al. (2004), avaliaram a eficácia do laser de Diodo 980nm associado ao tratamento periodontal. Trinta pacientes com doença periodontal crônica foram selecionados e divididos aleatoriamente em dois grupos: RAPCR (Grupo 1) e RAPCR associado com laser de Diodo seguindo os seguintes parâmetros: 2W, no modo

pulsado e com uma fibra de 200μm (Grupo 2). Todos os pacientes receberam orientação de higiene bucal. Os parâmetros clínicos avaliados foram: Índice de sangramento papilar, Sangramento à sondagem, Nível clínico de inserção, Retração gengival e Profundidade clínica de sondagem. Na primeira sessão foi realizada a remoção de cálculo supragengival com ultra-som em ambos os grupos. Na sessão seguinte foi realizada RAPCR no Grupo 1 e no Grupo 2 RAPCR associada ao laser. Após 6 semanas os pacientes foram reavaliados. Os autores concluíram que o uso do laser de Diodo em bolsas periodontais associado à RAPCR demonstraram melhoras qualitativas nos parâmetros clínicos periodontais.

Em um estudo randomizado, Kreisler, Al Haj e d'Hoedt (2005) avaliaram a eficiência clínica da aplicação do laser de Diodo GaAIAs 809nm como coadjuvante ao tratamento periodontal. O desenho do estudo foi de boca dividida e a amostra consistia de 22 pacientes. Após a RAPCR dois quadrantes foram escolhidos para a aplicação do laser e os outros dois quadrantes foram irrigados com solução salina. Os parâmetros utilizados foram 1W, no modo contínuo, por 10 seg e com uma fibra de 600μm. A orientação de higiene bucal foi realizada e após 12 semanas os parâmetros clínicos periodontais iniciais e finais foram comparados. Os autores concluíram que a aplicação do laser de Diodo no tratamento da periodontite é um procedimento seguro e pode ser recomendado como coadjuvante ao tratamento periodontal.

O estudo *in vitro* de Haypek et al. (2006) avaliaram os efeitos térmicos e morfológicos do laser de Diodo de alta potência na superfície radicular. Os autores concluíram que o laser de Diodo quando utilizado na potência de 1,5W, 10Hz por 30 seg no modo contínuo ou pulsado é considerado seguro.

Em 2006 De Micheli avaliou o efeito do laser de Diodo de alta intensidade na redução da microbiota subgengival de pacientes portadores de periodontite crônica. Este estudo foi cego, comparativo e radomizado. Conclui-se que o laser de Diodo de alta intensidade associado ou não à RAPCR não apresentou diferença estatisticamente significante.

Caruso et al. (2008) realizaram um estudo de boca dividida com 13 pacientes portadores de peridontite crônica com o objetivo de avaliar a eficácia do laser de Diodo 980nm como coadjuvante ao tratamento periodontal em relação à RAPCR. Os parâmetros clínicos periodontais e microbiológicos foram avaliados após seis meses. A aplicação do laser seguiu os seguintes parâmetros: 2,5W no modo pulsado, por 30 seg com intervalo de 60 seg. O exame microbiológico foi através da PCR multiplex para identificar as seguintes bactérias: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia, Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia* e *Treponema denticola.* Concluíram que os parâmetros clínicos periodontais tiveram discreta melhora porém não houve uma diferença significante na redução de periodontopatógenos.

Um estudo com pacientes portadores de periodontite agressiva realizado por Kamma et al. (2009) avaliaram os parâmentros clínicos e microbiológicos após a aplicação do laser de Diodo de 980nm. Os autores concluíram que a associação do laser de Diodo com a RAPCR foi mais eficiente quando comparado aos demais tratamentos.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar o efeito do laser de Diodo de 808 nm (1,5W; 20 seg; no modo contínuo; 597,1 W/cm^2) como coadjuvante ao tratamento periodontal na redução de *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* em pacientes com periodontite crônica, através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), segundo o protocolo n° 05/04 (Anexo A), e com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (05/59241-0). Os pacientes foram triados pela clínica de Graduação, Especialização e Pós-Graduação da Disciplina de Periodontia do Departamento de Estomatologia da FOUSP. Os pacientes foram informados sobre a pesquisa e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo com a Resolução n° 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde (Anexo B).

O estudo foi realizado no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO/FOUSP) sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFUSP), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata e da Prof[a]. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata.

A seleção dos pacientes obedeceu os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Pacientes portadores de Periodontite Crônica (TONETTI; CLAFFEY, 2005).
- Perda de inserção ≥ 5 mm (TONETTI; CLAFFEY, 2005).
- Dentes uniradiculares íntegros e vitais.
- Dentes uniradiculares contralaterais do mesmo arco.
- Pacientes que apresentam no mínimo 10 dentes na cavidade bucal.

Critérios de Exclusão:

- Pacientes tabagistas.
- Pacientes submetidos à antibioticoterapia nos três meses prévios ao estudo.
- Pacientes que receberam tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses.
- Pacientes portadores de doenças ou condições sistêmicas que pudessem atuar como fatores modificadores da doença periodontal presente.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

Este estudo foi um ensaio clínico, aleatório, duplo cego, com modelo de boca dividida. Os exames clínicos foram realizados por um único examinador treinado e calibrado através do coeficiente de correlação intra-classe (Coeficiente Kappa) JEC-LM

0,997 (p<0,001) PCS 0,998 (p<0.001). Um auxiliar odontológico era responsável pela anotação dos dados em uma ficha. Este exame foi repetido em um intervalo de uma semana.

4.3 DETALHAMENTO DOS PROCEDIMENTOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal, exame radiográfico periapical das arcadas pela técnica do paralelismo, orientação de higiene bucal (OHB) e moldagem para confecção da guia de resina acrílica a fim de padronizar a sondagem e coleta das amostras.

Os parâmetros clínicos utilizados foram:

1. Profundidade clínica de sondagem (PCS): distância (mm) compreendida entre a margem gengival e o fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal.
2. Distância da linha esmalte-cemento à margem gengival (LEC-MG): distância (mm) que vai da linha esmalte-cemento à margem gengival. Se a LEC estivesse localizada apicalmente à margem gengival, o parâmetro receberia um valor negativo.
3. Nível clínico de inserção (NCI): é o valor correspondente à soma dos valores de PCS e LEC-MG
4. Índice de placa (IP)
5. Sangramento à sondagem (SS)

O tratamento periodontal prévio da boca toda foi realizado em até quatro sessões de RAPCR com o auxílio do aparelho de ultra-som e com a ponta P do kit MiniPiezon®, EMS, Suíça (Electro Medical System, Le Sentier, Switzerland) com exceção dos dentes uniradiculares selecionados para o estudo. Para este tratamento foram utilizados dois jogos compostos por uma cureta de Gracey n° 5/6, 7/8 (Hu-Friedy® Co. Chicago, IL, USA), uma sonda milimetrada (PCPUNC 15BR Hu-Friedy®) e um espelho clínico (Duflex® n°05) para cada sítio CONTROLE e TESTE.

A amostra foi randomizada através de um sorteio simples por meio do lançamento de uma moeda para determinar a qual grupo o dente seria alocado. Por se tratar de um estudo de boca dividida cada paciente possuía dois sítios:

- SÍTIO CONTROLE - raspagem alisamento polimento corono radicular (RAPCR) manual utilizando-se curetas de Gracey n° 5/6 e 7/8 (Hu-Friedy® Co. Chicago, IL, USA).
- SÍTIO TESTE - foi igual ao sítio CONTROLE seguido da aplicação do laser de Diodo.

No primeiro dia do tratamento, realizou-se a coleta microbiológica e o registro dos parâmetros clínicos periodontais (INICIAL). Em seguida os pacientes receberam a primeira sessão do tratamento proposto ao grupo experimental a que pertencia. Após 24h, os sítios TESTES receberam a aplicação do laser de Diodo da seguinte maneira: previamente a cada aplicação, a energia gerada pela fibra óptica foi medida utilizando-se um sensor piroelétrico LM10i conectado a um medidor de energia Fieldmaster (Coherent, Auburn-USA) (Figura 4.1) com o objetivo de padronizar a amplitude do sinal elétrico gerado em função da taxa de variação da temperatura aplicada nos sítios estudados. Em seguida, a fibra óptica flexível de 400μm foi clivada e inserida nos sítios experimentais com uma angulação de aproximadamente 20° com o longo eixo do dente

com movimentos de varredura de apical para coronário durante 20 seg. Os parâmetros utilizados foram: 1,5W de potência no modo contínuo totalizando uma densidade de energia de 597,1 W/cm^2. Essa fibra foi introduzida um milímetro aquém da profundidade obtida com a sondagem utilizando um cursor de borracha inserido na mesma para delimitar essa profundidade.

