UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de CTBMF e Periodontia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

**Efeitos clínicos e microbiológicos da Terapia Fotodinâmica
Antimicrobiana no tratamento cirúrgico da Periodontite Crônica:
Um estudo clinico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado
e duplo-cego.**

SÉRGIO HENRIQUE LAGO MARTINS

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

SÉRGIO HENRIQUE LAGO MARTINS

Efeitos clínicos e microbiológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento cirúrgico da Periodontite Crônica: Um estudo clínico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

VERSÃO CORRIGIDA

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

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

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Martins, Sérgio Henrique Lago.

Efeitos clínicos e microbiológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento cirúrgico da Periodontite Crônica: Um estudo clínico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego / Sérgio Henrique Lago Martins ; orientador Sérgio Luís Scombatti de Souza. – Ribeirão Preto, 2016. Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa

117 p. : il.

Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2016.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Periodontite Crônica. 3. Antimicrobiano.

MARTINS, S. H. L. Efeitos clínicos e microbiológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento cirúrgico da Periodontite Crônica: Um estudo clinico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus e aos amigos de Luz,

Por me conceder a vida e estar comigo em todos os momentos, me guiando e protegendo.

À minha Mãe,

Que é meu maior exemplo de força, determinação. Obrigado por todo esforço, dedicação, ensinamentos e princípios os quais trago comigo. Por toda abdicção as quais me proporcionou alcançar meus objetivos. Te amo, Mãinha.

À minha noiva Mariah,

Que divide comigo todos os momentos importantes da minha vida. Dedico a você não apenas este trabalho como também o que há de bom em mim. Obrigado por todo amor, força, paciência ao longo de toda minha jornada e pela maravilhosa companhia diária.

Amo você.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** - Universidade de São Paulo, nas pessoas de sua Diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e Vice-Diretor Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Júnior. Pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Em especial, ao meu orientador, **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, exemplo de profissional, um dos grandes nomes da Periodontia mundial, que admiro muito. Por todo conhecimento transmitido, mas principalmente pela confiança em mim depositada e por todas as oportunidades oferecidas durante este período. Foi uma honra e privilégio levar em meu currículo e formação seu nome como orientador. Muito obrigado por tudo.

Aos professores do programa de pós graduação em Periodontia da FORP – USP: **Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Júnior**, pelas críticas sempre construtivas; **Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto Bulle**, pelas ideias visionárias de melhorias na Clínica de Pós-Graduação; **Prof. Dr. Mário Taba Jr.**, pelas perguntas-resposta que estimulavam nosso raciocínio científico e por todo ensinamento em bioestatística; **Prof. Dr. Michel Reis Messor**, pelos ensinamentos de como desenvolver uma pesquisa científica e por todo os ensinamentos com os seminários, estimulando um olhar crítico aos mais diversos tipos de estudo; **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, pelo visionário científico fantástico, o qual nos beneficiou em transmitir parte do seu conhecimento na área de biologia molecular e celular; **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi**, o Chuck Norris da Periodontia, por todo conhecimento clínico ensinado, sem falar das técnicas minimamente invasivas ensinadas.

Ao professor e amigo **Dr. Danilo Maeda Reino**, pelo incentivo, convivência, conhecimentos transmitidos na área de Periodontia e Implantodontia e pela gentil colaboração na realização das análises estatísticas.

Aos amigos de turma da turma de Mestrado: **Felipe** (Crazy), pela parceria diária e um verdadeiro irmão que ganhei em Ribeirão; **Gabriel**, pelo convívio fantástico que fizeram os dias serem melhores, sem falar os conhecimentos clínicos ensinados; **Carla**, por fazer com que os dias ficassem mais leves e felizes; **Milena**, por sempre ser sábia e ajudar nas tomadas de decisões; **Jéssica**, minha dupla, por dividir momentos de dúvidas e tomadas de condutas; **Luiz**, por me ensinar o trabalho científico com animais; e **Camila**, por todas as dúvidas tiradas com relação a pesquisa científica.

Aos colegas da turma de Doutorado em especial: **Umberto**, pelo fantástico pós-graduando que auxiliou frequentemente na prática diária e proporcionou excelentes oportunidades;

Marquinhos, pelas risadas diárias; **Gustavo**, pelas orientações e brincadeiras.

A **Uislen Cadore**, pelo companheirismo e ajuda que facilitou a finalização do trabalho.

Aos professores do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho) - Universidade de São Paulo: **Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Luis Augusto Esper, Sueli Lobo Devides, Flávio Monteiro Amado e Caio Márcio Figueiredo** por todo conhecimento transmitido na área de Periodontia e Implantodontia. O que fizeram com que aumentasse a paixão pela minha especialização.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia, **Aparecida Dulce de Oliveira Negretti, Carla Daniela Lima da Silvatti e Tatiana A. Passos Fernandes**, meus sinceros agradecimentos, pela eficiência, disposição, atenção, cordialidade e bom-humor; e pela dedicação ao nosso curso de pós-graduação e a seus alunos.

Aos **professores de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial**: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, Prof. Dr. Alexandre Elias Trivellato, Prof. Dr. Cassio Edvard Sverzut, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier e Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros pelo convívio agradável.