Nos sítios CONTROLE a fibra óptica foi clivada e posicionada da mesma maneira, durante o mesmo tempo, porém sem ativação para que o paciente não soubesse em qual sítio o laser estava sendo aplicado.

Após uma semana a aplicação do laser foi realizada seguindo os mesmos parâmetros. A segunda coleta microbiológica e o registro dos parâmetros clínicos periodontais foi realizada após seis semanas da mesma forma do INICIAL.

Figura 4.1 – Medidor energia (Energy Meter, Fidmaster – Coherent Inc, Santa Clara - USA)

4.4 LASER DE DIODO

O equipamento utilizado foi o Laser de Diodo Classe IV, meio ativo de GaAlAs, da marca ZAP Lasers (Figura 4.2). Este laser possui as seguintes características: comprimento de onda: 808 ± 5nm, freqüência: 10Hz, potência máxima de 3,5W, duração do pulso: 50μs, regime de operação: contínuo ou interrompido e fibra óptica de quartzo flexível: 400μm.

Figura 4.2 - Laser de Diodo de 808nm (ZAP Softlase, Plesant Hill – USA)

4.5 COLETA DA AMOSTRA

A coleta das amostras foi realizada com cone de papel estéril n° 40 (Dentisply Maillefer® Ind. e Com. LTDA) por um único examinador que teve o critério de remover o biofilme supragengival com uma gaze estéril e utilizando roletes de algodão para um isolamento relativo.

1ª. coleta: o cone de papel foi introduzido nos sítios periodontais o mais apicalmente possível por 1 min (HARTROTH; SEYFAHRT; CONRADS, 1999) e armazenado em microtubos de 1,5ml estéreis, enumerados e armazenados a -20°C no Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao Diagnóstico para o seu processamento.

2ª. Coleta: foi realizada após 6 semanas da mesma maneira que a primeira coleta seguido da realização de um novo exame clínico periodontal.

De forma resumida a Figura 4.3 é um cronograma que mostra toda sequência dos procedimentos clínicos.

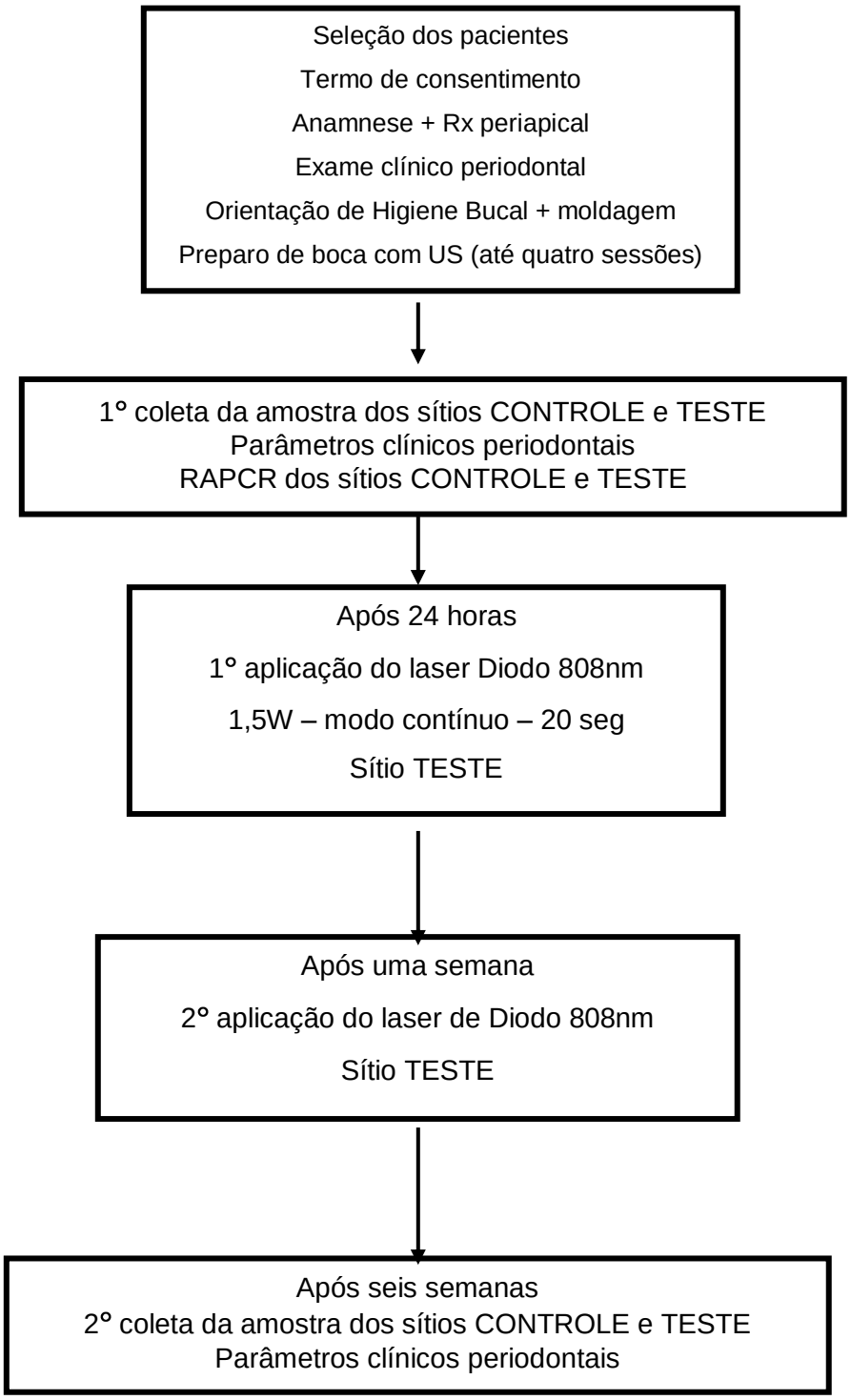


Figura 4.3 Cronograma de forma esquemática para resumir o procedimento clínico

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

As amostras foram rehidratadas com 100μl de água MiliQ estéril por 5 min, centrifugadas a 8000 rpm por 5 min. Após esta etapa o conjunto de reagentes do Kit GFX™ Genomic Blood DNA Purificantion Kit (Amersham Pharmacia Biotech Piscataway / NJ, EUA) foi utilizado para a extração do DNA genômico presentes nas amostras de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 ENSAIO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DOS PERIODONTOPATÓGENOS: *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia*

O DNA de cultura pura de bactérias foram: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Treponema denticola* ATCC 33520 *e Tannerella forsythia* ATCC 43037.

A região do gene *16s rRNA* foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do DNA genômico foram utilizados 2μL de DNA, iniciadores 200nmol/L (Prodimol Biotecnologia, Bello Horizonte, MG, Brasil), cujas seqüências estão descritas na tabela 4.1, dNTPs 800μmol/L (Amersham Biosciences, Piscataway / NJ, EUA), DNA polimerase 1U (Biotools, Madri, Espanha), tampão de PCR (75mM Tris-HCl pH 9,0), 50mM de KCl, 20mM $(NH_4)_2SO_4$, 2nmol/L de $MgCl_2$, em um volume total de 50μL com água deionizada esterilizada.

A PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 96°C por 3 min; seguida de etapa de amplificação em 35 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 60°C por 1 min. para hibridização e 72°C para extensão e etapa de extensão final de 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Utilizando 5μL de produtos da PCR diluídos em tampão de amostra de DNA, como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb (Invitrogen, Corporation CA, EUA).

A eletroforese foi realizada por 30 min a 100V e 60mA em cuba horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5mg/mL) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) 4400 (v5.5).