À **Profa. Dra. Luciene Figueiredo (UnG)** por seu inestimável auxílio na interpretação dos dados microbiológicos juntamente com a bióloga **Izilvania Barreto**, que tão bem me recebeu, pela presteza na realização da análise microbiológica do nosso estudo.

Às funcionárias da clínica de pós-graduação, **Dani e Joaninha**, pela amizade, respeito, disponibilidade, convívio descontraído, ajuda e dedicação a todos nós.

À especialista de laboratório **Fabíola S. de Oliveira** por sua contribuição no desenvolvimento do estudo, assessorando as tomadas de decisões laboratoriais.

À técnica de laboratório **Milla Tavares** pelos risos e aprendizado laboratorial.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação **Isabel C. Galino Sola e Mary Possani Carmessano** pela disponibilidade, competência e atenção concedidas.

Aos **Pacientes**, os quais foram colaboradores ao desenvolvimento da pesquisa, sempre comparecendo e colaborando as atividades necessárias ao desenvolvimento do estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro deste trabalho (Processo N° 14/09801-9), o qual possibilitou a realização desta tese.

*“Você nunca está errado em fazer a coisa
certa”*

Mark Twain

Resumo

Resumo

MARTINS, S.H.L. **Efeitos clínicos e microbiológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento cirúrgico da Periodontite Crônica: Um estudo clínico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego.** 2016. XX f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A periodontite crônica (PC) é uma doença infecciosa resultando em inflamação das estruturas de suporte dos dentes, perda progressiva de inserção e perda óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) como adjuvante ao tratamento periodontal cirúrgico (TPC) em pacientes diagnosticados com periodontite crônica avançada generalizada (PCAG). Em um modelo tipo boca dividida, 20 pacientes com diagnóstico clínico de PCAG receberam inicialmente preparo básico periodontal não cirúrgico com sessões periódicas de raspagem e alisamento radicular (RAR). Depois disso, os sítios com indicação de terapia cirúrgica foram tratados com TFDa associada a raspagem e alisamento radicular (RAR) a retalho ou apenas RAR a retalho. Para protocolo da TFDa, foi utilizada uma fonte de luz laser 660nm de comprimento de onda associada ao fotossensibilizador fenotiazina. Todos os pacientes foram acompanhados por mais 90 dias após a terapia cirúrgica. Nos períodos *baseline*, pós-terapia básica e 90 dias após a terapia cirúrgica foi realizada a avaliação clínica de índice de placa (IP), profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínico relativo (NIC) e sangramento a sondagem (SS), além da coleta de amostras de biofilme subgengival para a identificação e quantificação das espécies bacterianas através da técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Foi observado redução significativa na PS no grupo teste. A utilização da TFDa demonstrou ser superior na redução de patógenos periodontais, principalmente na bactéria do complexo vermelho: *T. denticola*. Ambos tratamentos foram eficientes no controle da PCAG, porém a TFDa parece possuir maior estabilidade no controle dos parâmetros clínicos e microbiológicos.

Palavras-Chave: Periodontite Crônica; Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana; Cirurgia de acesso à raspagem.

Abstract

Abstract

MARTINS, S.H.L. **Clinical and microbiological effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy in the surgical treatment of Chronic Periodontitis: A split-mouth randomized controlled trial.** 2016. XX f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Chronic periodontitis (CP) is an infectious disease resulting in inflammation of the teeth support structures, progressive insertion loss and bone loss. The aim of this study was to evaluate the effects of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as an adjunct to surgical periodontal treatment (SPT) in patients diagnosed with generalized severe chronic periodontitis (SCP). In one kind mouth Split model, 20 patients with clinical diagnosis of SCP initially received nonsurgical periodontal basic preparation with regular sessions of scaling the root planing (SRP). After that, the sites with indication for surgical treatment were treated with aPDT associated with scaling and root planing (SRP) flap or just SRP flap. For aPDT protocol was used a source of laser light of 660nm wavelength associated with phenothiazine photosensitizer. All patients were followed up for 90 days after surgical therapy. In the baseline period, post basic treatment and 90 days after surgical therapy was performed the clinical evaluation of plaque index, probing depth (PD), level of clinical insertion relative and bleeding on probing, in addition to collecting biofilm samples for the identification and quantification of bacterial species using the technique of *checkerboard DNA-DNA hybridization*. All treatments resulted in clinical improvement. There was significant reduction in PD in the test group. Use of aPDT demonstrated to increase reducing periodontal pathogens, especially bacteria in red complex: *Treponema denticola*. Both treatments were effective in controlling the SCP, however aPDT seems to have greater stability in the control of clinical and microbiological parameters.