4.8 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO DOS GENES OBTIDOS PELA PCR COM O PLASMÍDEO

O fragmento de gene amplificado pela PCR dos agentes infecciosos e o plasmídeo pGEM®-T Easy Vector (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega) foram submetidos à ligação (clonagem) pela adição de tampão de ligação rápida da enzima T4 DNA ligase (Tris-HCl 60mM pH 7,8, $MgCl_2$ 20mM, ditiotreitol (DTT) 20mM, adenosina trifosfato (ATP) 2mM e 10% de polietilenoglicol, 50ng de plasmídeo pGEM®-

T Easy Vector, 20ng do fragmento do gene e 1U de enzima T4 DNA Ligase, acertando-se o volume para 10µL com água MilliQ estéril. A mistura foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. O produto desta reação foi utilizado para transformação de *E. coli* DH-5*α*. Os plasmídeos recombinantes foram denominados *pGemTF, pGemPG e pGemTD.*

4.9 PREPARO DAS BACTÉRIAS COMPETENTES

A partir de uma colônia isolada de bactéria *E. coli* cepa DH-5α, um repique para a expansão foi realizado, utilizando meio líquido de LB sem antibiótico, incubando-se sob agitação a 37°C, até a obtenção de uma densidade óptica (DO) de 600nm. A suspensão resultante foi centrifugada, o sobrenadante desprezado, e as células decantadas. Em seguida, o material foi tratado com solução de cloreto de cálcio 50mM gelado por 30 min e centrifugado à 4.000g durante 5 min. As células foram novamente resuspensas em solução de cloreto de cálcio 50mM e 5% de DMSO e conservadas a -70°C até o momento da transformação.

4.10 TRANSFORMAÇÃO DA *E. coli* COM O PLASMÍDEO RECOMBINANTE

Para a transformação foram utilizados 50µL de suspensão de bactérias e 2µL de produto da reação de ligação. A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 min em banho de gelo, por 50 seg a 42°C sem agitação e, novamente, em banho de gelo por mais 2 min. Foi adicionado 950µL de meio SOC e incubado a 37°C por 90 min com

agitação. O produto de transformação foi semeado em meio de cultura LB ágar contendo ampicilina (200μg/mL), IPTG e X-gal, com incubação a 37°C por uma noite.

As colônias que cresceram neste período foram submetidas à extração do plasmídeo e, a seguir, submetidas à restrição enzimática com as *Eco*RI e *Bam*HI e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, para confirmação da presença do fragmento clonado. As colônias foram quantificadas por espectrofotometria em UV e a sua concentração Molar foi calculada para serem utilizadas como controle interno.

4.11 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Partindo-se de uma colônia isolada e carreadora do plasmídeo pGEM®-T Easy Vector contendo o inserto, incubada em 5mL de meio líquido de LB com antibiótico (100μg/mL) por uma noite a 37°C com agitação, as colônias foram centrifugadas à 5.000g durante 5 min; 4mL do sobrenadante foram removidos e o restante resuspenso e transferido para microtubo 1,5mL estéril. O microtubo foi novamente centrifugado a 12.000g durante 5 min e o sobrenadante removido. O sedimento foi utilizado para extração dos plasmídeos, de acordo com o protocolo de orientação do kit de extração *GFX Micro Plasmid Prep Kit*, da Amersham Biosciences.

Resumidamente, o *pellet* foi resuspenso em 300µL de solução I (Tris-HCl 100mM pH 7,5, EDTA 10mM, Rnase I 400µg/mL) e agitado vigorosamente em vórtex. A seguir, foram adicionados 300µL de solução II (NaOH 1M, SDS 5,3%m/v), homogeneizando o

tubo por inversão de 10 a 15 vezes. Foram acrescentados 600µL de solução III (solução tamponada contendo acetado), invertendo-se o tubo várias vezes até a formação de um precipitado floculento e sua dispersão. Centrifugou-se a 12.000g durante 5 min à temperatura ambiente. Cuidadosamente, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril. Metade deste volume, cerca de 600µL, foi transferida à coluna GFX, previamente colocada em um microtubo coletor. Foi incubada por 1 min à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000g por 30 seg à temperatura ambiente. O material coletado foi descartado e o procedimento foi repetido para o volume restante. Após a centrifugação, adicionou-se 400µL de tampão de lavagem (80% tampão Tris-EDTA e 20% etanol absoluto) à coluna, que foi centrifugada a 12.000g por 1 min à temperatura ambiente. A coluna foi então colocada sobre um novo microtubo e a ela adicionados 75µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM pH 8,0). Incubou-se por 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000g por 1 min à temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi coletado no microtubo e mantido a -20°C.

4.12 ANÁLISE DO CONTROLE INTERNO NA QUANTIFICAÇÃO DO DNA E CURVA PADRÃO

Conhecendo o peso molecular do plasmídeo recombinante e sua quantificação por espectrofotômetro em UV utilizando o espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). Foi determinado o número de cópias do DNA alvo. Através da fórmula $(x.y.6{,}02.10^4)/z$, onde x é o valor de número de

cópias, y é o valor absoluto da quantificação por espectrofotometria em UV, Z é o valor do peso molecular do plasmídeo recombinado. Para determinar o número de cópias de plasmídeo recombinante por microlitro e em seguida foram realizadas diluições seriadas das amostras em tampão TE. Estas diluições foram utilizadas como controle positivo e para determinação da curva padrão. O limite de quantificação das bactérias *Porphyromonas gingivalis* (Figura 4.4) *e Treponema denticola* (Figura 4.5) foi de 500 cópias de DNA por microlitro. No entanto, na curva padrão para *Tannerella forsythia* (Figura 4.6) o limite de quantificação foi de 100 cópias de DNA por microlitro.

Uma vez determinado o limite de quantificação, todas as amostras foram amplificadas juntamente com a curva padrão.

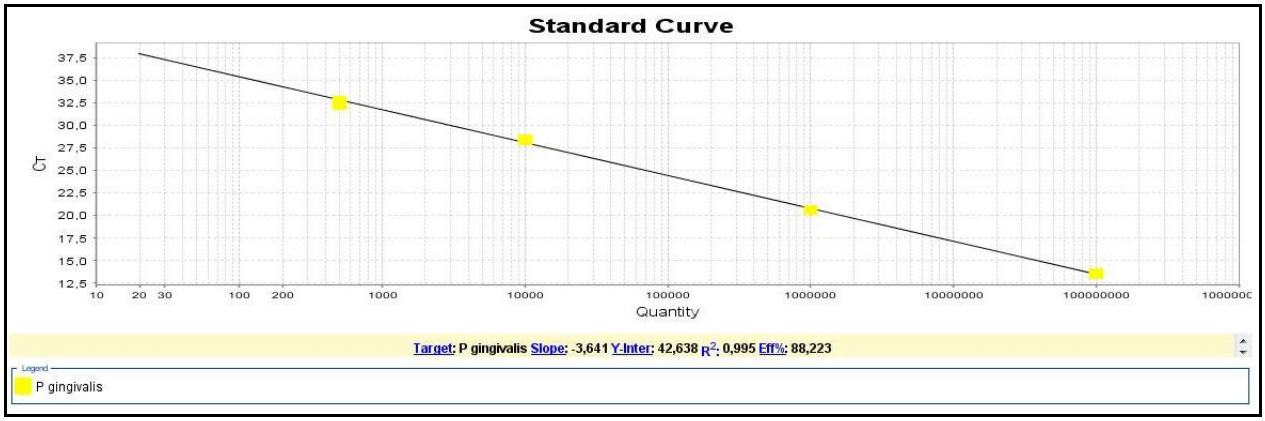


Figura 4.4 Curva padrão para *Porphyromonas gingivalis* (500 a 10^8 cópias por μl)

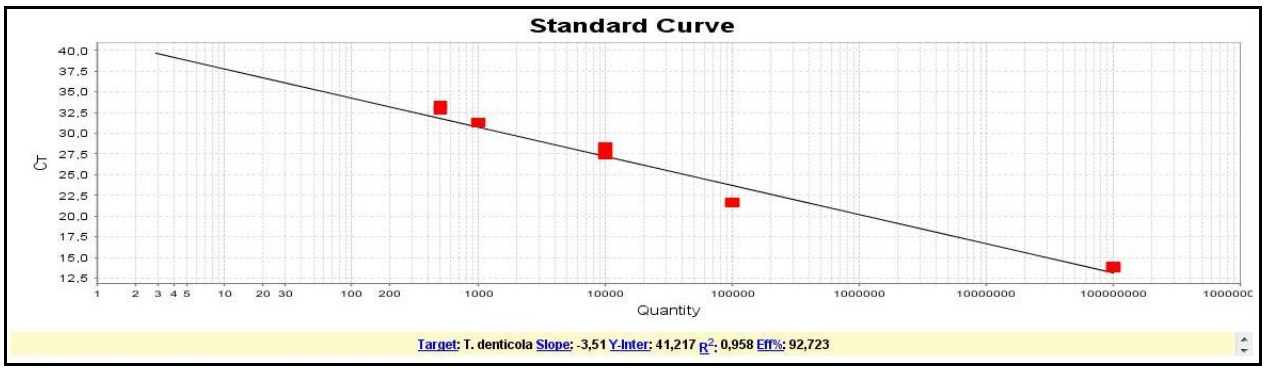


Figura 4.5 Curva padrão para *Treponema denticola* (500 a 10^8 cópias por μl)

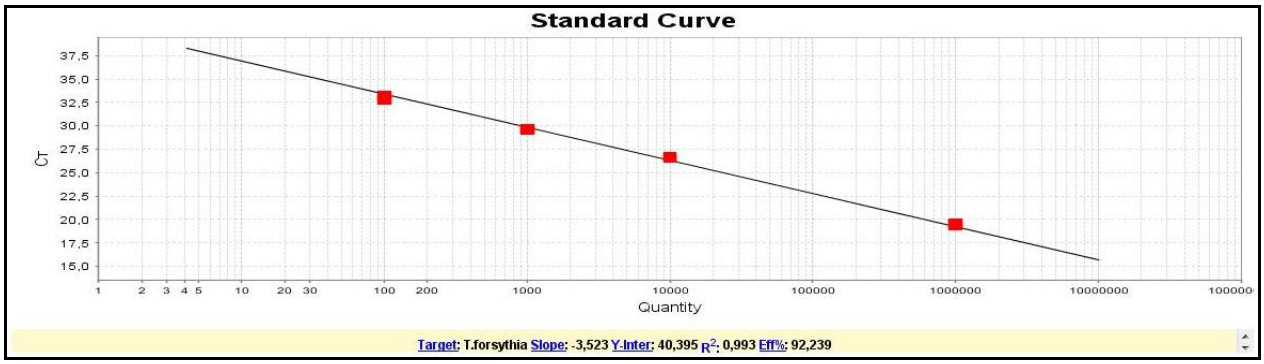


Figura 4.6 Curva padrão para *Tannerella forsythia* (100 a 10^7 cópias por μl)

4.13 ESTUDO DA QUANTIFICAÇÃO DOS PERIODONTOPATÓGENOS *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia*

As sondas e os iniciadores utilizados para detecção de *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* foram desenhados com o auxílio do programa Prime Express™ da Applied Biosystems, (Foster City, CA) (Tabelas 4.1 e 4.2). As sequências e os números de acesso dos genes da *Porphyromonas gingivalis* (número de acesso NC_010729), *Treponema denticola* (número de acesso M71236) *e*

Tannerella forsythia (número de acesso AJ006516) foram utilizados de acordo com o encontrado no Banco de Dados (Gene Bank http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados PCR em tempo real

	Iniciador *sense*	Iniciador *anti-sense*
Porphyromonas gingivalis	5'-ACCTTACCCGGGATTGAAATG-3'	5'-CAACCATGCAGCACCTACATAGAA-3'
Treponema denticola	5'-AGCGATGGTAGCAATACCTGT-3'	5'-TTCGCCGGGTTATCCCTC-3'
Tannerella forsythia	5'-CCGAATGTGCTCTACATAAAGGT-3'	5'-GATACCACTCGTTGCCTTGGT-3'

Tabela 4.2 - Sondas utilizadas PCR em tempo real utilizando a tecnologia TaqMan®

Bactéria	Sonda TaqMan®
Porphyromonas gingivalis	5'- / HEX/ ATGACTGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC / 3IabRQSp / -3'
Treponema denticola	5'-/ Cy5 / ATGGGCCCGCGTCCCATTAGC / 3IabRQSp/ -3'
Tannerella forsythia	5'FAM™ -CACGGGTGAGTAACG NFQ-MGB-3'

Nota: HEX, hexachloro-6- carboxy-fluorescine; 3IabRQSp, Iowa back RQ™-Sp; Cy5™, Cyanine 5-CTP (Cy5); FAM™, fluoróforo reporter ligado na extremidade 5'da sonda; MGB, Minor Groove Binder; NFQ, non-fluorescent quencher.

4.14 OTIMIZAÇÃO DE ENSAIO DA PCR EM TEMPO REAL

O ensaio da PCR em tempo real foi otimizado utilizando uma solução de 25μL contendo, 300nmol/L para *Porphyromonas gingivalis*, 300nmol/L para *Treponema denticola* e 200nmol/L para *Tannerella forsythia*, 200nM de sondas TaqMan® e TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 1μL de solução de DNA. A temperatura de desnaturação inicial da reação de amplificação foi de 95°C por 10 min e 40 ciclos (95°C por 10 seg, 60°C por 1 min). Os dados de fluorescência foram obtidos na etapa de 60°C pelo aparelho ABI Prism Sequence Detector System 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

4.15 PCR EM TEMPO REAL

A quantificação absoluta das bactérias estudadas *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola e Tannerella forsythia*, foi realizada através da PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação com sondas TaqMan®. A PCR em tempo real foi realizada utilizando uma solução de 25μL contendo 200nmol/L de cada oligonucleotídeo iniciador, 200nmol/L de Sonda TaqMan, 1x PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 1μL de solução de DNA. A reação de amplificação teve a temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 10 min e 40 ciclos (95°C por 10 seg, 60°C por 1 min). Os dados de fluorescência foram obtidos na etapa de 60°C pelo aparelho ABI Prism Sequence Detector System 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A solução não contendo a amostra de DNA foi utilizada como controle negativo,

e as diluições da curva padrão como controle positivo. Para confiabilidade da reação as amostras foram realizadas em duplicatas.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas SigmaStat v.3.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Após a obtenção dos resultados para cada medida dentro de cada grupo estes foram comparados estatisticamente. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado, a fim de verificar a normalidade na distribuição dos dados. Para as comparações dos valores intergrupos e intragrupos foram realizadas o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney.

No caso de comparação entre as três bactérias intergrupos e intragrupos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher. O nível de significância estabelecida foi de $p < 0,05$.

As variáveis categóricas foram apresentadas em tabelas e variáves quantitativas contínuas foram convertidas em log e apresentadas em forma de gráfico.

5 RESULTADOS

Foram examinados 50 pacientes dos quais 26 pacientes não foram incluidos na pesquisa por apresentarem tabagismo (11), diabetes (4) e ausência da doença periodontal (11). Vinte e quatro pacientes foram selecionados, sendo 17 do gênero feminino (73,91%) e 7 do gênero masculino (26.92%), com idade variando entre 35 e 65 anos (48 ± 7.54).

Um total de 96 amostras de biofilme subgengival foram avaliadas de sítios com perda de inserção ≥ 5 mm (TONETTI; CLAFFEY, 2005), em dentes uniradiculares contra laterais dos mesmos indivíduos totalizando 4 amostras por paciente.

Nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 podemos observar os valores absolutos em quantidade de cópias/mL referentes à *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola e Tannerella forsythia.* Os resultados da PCR em tempo real foram descritos da seguinte forma: quantitativos – quantidade de cópias/mL; qualitativos quando o número de cópias/mL encontra-se abaixo do limite de detecção estabelecido pela curva padrão, porém detectável pela metodologia e negativo quando há ausência do microrganismo investigado.

Na tabela 5.4 podemos observar que a prevalência da *Porphyromonas gingivalis* no sítio TESTE inicial foi de 79,16% e após o tratamento foi de 12,5% e no sítio CONTROLE inicial foi de 70,83% e após o tratamento foi de 12,5%. Entretanto no grupo TESTE inicial a prevalência do *Treponema denticola* foi de 83,33% no sítio TESTE inicial e após o tratamento foi de 4,16% e o sítio CONTROLE inicial 70,83% e após o tratamento foi de 16,6%. A prevalência da *Tannerella forsythia* no sítio TESTE inicial foi

de 91,66% e após o tratamento foi de 37,5% no sítio CONTROLE inicial foi de 87,5% e após o tratamento foi de 16,6% porém, não houveram diferenças estatisticamente significantes na prevalência entre os grupos

5.1 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Tabela 5.1 - Comparação inter e intragrupo entre as médias (± desvio-padrão) e as medianas (valor mínimo e valor máximo) referente à presença da bactéria *Porphyromonas gingivalis* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle) valores absolutos em quantidade de cópias/mL

	laser - teste		**rasp - controle**	
	inicial	**final**	**inicial**	**final**
Média	7673,96 [a]	390,5[b]	10539,79 [a]	3543,75 [b]
DP	± 21015,51	± 1309,079	± 28623,81	± 16994,81
Mediana	1[a]	0 [b]	1[a]	0 [b]
Min	0	0	0	0
Max	83611	5349	129511	85048

*em linhas, representam diferenças estatísticas para comparações intergrupos (inicial x inicial e final x final). Teste Anova e Mann-Whitney ($p<0,05$).
Letras diferentes, em linhas, representam diferenças estatística para as comparações das medidas intragrupo (inicial x final). Teste t e Wilcoxon ($p<0,05$).