Key Words: Chronic periodontitis; Antimicrobial photodynamic therapy; access flap surgery.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrão consolidado para fluxograma de relato de ensaios clínicos	49
Figura 2	Delineamento Experimental	50
Figura 3	Exame Periodontal com sonda periodontal computadorizada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA). (A) Mesial (B) Distal	52
Figura 4	Coleta de placa subgengival com curetas Gracey: (A) 11-12 (B) 13-14	53
Figura 5	Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Controle: A) Primeiro molar superior; B) Sondagem pré-operatória evidenciando PS $\geq$ 5 mm; C) Incisão intra-sulcular com lâmina de bisturi 15C; D) Retalho total E) Raspagem e Alisamento Radicular com remoção de todo tecido de granulação; F) suturas simples com fio Nylon 5,0	58
Figura 6	Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Teste: A) Primeiro molar superior; B) Sondagem pré-operatória evidenciando PS $\geq$ 5,5mm; C) Incisão intra-sulcular com lâmina de bisturi 15C; D) Retalho total E) Aplicação do fotossensibilizador cloridrato de fenotiazina (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems) na concentração de 10mg/mL - Grupo Teste; F) Ativação do laser diodo em 6 pontos por elemento dentário (670 nm, 75 mW, 0,25 W/cm ² , 2,49 J/cm ² , 10s por ponto); G)Suturas simples com fio Nylon 5,0	59
Figura 7	Contagens médias das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e em 60 e 150 dias pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos, bem como os resultados das comparações intra-grupos. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas. Diferenças significativas quando comparado ao <i>baseline</i> : (*) Grupo Controle – 60 dias; (Ψ) Grupo Teste – 60 dias; (Υ) Grupo Controle - 150 dias; (Φ) Grupo Teste - 150 dias. Diferenças significativas quando comparado ao T2: (†) Grupo Controle – 150 dias; (►)Grupo Teste – 150 dias	65
Figura 8	Frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos no diferentes períodos experimentais	66

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	54
Tabela 2 -	Características demográficas dos pacientes e grupos experimentais no <i>baseline</i>	62
Tabela 3 -	Médias e desvios-padrão de PS, NCI e RG para os grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais, bem como os resultados das comparações intra e inter-grupos	63
Tabela 4 -	Comparação inter e intragrupos das médias $\pm$ desvios padrões com relação aos índices de placa e sangramento à sondagem no <i>baseline</i> , +60 e +150	64

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
<i>Ec</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>Fn</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Grama
g/mL	Grama/mililitro
IC	Intervalo de confiança
IHO	Instrução de higiene oral
IP	Índice de placa
J/cm ²	Joule/centímetro ao quadrado
mg/mL	Miligrama/mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mW	Miliwatt
NAM	Ácido N-acetil murâmico
NCI	Nível clínico de inserção
ng/dL	Nanograma/decilitro

Nm	Nanômetros
PC	Periodontite Crônica
PCA	Periodontite Crônica Avançada
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PA	Periodontite Agressiva
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pg/mL	Picograma/mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
PHO	Programa de higiene oral
PS	Profundidade de Sondagem
RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
RG	Recessão gengival
RNA	Ácido ribonucleico
SS	Sangramento à sondagem
SSC	Solução salina citratada
<i>Td</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TPnC	Terapia Periodontal não Cirúrgica
TPC	Terapia Periodontal Cirúrgica
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
UNG	Universidade de Guarulhos
USP	Universidade de São Paulo

W/cm ²	Watt/centímetro ao quadrado
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma/mililitro
µL	Microlitro
MTZ	Metronidazol
AMX	Amoxicilina

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Por cento
>	Maior
<	Menor
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
CO ₂	Dióxido de Carbono
<i>g</i>	Unidade de Aceleração
H ₂	Hidrogênio
HCL	Ácido Clorídrico
M	Concentração molar
n	Tamanho da amostra
N ₂	Nitrogênio
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NA ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
<i>p</i>	Probabilidade de significância

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	87
Anexo B - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	89
Anexo C - Comprovante de submissão do artigo científico em inglês para publicação em periódico internacional classificado como Qualis A1 no Sistema CAPES	93
Anexo D - Artigo científico para submissão no periódico <i>Journal of Clinical Periodontology</i>	94

Sumário

1. Justificativa	31
2. Introdução e Revisão de Literatura	36
3. Proposição	45
3.1 Objetivos Primários	46
3.2 Objetivos Secundários	46
4. Material e Métodos	47
4.1 Consentimento para a pesquisa	48
4.2 Cálculo do tamanho da amostra	48
4.3 Seleção dos pacientes	48
4.4 Delineamento do Estudo	50
4.5 Calibração do Examinador	51
4.6 Monitoramento Microbiológico	52
4.6.1 Cepas Bacterianas e condições de crescimento	53
4.6.2 <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	54
4.7 Variáveis de Resultado	56
4.8 Terapia Periodontal básica	56
4.9 Terapia Periodontal Cirúrgica	57
4.10 Protocolo de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)	58
4.11 Análise Estatística dos dados obtidos	59
4.11.1 Parâmetros Clínicos	60
4.11.2 Parâmetros Microbiológicos	60
5. Resultados	61
5.1 Monitoramento Clínico	62
5.2 Monitoramento Microbriológico	64
6. Discussão	67
7. Conclusão	74
Referências	76

Anexos	86
---------------------	-----------

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	87
---	-----------

Anexo B - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	89
--	-----------

Anexo C - Comprovante de submissão do artigo científico em inglês para publicação em periódico internacional classificado como Qualis A1 no Sistema CAPES.....	93
---	-----------

Anexo D - Artigo científico para submissão no periódico <i>Journal of Clinical Periodontology</i>.....	94
---	-----------

Justificativa

A Doença Periodontal é uma doença inflamatória, de caráter infeccioso, que afeta os tecidos de suporte dos dentes, podendo levar à perda dentária. A forma mais comum, chamada de periodontite crônica (PC), atinge de 35% a 60% da população adulta, enquanto que suas formas severas afetam 10% a 15% da população (Oliver *et al.*, 1998).

Apesar da grande evolução técnica e científica da Odontologia, as formas de tratamento da doença periodontal existentes atualmente nem sempre são capazes de impedir a evolução da doença. As técnicas de instrumentação disponíveis para raspagem e alisamento radicular (RAR) não são completamente efetivas na eliminação dos depósitos mineralizados e microbianos no ambiente subgingival (Adriaens e Adriaens, 2004). Vários fatores podem influenciar na efetividade da RAR, tais como: profundidade inicial da bolsa periodontal, anatomia radicular, desenho dos instrumentos periodontais e habilidade do operador (Waerhaug, 1978). Tal fato foi confirmado por Waerhaug em 1978 que afirmou que bolsas acima de 3 mm são de difícil acesso para correta raspagem e alisamento radicular. Além disso, após uma raspagem incompleta, a gengiva pode parecer estar em boas condições, mas os microrganismos irão se proliferar e ocasionar uma perda adicional de inserção.

Neste contexto, buscam-se novas alternativas capazes de eliminar de forma eficiente as bactérias periodontais que colonizam as superfícies duras dentárias. A Terapia Fotodinâmica pode tornar-se um novo método de tratamento antimicrobiano, sendo utilizada como adjuvante ou como uma terapia convencional para o tratamento da doença periodontal (De Oliveira *et al.*, 2009). A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) tem sido avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo* (Sarkar e Wilson, 1993; Bhatti *et al.*, 1997; Komerik *et al.*, 2003; De Oliveira, Schwartz-Filho, *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2013) e tem como princípio a erradicação de células bacterianas por meio da utilização de um fotossensibilizador (agente de absorção ótica - corante) e uma fonte de luz (laser de baixa intensidade com comprimento de onda apropriado), podendo, assim, promover a eliminação de microrganismos presentes na doença periodontal (Qin, Y. *et al.*, 2008; Novaes *et al.*, 2012).

Na TFDa, o fenômeno básico requer que o fotossensibilizador (corantes como o azul de metileno ou o azul de toluidina) mantenha contato íntimo com a área afetada no tecido periodontal. Então, após a sua ativação pela luz, ele torna-se excitado,

partindo do estado de singleto para o estado de duplete ou tripleto (Azarpazhooh *et al.*, 2010). Esta mudança de estado leva a uma transferência de elétrons que resulta na formação de espécies de oxigênio singleto, as quais são citotóxicas e promovem a morte bacteriana (Komerik *et al.*, 2003). A TFDa pode também reduzir alguns fatores de virulência, como lipopolissacarídeos e proteases (Komerik *et al.*, 2000). Fatores como tipo e concentração do fotossensibilizador, parâmetros de irradiação (comprimento de onda e potência da luz), protocolo de fototerapia (tempo de exposição e quantidade de energia empregada) e tipo de microrganismo podem influenciar no sucesso da técnica (Prates *et al.*, 2011).

Andersen *et al.* (2007), em um estudo clínico controlado aleatorizado investigando a associação da RAR com a TFDa, encontraram melhora significativa nos parâmetros clínicos avaliados (profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NIC), após 12 semanas de tratamento quando comparada com a RAR sozinha. Mizutani *et al.* (2016) afirmaram que um ambiente mais favorável para a inserção dos tecidos periodontais pode ser conseguido após o tratamento da superfície radicular com laser.

Qin, Y. *et al.* (2008), objetivando conhecer o efeito do azul de toluidina na TFDa, coletaram amostras de placa supragengival de 20 pacientes para análise das bactérias *Leptotrichia buccalis* (Lb), *Vignall's bacillus* (Vn), *Veillonella* (V), *Streptococcus* (S) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Concluíram que a TFDa é eficiente para destruir bactérias supragengivais, porém essa eliminação varia de um paciente para outro.

Diante do exposto, podemos deduzir que a TFDa possa talvez ser uma alternativa aos antibióticos e antissépticos, auxiliando o controle mecânico da placa subgengival no tratamento da doença periodontal, principalmente nos casos de doença periodontal avançada como nos sítios em que há um difícil acesso para a descontaminação das superfícies radiculares com instrumentos manuais (dentes com lesões de bifurcação, presença de concavidades, bolsas periodontais estreitas e profundas).

Referências Bibliográficas

1. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol* 1998;69:269-278.
2. Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000* 2004;36:121-145.
3. Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *J Periodontol* 1978;49:119-134.
4. Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *J Periodontol* 1978;49:119-134.
5. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* 2009;80:98-105.
6. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 1993;28:204-210.
7. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol* 1997;65:1026-1031.
8. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:932-940.
9. Queiroz AC, Suaid FA, de Andrade PF, et al. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci* 2013.
10. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965-973.
11. Qin Y, Luan X, Bi L, et al. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci* 2008;23:49-54.
12. Novaes AB, Jr., Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of

- aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci* 2012;27:389-395.
13. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2010;81:4-14.
 14. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72:676-680.
 15. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, et al. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg* 2011;29:835-844.
 16. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007;18:34-38.
 17. Mizutani K, Aoki A, Coluzzi D, et al. Lasers in minimally invasive periodontal and peri-implant therapy. *Periodontol 2000* 2016;71:185-212.