Tabela 5.2 - Comparação inter e intragrupo entre as médias (± desvio-padrão) e as medianas (valor mínimo e valor máximo) referente à presença da bactéria *Treponema denticola* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle) valores absolutos em quantidade de cópias/mL

	laser - teste		**rasp – controle**	
	inicial	**final**	**inicial**	**Final**
Média	4543,46 [a]	0,042 [b]	7117,12 [a]	198,54 [b]
DP	± 9872,22	± 0,20	± 20553,52	± 765,28
Mediana	512,5 [a]	0 [b]	1[a]	0 [b]
Min	0	0	0	0
Max	47223	1	101153	3734

*em linhas, representam diferenças estatísticas para comparações intergrupos (inicial x inicial e final x final). Teste Anova e Mann-Whitney (p<0,05).
Letras diferentes, em linhas, representam diferenças estatística para as comparações das medidas intragrupo (inicial x final). Teste t e Wilcoxon (p<0,05).

Tabela 5.3 - Comparação inter e intragrupo entre as médias (± desvio-padrão) e as medianas (valor mínimo e valor máximo) referente à presença da bactéria *Tannerella forsythia* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle) valores absolutos em quantidade de cópias/mL

	laser - teste		**rasp – controle**	
	inicial	**final**	**inicial**	**final**
Média	11051,26	111,65	1847,30	2,43
DP	± 39712,30	± 430,01	± 3971,38	± 10,79
Mediana	671 [a]	0 [b]	280 [a]	0 [b]
Min	0	0	0	0
Max	195676	2074	18531	53

*em linhas, representam diferenças estatísticas para comparações intergrupos (inicial x inicial e final x final). Teste Anova e Mann-Whitney (p<0,05).
Letras diferentes, em linhas, representam diferenças estatística para as comparações das medidas intragrupo (inicial x final). Teste t e Wilcoxon (p<0,05).

Tabela 5.4 - Comparação inter e intragrupo entre as proporções das concentrações bacterianas para *Porphyromona gingivalis, Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* entre os períodos (inicial e final) e entre os tratamentos (grupos teste e controle)

	laser - teste		**rasp - controle**	
	inicial	**final**	**inicial**	**final**
Pg (%)	78,26 [a]	13,04 [b]	69,56 [a]	8,69 [b]
Tf (%)	91,3 [a]	34,78 [b]	86,95 [a]	17,39 [b]
Td (%)	82,6 [a]	4,34 [b]	69,56 [a]	13,04 [b]

* em linhas, representam diferenças estatísticas para comparações intergrupos (inicial x inicial e final x final). Teste Mann-Whitney ($p<0,05$).
Letras diferentes, em linhas, representam diferenças estatística para as comparações das medidas intragrupo (inicial x final). Teste Wilcoxon ($p<0,05$).

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou, pela técnica da PCR em tempo real, a redução de periodontopatógenos presentes no complexo vermelho de 48 dentes uniradiculares diagnosticados com periodontite crônica apresentando perda de inserção ≥ 5mm tratados com RAPCR ou RAPCR associado com o laser de Diodo de 808nm. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significante após a sua aplicação.

O critério selecionado foi um estudo randomizado de modelo de boca dividida que permite observar os resultados em um mesmo paciente, minimizando as possíveis variações, interferindo de forma igual e possibilitando usar um menor número de pacientes (HUJOEL; DEROUEN, 1992; HUJOEL; LOESCHE, 1990; PAGE, 1995).

Em nosso estudo realizamos a detecção e a quantificação de *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia*. A escolha desses patógenos periodontais se deve ao fato de diversos estudos microbiológicos e clínicos demonstrarem que a sua presença pode estar relacionada com a periodontite crônica (MINEOKA et al., 2008; NOIRI; EBISU; LI, 2001; NUNN, 2003; TAKEUSHI et al., 2001; XIMENEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000). Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos encontrados na literatura porque todas as amostras apresentaram pelo menos um desses microrganismos selecionados.

O tratamento da periodontite crônica (TONETTI; CLAFFEY, 2005) é realizado através da RAPCR que é considerado como ”padrão ouro”. Este procedimento visa uma instrumentação manual na superfície radicular proporcionando uma redução de

periodontopatógenos presentes no biofilme dental para os parâmetros compatíveis com saúde (BADERSTEN; NILVEUS; EGELBERG, 1981; BADERSTEN; NILVEUS EGELBERG, 1984 a,b; DARBY; KINANE; MOONEY, 2001)

Estudos recentes sugerem que o laser possa operar como um método alternativo ou associado à RAPCR (BORRAJO et al., 2004; KREISLER et al., 2005; SCHWARZ et al., 2003). Este benefício estaria relacionado com a redução microbiana presente no biofilme dental que é considerado como fator etiológico da doença periodontal.

O critério de escolha para a utilização do laser de Diodo foi baseado em estudos que demonstraram que o seu comprimento de onda apresenta poder de penetração e afinidade por pigmentos presentes em algumas bactérias, que serviriam como cromóforos absorvedores, intensificando a sua ação, permitindo dessa maneira alcançar e atingir bactérias anaeróbias de pigmentação negra, como é o caso das *Porphyromonas gingivalis*, podendo ocorrer uma redução destas bactérias. Esta característica também pode ser vantajosa pelo fato de ocorrer uma menor absorção pelos tecidos duros que são compostos por uma grande porcentagem de água evitando assim efeitos danosos à essas estruturas (COBB, 1996; COLUZZI, 2000).

É importante ressaltar que o laser de Diodo não é muito absorvido pela água e nem pela hidroxiapatita e, por esta razão, a energia absorvida é transformada em calor aumentando a temperatura da superfície. Por este motivo, preconizamos a potência de 1,5W, a inclinação de aplicação da ponta do laser em relação à superfície radicular de aproximadamente 20° e o tempo de 20 seg de acordo com o estudo de De Micheli (2006) e Haypek et al. (2006) que demonstraram a ausência de efeitos colaterais danosos à superfície radicular como carbonização, trincas e fusões.

Poucos estudos encontrados na literatura avaliam a eficiência do laser de Diodo no tratamento periodontal. Além disso, existem diferenças metodológicas entre os estudos como variações nos parâmetros do laser, no desenho do estudo, na severidade da doença periodontal e na ausência de padronização do protocolo de tratamento para aplicação do laser, ocasionando uma dificuldade de comparação dos resultados (MORITZ et al., 1997; MORITZ et al., 1998).

Um outro fator observado em estudos com o laser de Diodo foi a ausência de padronização da quantidade de energia liberada pela ponta da fibra óptica através de um medidor de energia. Em nosso estudo houve uma perda de aproximadamente 20% de sua potência de saída, o que nos levou a compensar essa perda através de um ajuste na quantidade de energia no display do aparelho.

A aplicação do laser foi realizada após 24h à RAPCR porque a presença do sangramento ocasionado pela RAPCR pode interferir no aumento de temperatura da ponta da fibra do laser (COLUZZI, 2004; DE MICHELI, 2006).

Após a primeira aplicação do laser este procedimento foi repetido depois de 7 dias. Este intervalo de tempo foi baseado nos estudos de Cobb, McCawley e Killoy (1992) e Haffajee e Socransky (2006) que observaram que a remoção do biofilme através da RAPCR pode resultar em uma diminuição inicial das bactérias presentes no complexo vermelho, podendo ocorrer uma possível recolonização após 7 dias.

Alguns estudos avaliaram a eficiência do laser de Diodo na redução microbiana, através do método da cultura (BENEDICENTI et al., 2008; DE MICHELI, 2006 GUTKNECHT et al., 2000; GUTKNECHT et al., 2004) e técnicas de biologia molecular

(CARUSO et al., 2008; KAMMA; VASDEKIS; ROMANOS, 2009; MORITZ et al., 1997; MORITZ et al., 1998).