Introdução e Revisão de Literatura

A Periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por microrganismos específicos ou grupos de microrganismos específicos, resultando em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar, com formação de bolsa, retração ou ambas (Lopez e Baelum, 2015). Em 1999, no *International Workshop for the Classification of the Periodontal Diseases*, organizado pela *American Academy of the Periodontology* (AAP) (Armitage, 1999), as diferentes formas de periodontite foram reclassificadas em três formas principais (crônica, agressiva e necrosante) e em manifestações periodontais de doenças sistêmicas.

A PC, conhecida anteriormente como periodontite do adulto ou periodontite crônica do adulto, é a forma mais prevalente de periodontite. Ela é considerada, geralmente, uma doença de progressão lenta. No entanto, na presença de fatores sistêmicos ou ambientais que possam modificar a resposta do hospedeiro ao acúmulo crônico de placa bacteriana e cálculo, como diabetes, tabagismo ou estresse, a progressão da doença pode se tornar mais severa (Lopez e Baelum, 2015). Além de ser a forma mais comum de periodontites, é a principal causa de perda dentária em indivíduos adultos (Haffajee *et al.*, 1997; Rosling *et al.*, 2001), normalmente progride com períodos de exarcebação e quiescência (Socransky *et al.*, 1998; Jeffcoat e Reddy, 2000), e é mais comumente encontrada em adultos (Flemmig *et al.*, 2012). A progressão e severidade da doença parecem aumentar com o avanço da idade (Neely *et al.*, 2001). A PC pode ocorrer como uma doença localizada quando menos de 30% dos sítios avaliados demonstram perda óssea e de inserção, ou como uma doença generalizada, quando mais de 30% dos sítios estão afetados. A doença também pode ser descrita por sua severidade como leve (1 a 2 mm), moderada (3 a 4 mm) ou avançada (≥ 5 mm), com base na quantidade de perda de inserção (Preshaw, 2009).

Este tipo de periodontite apresenta um perfil microbiológico composto predominantemente por microrganismos anaeróbios Gram-negativos, dentre os quais se destacam a *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Eikenella corrodens* (Ec) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (Faveri *et al.*, 2008). Tais microrganismos, por meio de componentes estruturais (lipopolissacarídeos, produtos metabólicos residuais e enzimas) induzem a um desequilíbrio nas respostas inflamatória e imunogênica do hospedeiro (Flemmig *et al.*, 1998; Fine *et al.*, 2006).

A despeito da grande evolução técnica e científica da Odontologia, as formas de tratamento da doença periodontal existentes atualmente nem sempre são capazes de impedir sua evolução. As técnicas de instrumentação disponíveis para raspagem e alisamento radicular (RAR) não são completamente efetivas na eliminação dos depósitos mineralizados e microbianos no ambiente subgengival. Vários fatores podem influenciar na efetividade da RAR, tais como: profundidade inicial da bolsa periodontal, anatomia radicular, desenho dos instrumentos periodontais e habilidade do operador (Adriaens e Adriaens, 2004). A capacidade de invasão tecidual e celular exibida por alguns periodontopatógenos (Tribble e Lamont, 2010), especialmente presentes em formas avançadas da doença periodontal, também dificulta marcadamente o efetivo controle da microbiota subgengival por meio da RAR. Neste contexto, novas abordagens capazes de complementar os procedimentos de RAR e a eficácia do tratamento das doenças periodontais devem ser investigadas (De Oliveira, Schwartz-Filho, *et al.*, 2007).

O plano de tratamento da PCA está tradicionalmente centrado na RAR associada a um controle efetivo da placa supragengival (Deas e Mealey, 2010). Embora esta forma de tratamento seja utilizada, alguns pacientes podem experimentar uma contínua perda de inserção devido à provável persistência de patógenos periodontais e à ocorrência de recontaminação por patógenos residentes em outros sítios intra e extra-orais (Danser *et al.*, 1996). Os relatos da Academia Americana de Periodontia sugerem que pacientes com PCA são beneficiados pela terapia antimicrobiana adjuvante com antibióticos sistêmicos (Feres *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2002; Slots *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2008). Entre as possíveis combinações de antibióticos, a associação do metronidazol com a amoxicilina pode ser uma terapia mais efetiva devido aos efeitos sinérgicos desta combinação e ao amplo espectro de ação (Xajigeorgiou *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2008; Mestnik *et al.*, 2012). Este fato é de particular importância em pacientes com periodontite agressiva e periodontite crônica avançada, uma vez que é notória a alta prevalência de *Aa* e de patógenos anaeróbios na microbiota subgengival (Ishikawa *et al.*, 2009; Kamma *et al.*, 2009; Faveri *et al.*, 2014). Investigações prévias já demonstraram que a supressão destas bactérias abaixo dos níveis de detecção resulta em melhoras consideráveis dos parâmetros clínicos (Haffajee *et al.*, 1997; Winkel *et al.*, 1998). Contudo, é importante ressaltar que o uso de antibioticoterapia sistêmica apresenta algumas

desvantagens, as quais estão relacionadas, principalmente, com os indesejáveis efeitos colaterais resultantes do uso do agente antimicrobiano e com o risco aumentado do desenvolvimento de resistência bacteriana (Pallasch, 2000).

A técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi preconizada por Socransky *et al.*, em 1994 (Socransky *et al.*, 1994). Este método de diagnóstico oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana, incluindo a detecção de microrganismos de desenvolvimento lento, nutricionalmente exigentes, além de detecção da microbiota não cultivável. É um método preciso e mais rápido que o empregado na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pois utiliza várias sondas de DNA de uma única vez, possibilitando estocar as amostras por longos períodos (Moraes *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2002).

O tratamento convencional da PCA baseia-se na Raspagem e Alisamento Radicular (RAR), sendo a intervenção cirúrgica e a terapia antimicrobiana indicadas apenas em casos específicos. No entanto, o advento de outras opções eficazes para a terapia periodontal é necessário devido à existência de limitações de acesso a áreas de bifurcações, concavidades, sulcos, sítios distais de molares e bolsas profundas encontradas durante a terapia periodontal convencional (Ishikawa *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2008; Takasaki *et al.*, 2009).

Lindhe *et al.* (1982), compararam o tratamento periodontal cirúrgico com o não-cirúrgico, sendo que em um quadrante foi realizada RAR e no quadrante contralateral foi realizado RAR com retalho de Widman modificado. Após 24 meses, as reduções mais pronunciadas de profundidade de sondagem foram observadas em sítios inicialmente profundos que receberam tratamento cirúrgico.

Na tentativa de avaliar uma terapia coadjuvante local às técnicas convencionais de tratamento periodontal, Needleman *et al.* (2000) verificaram os efeitos clínicos da utilização do gel de metronidazol 25% como adjuvante ao tratamento cirúrgico em indivíduos com periodontite crônica moderada-avançada. Todos os indivíduos foram submetidos ao retalho de Widman modificado, no qual os defeitos ósseos e as raízes foram debridados, porém o grupo teste recebeu o gel de metronidazol na superfície radicular e o grupo controle somente recebeu debridamento, sem a colocação de gel. Os dois grupos apresentaram benefícios

clínicos, e nenhum benefício adicional foi encontrado pelo uso do gel de metronidazol.

Preus *et al.* (2013) avaliando a eficácia da antibioticoterapia no tratamento da doença periodontal, avaliou 184 indivíduos selecionados a partir de uma população de 292 pacientes com periodontite moderada a avançada. Foram considerados como critérios de inclusão os pacientes com mais de 35 anos sem história pregressa de tratamento periodontal e presença de pelo menos 5 sítios com profundidade de sondagem mínima de 5 mm. Além disso, pacientes que abrigavam bactérias resistentes ou de baixa sensibilidade ao metronidazol (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Serratia*, *Shigella* ou *Acinetobacter species*) também foram excluídos do estudo. Os pacientes foram divididos em 4 grupos: *full-mouth disinfection* + Metronidazol, *full-mouth disinfection* + Placebo, RAR + metronidazol e RAR + placebo. A partir dos resultados os autores concluíram que o metronizol promove efeitos significativos na redução de espécies bacterianas subgengivais, promovendo benefícios clínicos com relação ao NCI, PS e redução de bolsas profundas. Os autores também concluíram não haver diferença estatística através da técnica de *full-mouth disinfection* e a técnica de RAR convencional.

Buscando avaliar as mudanças ocorridas no perfil microbiológico subgengival um estudo (Soares *et al.*, 2014) comparou em pacientes com periodontite crônica generalizada o tratamento com RAR, RAR + MTZ ou MTZ + AMX. Um segundo objetivo foi examinar um possível efeito adicional de clorexidina. Cento e dezoito pacientes foram aleatoriamente designados para receber RAR apenas ou associada a MTZ [400 mg / três vezes por dia] ou MTZ + AMX (500 mg / três vezes ao dia) durante 14 dias. Metade dos pacientes de cada grupo realizam bochecho com dicluconato de clorexidina 0,12% duas vezes ao dia durante 2 meses. Nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas por paciente para contagem de 40 espécies microbianas utilizando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization* no *baseline*, 3, 6 e 12 meses de pós-terapia. Os resultados mostraram que após 12 meses, os grupos tratados com antibióticos possuíam valores menores de contagem bacteriana de periodontopatógenos chave que o grupo de RAR ($p < 0,05$). Esses benefícios foram observados em bolsas inicialmente profundas e rasas. A redução inicial de patógenos

periodontais obtidas com a RAR era revertida após 12 meses. Já com relação à clorexidina, ela mostrou-se eficaz na redução de periodontopatógenos apenas em bolsas rasas. Com isso os autores concluíram que a antibioticoterapia gera uma maior redução dos níveis de patógenos periodontais.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, porém utilizando pacientes fumantes, o mesmo grupo (Faveri *et al.*, 2014) avaliou os efeitos clínicos e microbiológicos do uso adjuvante do MTZ e AMX no tratamento de pacientes fumantes e não-fumantes com PC. Ambos os grupos apresentaram uma melhora significativa em todos os parâmetros clínicos em 3 meses após a terapia ($P < 0,05$). Não-fumantes apresentaram menor média do número de bolsas com PS ≥ 5 mm após a terapia. Não-fumantes também apresentaram as maiores reduções na média de PS e ganho de inserção clínica entre o início e 3 meses após a terapia em bolsas inicialmente profundas (PS ≥ 7 mm) ($P < 0,01$). As alterações mais positivas no perfil microbiano também foram observadas no grupo não-fumante, que apresentou as menores proporções do complexo laranja após 3 meses, bem como um aumento significativo nas proporções de espécies *Actinomyces* após o tratamento. Com isso os autores concluíram que fumantes com PC se beneficiam menos com tratamento periodontal.