Por muitos anos uma das principais técnicas disponíveis para identificar e quantificar microrganismos das diversas áreas da cavidade bucal foi a cultura microbiana. Essa metodologia é confiável, reprodutível, específica, sensível que permite a avaliação da susceptibilidade e resistência ao antibiótico (TSAI et al., 2003). Porém, existem evidências de que a composição da microbiota bucal foi subestimada nos estudos com cultura, uma vez que apenas os microrganismos cultiváveis nas condições laboratoriais usadas foram isolados (KUMAR et al., 2003). Além desta desvantagem, o alto custo e grande consumo de tempo de trabalho torna esta metodologia muito onerosa (LAU et al., 2004; LOOMER, 2004; LOTUFO; PANNUTI; SARAIVA, 2001; SANZ et al., 2004; TSAI et al., 2003).

A PCR em tempo real foi desenvolvida como novo recurso de diagnóstico que associado aos outros métodos moleculares já utilizados em rotina laboratorial, possa colaborar no diagnóstico, especialmente nos casos em que a quantidade de bactérias é um fator importante para confirmar o agente etiológico da doença. É uma técnica sensível, eficiente e reprodutível. Vários estudos demonstram segurança em seu emprego na quantificação de espécies da cavidade bucal principalmente em periodontopatógenos (KAWADA et al., 2004; LYONS et al., 2000; MARTIN et al., 2002; MORILLO et al., 2004; SAKAMOTO et al., 2001; SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005).

Deste modo, a PCR em tempo real foi o método de escolha utilizado em nosso estudo por apresentar resultados quantitativos em tempo real sem a necessidade da exposição a substâncias carcinogênicas (ex. brometo de etídio), além de monitorar os

sinais fluorescentes possibilitando a quantificação dos fragmentos de DNA bacterianos em tempo real na sua fase logarítimica da PCR e apresentando resultados de forma mais precisa e com reprodutibilidade (HEID et al., 1996). Por essas razões em nosso estudo tivemos o cuidado de utilizar um jogo de curetas periodontais para cada sítio com o objetivo de evitar uma possível contaminação durante o procedimento clínico entre os dois sítios CONTROLE e TESTE.

Neste estudo, avaliamos a capacidade de diagnóstico da PCR em tempo real que quantifica o DNA de *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia*. Para este propósito amplificamos parte do fragmento da sequência *16s rRNA*, que é uma região alvo para a síntese de oligonucleotídeos taxonomicamente específicos. A clonagem foi realizada com o objetivo de estabelecer a curva padrão de cada bactéria estudada, ou seja, estabelecer o número de cópias/μL.

Os resultados da PCR em tempo real foram descritos da seguinte forma: quantitativos quantidade de cópias/mL; qualitativos quando o número de cópias/mL encontra-se abaixo do limite de detecção estabelecido pela curva padrão, porém detectável pela metodologia e negativo quanda há ausência do microrganismo investigado.

A análise estatística evidenciou que não houve diferença significativa quanto à redução de bactérias após seis semanas entre os sítios estudados, demonstrando que a aplicação do laser de Diodo nos parâmetros utilizados em bolsas periodontais não é capaz de reduzir de forma significante os periodontopatógenos (DE MICHELI, 2006), o que difere dos resultados obtidos nos trabalhos de Aoki et al. (2004), Ishikawa et al. (2009) e Schwarz et al. (2008), que demonstraram que a aplicação do laser contribuiu

na redução microbiana associado com RAPCR.

Com o objetivo de verificar a concentração inicial da microbiota, a primeira avaliação microbiológica foi realizada antes do tratamento. A segunda avaliação foi realizada após seis semanas do tratamento. A escolha deste intervalo de tempo foi baseada no estudo de Haffajee et al. (1997) que demonstraram que a recolonização ocorre após seis semanas.

Não existe na literatura estudos que tenham utilizado a PCR em tempo real como método de diagnóstico para a avaliação da redução de periodontopatógenos na RAPCR associado ao laser de Diodo, dificultando a comparação dos resultados do sítio TESTE.

A prevalência da *Porphyromonas gingivalis* antes do tratamento no sítio CONTROLE foi de 79,16% e no sítio TESTE foi de 70,83%. No final do experimento foi de 12,5% em ambos os sítios. O tratamento realizado nos dois sítios foi capaz de promover a redução desta bactéria. Este resultado está de acordo com os estudos que relatam a sua redução após a RAPCR (MIYAZAKI et al., 2003; ; SAKAMOTO et al., 2004; SOCRANSKY et al., 1991). A média de redução na concentração deste patógeno foi, após seis semanas, no sítio TESTE de 65,22% e no sítio CONTROLE de 60,87%. Estes valores são superiores aos dados de Doungudomdacha et al. (2001), que detectaram a redução de 46,9% um mês após a RAPCR.

Em relação à *Treponema denticola*, a média de redução na concentração deste patógeno foi, após seis semanas, no sítio TESTE de 78,26% e no sítio CONTROLE de 56,52%. Assim como relatado na literatura, em nosso estudo houve uma redução significativa na prevalência de *Treponema denticola* (DARBY; MOONEY; KINANE, 2001; HAFFAJEE et al., 1997) mas entre os sítios estudados não houve diferença

estatisticamente significante.

A redução nos níveis de *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* nos sítios TESTE foi maior do que no sítio CONTROLE provavelmente pelo fato de serem espécies pigmentadas e o laser de Diodo ter afinidade por tecidos pigmentados.

Em relação à *Tannerella forsythia* existem poucos trabalhos que relacionam o efeito da RAPCR e a sua redução. Vale ressaltar que esta dificuldade pode estar relacionada à influência da técnica microbiológica e a sua patogênese na doença periodontal. Em relação à técnica microbiológica utilizada, os limites de detecção e as características de cada microrganismo podem sofrer influência. Pelo fato de ser uma espécie bacteriana que requer condições estritas de crescimento, como condições de anaerobiose, estas espécies apresentam dificuldades de serem detectadas através da cultura (EZZO; CUTLER, 2003) que foi o método de detecção mais utilizado até o surgimento das técnicas de biologia molecular. Além disso, o que se refere à patogênese da infecção por *Tannerella forsythia*, ainda não é muito bem compreendida porque os fatores de virulência envolvidos não foram adequadamente descritos e caracterizados (SHARMA et al., 2005). Assim, ao contrário do presente estudo e do trabalho de Ambrosini et al. (2005) em que a prevalência de *Tannerella forsythia* foi maior do que a de *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, Del Peloso Ribeiro et al. (2008) encontraram uma maior prevalência de *Porphyromonas gingivalis*, seguido de *Tannerella forsythia* também utilizando neste caso como método de detecção a PCR em tempo real. Porém, a média de redução na concentração deste patógeno foi, após seis semanas, no sítio TESTE de 56,52% e no sítio CONTROLE de 69,56%.

Os resultados microbiológicos do sítio CONTROLE obtidos no presente estudo foram, de certa maneira semelhantes aos encontrados em outros estudos, já no sítio

TESTE esta comparação não pôde ser realizada devido à ausência de estudos com a mesma metodologia.

Diante do exposto, a redução dos periodontopatógenos no ambiente subgengival é importante para o sucesso da terapia periodontal. Neste contexto, apesar da ausência de diferença entre os sítios tratados com ou sem a aplicação do laser, ambos foram capazes de promover uma redução após seis semanas demonstrando que para alcançarmos este objetivo, a descontaminação radicular pode ser obtida através de medidas simples e rápidas.

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir que, de acordo com a metodologia desenvolvida neste estudo o laser de Diodo associado à RAPCR não reduziu de forma significativa os peridontopatógenos *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* quando comparado à RAPCR.

REFERÊNCIAS

Ambrosini P, Miller N, Briançon S, Gallina S, Penaud J. Clinical and microbiological evaluation of the effectiveness of the Nd:Yap laser for the initial treatment of adult periodontitis. A randomized controlled study. J Clin Periodontol 2005;32(6):670-6.

Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. Periodontol 2000 2004;36:59-97.

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

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

Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. III. Single versus repeated instrumentation J Clin Periodontol 1984b;11(2):114-24.

Benedicenti S, Cassanelli C, Signore A, Ravera G, Angiero F. Decontamination of root canals with the gallium-aluminum-arsenide laser: an in vitro study. Photomed Laser Surg 2008 26(4):367-70.

Ben Hatit Y, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: an in vivo study. J Clin Laser Med Surg 1996;14:137-43.

Borrajo JL, Varela LG, Castro GL, Rodríguez-Nuñez I, Torreira MG. Diode laser (980 nm) as adjunct to scaling and root planing Photomed Laser Surg 2004;22(6):509-12.

Caruso U, Nastri L, Piccolomini R, d'Ercole S, Mazza C, Guida L. Use of diode laser 980 nm as adjunctive therapy in the treatment of chronic periodontitis. A randomized controlled clinical trial. New Microbiol 2008;31(4):513-8.
[1]

[1] [1] De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

Chanthaboury R, Irinakis T. The use of lasers for periodontal debridement: marketing tool or proven therapy? J Can Dent Assoc 2005;71(9):653-8.

Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. Ann Periodontol 1996;1(1):443-90.

Cobb CM, McCawley TK, Killoy WJ. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. J Periodontol 1992;63(8):701-7.

Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. Dent Clin North Am 2000;44(4):753-65.

Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. Dent Clin North Am 2004;48(4):751-70.

Costerton JW. Overview of microbial biofilms. J Ind Microbiol 1995;15(3):137-40.

Darby IB, Mooney J, Kinane DF. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. J Clin Periodontol 2001;28(8):796-805.

Del Peloso Ribeiro É, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH Jr., Gonçalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. J Clin Periodontol 2008;35(9):789-98.

De Micheli G. Laser de Diodo de alta intensidade (808 ± 5nm) em Periodontia. Estudo “in vivo” da redução bacteriana em bolsas periodontais, como coadjuvante ao tratamento radicular convencional [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

Doungudomcha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CWI. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotell intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. J Clin Periodontol 2001;28(5):4337-445.

Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. Periodontol 2000 2003;32(1):24-35.

Flemmig TF, Petersilka GJ, Mehl A, Hickel R, Klaiber B. Working parameters of a magnetostrictive ultrasonic scaler influencing root substance removal in vitro. J Periodontol 1998;69(5):547-53.

Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. J Clin Laser Med Surg 2004;22(1):9-13.

Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. J Clin Laser Med Surg 2000;18(2):57-60.

Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. Periodontol 2000 2006;42:7-12.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:78-111.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of peridontal diseases. J Clin Periodontol 1997;24(5):324-34.

Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. Periodontol 2000 1997;14:202-15.

Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. Oral Microbiol Immunol 1999;14(5):326-330.

Haypek P, Zezell DM, Bachmann L, Marques MM, Interaction Between High-power Diode Laser and Dental Root Surface. Thermal, Morphological and Biocompatibility Analysis. J Oral Laser App 2006(6):101-9.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996;6(10):986-94

Hujoel PP, DeRouen TA. Validity issues in split-mouth trials. J Clin Periodontol 1992;19(9):625-7.

Hujoel PP, Loesche WJ. Efficiency of split-mouth designs. J Clin Periodontol 1990;17(10):722-8.

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

Ishikawa I, Baehni P. Nonsurgical periodontal therapy – where do we stand now? Periodontol 2000 2004;36:9-13.

Kamma JJ, Vasdekis VG, Romanos GE. The Effect of Diode Laser (980 nm) Treatment on Aggressive Periodontitis: Evaluation of Microbial and Clinical Parameters. Photomed Laser Surg 2009;27(1):11-9.

Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T, Oho T, et al. Prevalence of Porphyromonas gingivalis in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. Oral Microbiol Immunol 2004;19(5):289-92.

Kozlovsky A, Soldinger M, Sperling I. The effectiveness of the air-powder abrasive device on the tooth and periodontium: an overview. Clin Prev Dent 1989;11(4):7-11

Kreisler M, Al Haj H, Daubländer M, Götz H, Duschner H, Willershausen B, et al. Effect of diode laser irradiation on root surfaces in vitro. J Clin Laser Med Surg 2002;20(2):63-9.

Kreisler M, Al Haj H, d'Hoedt B. Clinical efficacy of semiconductor laser application as an adjunct to conventional scaling and root planing. Lasers Surg Med 2005;37(5):350-5.

Kreisler M, Meyer C, Stender E, Daubländer M, Willershausen-Zönnchen B, d'Hoedt B. Effect of diode laser irradiation on the attachment rate of periodontal ligament cells: an in vitro study. J Periodontol 2001;72(10):1312-7.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ.New bacterial species associated with chronic periodontitis. J Dent Res 2003;82(5):338-44.

Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2004;31(12):1061-9.

Lindhe J, Nyman S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. J Clin Periodontol 1984;11(8):504-14.

Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. J Periodontol 1976;47(1):1-18.

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

Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev 1976;9:65-107.

Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. Periodontol 2000 2004;34:49-56.

Lotufo RF, Pannuti CM, Saraiva MC. Bacteroides forsythus: sensitivity to antimicrobial agents in samples from patients with periodontitis. Pesqui Odontol Bras 2001;15(1):47-50.

Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. J Clin Microbiol 2000;38(6):2362-5.

Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter NJ. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. Clin Microbiol 2002;40(5):1698-704.

Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia in subgingival plaque. J Periodontol 2008;79(4):670-6.

Miyazaki A, Yamaguchi T, Nishikata J, Okuda K, Suda S, Orima K et al. Effects of Nd:YAG and CO2 laser treatment and ultrasonic scaling on periodontal pockets of chronic periodontitis patients. J Periodontol 2003;74:175-180.

Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P, et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. J Clin Laser Med Surg 1997;15(1):33-7.

Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak O, Wernisch J, et al. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. Lasers Surg Med 1998;22(5):302-11.

Noiri Y, Li L, Ebisu S. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. J Dent Res 2001;80(10):1930-4.

Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. Periodontol 2000 2003;32:11-23.

Page RC. Critical issues in periodontal research. J Dent Res 1995;74(4):1118-28.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol 2001;183(12):3770-83.

Preshaw PM, Seymour RA, Heasman PA. Current concepts in periodontal pathogenesis. Dent Update 2004;31(10):570-2, 574-8.

Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. J Med Microbiol 2004; 53 (Pt 6): 563- 71.

Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol Immunol 2001;45(1):39-44.

Sakamoto M, Umeda M, Benno YJ. Periodontal Molecular analysis of human oral microbiota. Res 2005;40(3):277-85.

Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. J Clin Periodontol 2005;32 Suppl 6:108-29.

Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning**:** a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva AJ. Methods of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. Clin Periodontol 2004;31(12):1034-47.

Schwarz F, Aoki A, Becker J, Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. J Clin Periodontol 2008;35(8 Suppl):29-44.

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

Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfintescu C, Baker PJ, Evans RT. Tannerella forsythia-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein.J Dent Res 2005;84(5):462-7.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000 2005;38:135-87.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. J Clin Periodontol 1991;18(10):766-75.

Stern RH, Sognnaes RF. Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo. J Am Dent Assoc 1972;85(5):1087-90.

Suvan JE. Effectiveness of mechanical nonsurgical pocket therapy. Periodontol 2000 2005;37:48-71.

Takeushi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol 2001;72(10):1354-63.

Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. Dent Clin North Am 2005;49(3):491-516.

Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Löe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodontal Res 1966;1:1-13.

Theodoro LH, Haypek P, Bachmann L, Garcia VG, Sampaio JE, Zezell DM, et al. Effect of ER:YAG and diode laser irradiation on the root surface: morphological and thermal analysis. J Periodontol 2003;74(6):838-43.

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

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. J Clin Periodontol 2005;32 Suppl 6:210-3.

Tsai CY, Wolff LF, Germaine G, Hodges J. A rapid DNA probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria. J Clin Periodontol 2003;30(1):57-62.

Tunér J, Hode L. It’s all in the parameters: a critical analysis of some well-knwon negative studies on low-level laser therapy. J Clin Laser Med Surg 1998;16(5):243.

Tunkel J, Heinecke A, Flemmig TF. A systematic review of efficacy of machine-driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2002;29 Suppl 3:72-81; discussion 90-1.

Van Winkelhoff AJ, Boutaga K. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. J Clin Periodontol 2005; 32 Suppl 6: 16-27.