O aumento da resistência bacteriana a antibióticos também justificaria a busca por novas formas de tratamento que acarretasse menos efeitos negativos ao paciente (Ishikawa *et al.*, 2009). Nesse contexto, a TFDa, além de não induzir resistência bacteriana, surge como um método de redução microbiana com mínimos efeitos colaterais e sistêmicos. A utilização da TFDa como método adjuvante ao tratamento periodontal convencional produz efeitos favoráveis, aumentando o conforto do paciente por ser benéfico nos locais de difícil acesso, reduzindo o tempo de tratamento e o risco de bacteremias (De Almeida *et al.*, 2007). A fotossensitização também pode ser importante no tratamento das periodontites, especialmente nas formas avançadas, devido à capacidade de penetração do fotossensitizador nos tecidos epitelial e conjuntivo (Komerik *et al.*, 2003), atingindo os periodontopatógenos, particularmente o *Aa*, que podem infiltrar por meio da barreira epitelial nos tecidos periodontais.

O princípio de ação da TFDa se dá essencialmente pela associação de uma fonte de luz a um agente fotossensitizador, tendo como objetivo provocar a necrose

celular e morte microbiana (Ishikawa *et al.*, 2009). O efeito antimicrobiano é alcançado quando a fonte de luz de baixa intensidade promove o surgimento de substâncias que podem gerar danos e matar as células-alvo ao promover a excitação da substância fotossensibilizadora. Tal substância é administrada ao paciente e, por si só, não causa dano algum aos tecidos saudáveis ou doentes. A partir do momento que ocorre a aplicação da fonte de luz de baixa potência nos tecidos e microrganismos que contêm a substância fotossensibilizadora, esta é ativada e as células-alvo são rapidamente destruídas, precisamente nos locais para onde a irradiação foi direcionada (Takasaki *et al.*, 2009).

A TFDa não causa danos aos tecidos do hospedeiro, pois as células eucariotas se defendem contra o ataque de radicais de oxigênio através de enzimas, como a catalase e superoxidase dismutase (Stein *et al.*, 2009). A concentração de fotossensibilizador e a dosagem de energia da luz laser necessárias para matar o agente infeccioso têm pouco efeito sobre os tecidos adjacentes do hospedeiro. O fotossensibilizador deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficiente, seletivo e minimamente tóxico aos tecidos normais (Wilson, 2004).

Novaes *et al.* (2012) investigaram as alterações ocorridas na composição microbiológica de dez indivíduos com PA após tratamento com TFDa ou com RAR em um estudo com desenho de boca dividida. A contagem de 40 espécies subgengivais foi determinada utilizando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization*. A TFDa foi mais eficiente que a RAR na redução do número de *Aa*. Entretanto, a RAR foi mais eficiente que a TFDa na redução de patógenos periodontais do complexo vermelho. Segundo os autores, TFDa e RAR afetam diferentes grupos de bactérias. Dessa forma a associação de ambas as terapias poderiam ser benéficas para o tratamento da PA.

Existem alguns estudos sobre a aplicação da TFDa em pacientes com PC. Contudo, observa-se a inexistência de um padrão nas metodologias que incluem parâmetros que podem influenciar diretamente nos resultados: comprimento de onda do laser utilizado, tempo de aplicação da luz, tempo de permanência do corante no interior da bolsa e a forma como a luz é aplicada (em pontos ou em movimentos circulares).

Com o objetivo de avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos da RAR associada à TFDa no tratamento não cirúrgico da doença periodontal foi realizado um estudo (Christodoulides *et al.*, 2008) com vinte e quatro pacientes com periodontite crônica. Todos os pacientes foram tratados com RAR. No grupo teste, esses pacientes receberam uma única aplicação da TFDa (Helbo Photodynamic Systems - laser de diodo, com comprimento de onda 670 nm e 75 mW de potência associado ao cloridrato de fenotiazina, durante 1 minuto). Os parâmetros clínicos avaliados no início do tratamento, três e seis meses após a terapia foram: índice de placa, índice de sangramento, profundidade sondagem, recessão gengival e ganho clínico de inserção. Foi realizado também, o teste microbiológico desses indivíduos. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos períodos de três e seis meses após o tratamento. No entanto, uma melhoria significativa foi encontrada para os valores de índice de sangramento no grupo teste. Aparentemente, neste estudo, a aplicação adicional de um único episódio da TFDa associada à RAR não resultou em melhorias na profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, mas apenas em redução do índice de sangramento quando comparado à RAR sozinha. Um resultado similar foi reportado (Chondros *et al.*, 2009) ao associar a TFDa + RAR no tratamento de pacientes de manutenção periodontal.