Yukna RA, Scott JB, Aichelmann-Reidy ME, LeBlanc DM, Mayer ET. Clinical evaluation of the speed and effectiveness of subgingival calculus removal on single-rooted teeth with diamond-coated ultrasonic tips. J Periodontol 1997;68(5):436-42

Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. As observed in human biopsy material. J Periodontol 1978;49(1):1-8.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra-and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol 2000;27(10):722-32.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 05/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa *"Análise in vivo da redução bacteriana periodontopatogênica pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real após aplicação do laser Er. YAG"*, de responsabilidade do pesquisador **Márcio Seto Yu Yuen**, sob orientação do Professor Doutor **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, 10 de março de 2004

Profª Drª ROSA HELENA MIRANDA GRANDE
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impresso no S.D.O.

ANEXO B – Temo de Consentimento Livre e Esclarecido / Anamenese e Periograma

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido

Por este instrumento aceito colaborar com o projeto de pesquisa denominado “Efeito do laser de Diodo de 808nm como coadjuvante ao tratamento periodontal na redução de periodontopatógenos” que tem como objetivo:
- Analisar a redução de bactérias que causam a doença periodontal (“doença da gengiva”) após aplicação do laser de Diodo.
Declaro, meu consentimento na participação da pesquisa é voluntário e que não sofri qualquer tipo de pressão ou força. Informaram-me também do direito de interromper o tratamento a qualquer momento, sem prejuízo algum.
Aceito responder um questionário sobre minha saúde geral bucal e que seja recolhido material da bolsa periodontal para que seja feito um exame apenas das bactérias periodontopatogênicas (bactérias que causam a doença da gengiva).
Sei também que minha identidade não será revelada sob qualquer circustância, e que os dados e imagens posteriormente publicados em literatura não possibilitarão de forma alguma minha identificação.
Não receberei e nem efetuarei nenhum pagamento pela minha participação na pesquisa.
No decorrer do tratamento, em alguns casos, é possível que ocorra algum desconforto na região em tratamento. Frente quaisquer dúvidas adicionais, poderei entrar em contato com o Prof. Assc. Giorgio De Micheli pelo tefefone 11 3091-7833. Para esclarecimento das mesmas e receberei todo o amparo necessário.
Entendo que, como participante desta pesquisa, terei todo tratamento periodontal realizado.

Nome: _____ Data de Nascimento:_____
RG: _____ Data de expedição:_____
Endereço: _____
CEP: _____ Telefone: _____
São Paulo, ____ de _____ de 200_

_____
Assinatura do paciente

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Departamento de Estomatologia
Disciplina de Periodontia

PACIENTE ..... R.G. .....
SEXO..... DATA DE NASCIMENTO... / ..... ESTADO CIVIL.....
NACIONALIDADE ..... NATURALIDADE. .....
ENDEREÇO:Res ..... CEP ..... TEL.....
Com.. ..... CEP ..... TEL. .....
PROFISSÃO:. ..... EXAMINADOR .....

DECLARAÇÃO

Eu ..... R.G. .....
declaro para todos os fins legais, que prestarei esclarecimentos corretos sobre o meu estado de saude, nada omitindo no questionario que se segue:

São Paulo, de de

_____

CUIDADOS ESPECIAIS.

.....
.....
.....
.....
.....

S 0-0/0

SAÚDE GERAL

1. Está em tratamento médico? sim ( ) não ( )
2. Foi submetido a alguma cirurgia? sim ( ) não ( )
3. Teve alguma destas doenças:
- Hepatites sim ( ) não ( )
- Tuberculose sim ( ) não ( )
- Ataque Cardíaco sim ( ) não ( )
- Diabetes sim ( ) não ( )
- Febre Reumática sim ( ) não ( )
4. Toma anticoagulante (AAS)? sim ( ) não ( )
5. É fumante? Sim ( ) não ( ) Quantos?.....
6. Pressão alta? sim ( ) não ( )
7. Sofre dos rins ou bexiga? sim ( ) não ( )
8. Tem com freqüência algum tipo de hemorragia sim ( ) não ( )
9. Aparecem manchas roxas no corpo com freqüência sim ( ) não ( )
10. Anemia? sim ( ) não ( )
11. Tem alguma alergia? sim ( ) não ( )
12. Alergia a quê? sim ( ) não ( )
13. Já recebeu transfusão de sangue? sim ( ) não ( )
14. Tem doença sexualmente transmissível (AIDS) sim ( ) não ( )
15. Tem tonturas? sim ( ) não ( )
16. Tem convulsões? sim ( ) não ( )
17. Menstruação normal? sim ( ) não ( )
18. Está grávida? sim ( ) não ( )
19. Toma anticoncepcional? sim ( ) não ( )
20. Está na menopausa? sim ( ) não ( )
21. Medicamento em uso:

.....

.....

PARTE ODONTOLÓGICA

1 Queixa do Paciente: .....

.....

.....

2 Já teve feridas nos lábios ou língua que demoraram para sarar? sim ( ) não ( )
3 Come muito doce? sim ( ) não ( ) Refrigerantes: sim ( ) não ( )
4 Tem hábito de ranger ou apertar os dentes? sim ( ) não ( )
5 Tem sangramento gengival? sim ( ) não ( )
6 Tem dor nas gengivas? sim ( ) não ( )
7 Tem dentes abalados? sim ( ) não ( )
8 Quantas vezes por dia escova os dentes? sim ( ) não ( )
9 Usa escova: dura ( ) média ( ) mole ( ) Pasta: .....
10 Utiliza fio ou fita dental? sim ( ) não ( )
11 Quantas vezes por dia? .....
12 Usa outros métodos de limpeza? sim ( ) não ( )
13 Quais? .....
14 Bochechos? Sim ( ) não ( ) Qual?.....
15 Já fez aplicação tópica de flúor? sim ( ) não ( )

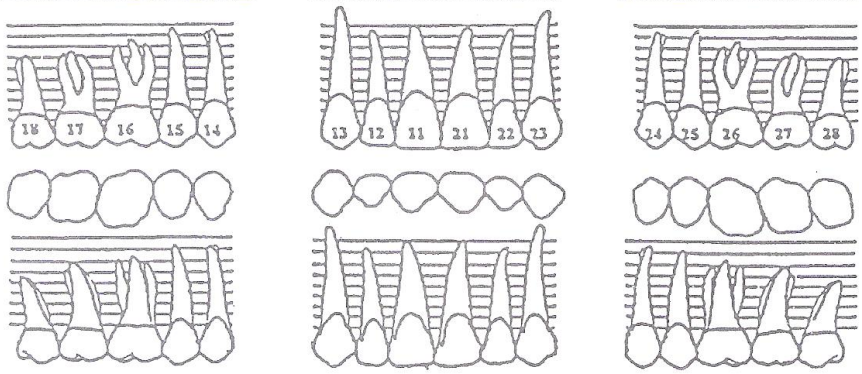
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
DISCIPLINAS DE PERIODONTIA

PACIENTE: _____ Nº: _____

IDADE: _____ SEXO: _____ RAÇA:_____ DATA DO EXAME: __/__/___

FICHA INICIAL ( ) REAVALIAÇÃO ( ) FINAL ( )

UEC – MG
PCS – SS
NCI

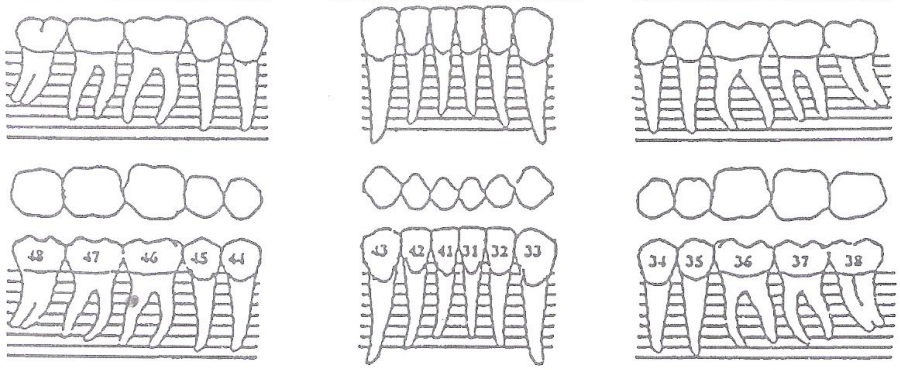


VESTIBULAR

PALATINA

UEC – MG
PCS – SS
NCI

UEC – MG
PCS – SS
NCI



LINGUAL

VESTIBULAR

UEC – MG
PCS – SS
NCI

Índice de Sangramento: ___%

PSR