Andersen *et al.* (2007), em um estudo clínico, compararam a eficácia da associação da TFDa com a RAR para o tratamento não cirúrgico da doença periodontal moderada a avançada utilizando três grupos paralelos. Um total de 33 pacientes foram submetidos a monoterapia com TFDa (azul de metileno + 50 mW/670 nm laser de diodo- Periowave[®]), RAR isolada ou RAR + TFDa. Foram feitas avaliações clínicas de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível clínico de inserção. Após três meses de cicatrização observou-se que a combinação de RAR + TFDa resultou em significativa melhora nos parâmetros investigados quando comparado ao uso da RAR isolada em todos os tempos de avaliação.

O efeito adjuvante da TFDa (azul de metileno + 100 mW laser de diodo) na periodontite crônica foi estudado (Braun *et al.*, 2008) usando um desenho de boca dividida. Um total de vinte pacientes foram tratados com RAR e os quadrantes foram aleatoriamente divididos para que recebessem tratamento adicional com TFDa. Após a irrigação o fotossensibilizador foi ativado por 10 s por sítio (seis sítios no total). Após

três meses, a utilização da TFDa adjuvante resultou numa mudança significativamente maior do nível de inserção relativa, profundidade de sondagem, taxa fluxo de fluido do sulco e sangramento à sondagem nos locais que receberam terapia fotodinâmica quando comparados aos locais que receberam RAR isoladamente. A partir destes resultados clínicos pode-se sugerir que os parâmetros clínicos podem ser melhorados quando a TFDa é utilizada associada a RAR em pacientes com periodontite crônica.

Chondros *et al.* (2009) em um ensaio clínico randomizado avaliaram os efeitos da aplicação única da TFDa (Helbo Blue® kit) associada ou não a RAR em parâmetros clínicos bem como na contagem de 11 patógenos periodontais. Um total de 24 pacientes em manutenção com periodontite crônica tiveram suas bolsas irrigadas com azul de metileno (10 mg / ml) durante 3 minutos, em seguida o local foi irradiado por um laser diodo (75 mW / cm²) com 670 nm (movimentos circunferenciais em torno cada dente durante 1 min). No grupo teste, notou-se significativa redução no sangramento à sondagem e um significativo aumento numérico das espécies *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga* após seis meses.

Desse modo, considerando que bolsas profundas dificilmente são descontaminadas adequadamente com terapia não cirúrgica (Waerhaug, 1978), necessitando de procedimentos cirúrgicos para acesso às raízes e ao osso, que terapias adjuvantes à cirurgia de acesso já foram testadas com bons resultados, que dentre essas terapias a TFDa é uma das que apresentam resultados promissores e vantagens sobre antimicrobianos convencionais, e levando-se em conta que, até o momento, não há na literatura estudo controlado em humanos avaliando a associação de TFDa a cirurgias de acesso para descontaminação de bolsas periodontais, torna-se de grande relevância avaliar este tipo de associação terapêutica.

Proposição

3.1 Objetivos Primários:

Avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) associada à cirurgia de acesso para raspagem e alisamento radicular na descontaminação de bolsas periodontais em pacientes com Periodontite Crônica Avançada.

3.2 Objetivos Secundários:

- ✓ Avaliar parâmetros clínicos (Índice de placa, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, recessão gengival e nível de inserção clínica) antes e após a realização do procedimento cirúrgico + aplicação ou não da TFDa;
- ✓ Avaliar a microbiota periodontopatogênica subgengival antes e após a realização do procedimento cirúrgico + aplicação ou não da TFDa.

Material e Métodos

4.1 Consentimento para a pesquisa

Todos os pacientes receberam informações detalhadas a respeito do experimento do qual participaram (objetivos, benefícios, riscos e desconfortos) conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP), sob número CAAE nº: 26497414.8.0000.5419 (Anexo 2). O estudo foi registrado no ClinicalTrials.gov (NCT02734784).

4.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo de tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos teste e controle do estudo de Andrade *et al.* (2013) e Novaes *et al.* (2012) sendo o valor de α ajustado em 0,05. Para o cálculo do tamanho amostral, também foi levada em consideração a média de desistência de pacientes em estudos prévios (aproximadamente 20%). Dessa forma, chegou-se a um tamanho amostral adequado de 20 pacientes.

4.3 Seleção dos pacientes

Este foi um estudo do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego. Foram incluídos 20 pacientes da população atendida na Clínica de Periodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FORP-USP (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) pela rede de atenção básica (Figura 1). Todos os pacientes precisavam apresentar bom estado de saúde geral e no mínimo 15 dentes presentes, excluindo-se terceiros molares e dentes indicados para exodontia. Os pacientes receberam o diagnóstico de Periodontite Crônica Avançada Generalizada de acordo com a atual classificação da Academia Americana de Periodontologia (Armitage, 1999). Baseado nesta classificação, os pacientes precisavam apresentar (1) boa saúde geral, (2) perda de inserção interproximal generalizada envolvendo no mínimo 2 sextantes posteriores com 3 ou mais bolsas acima de 5mm, (3) indicação de terapia de acesso cirúrgico em ao menos 2 sextantes posteriores contralaterais. Além disso, foram considerados os

seguintes critérios de inclusão para o presente estudo: (i) idade ≥ 35 anos, (ii) presença de dentes com sítios periodontais proximais apresentando profundidade de sondagem e nível de inserção clínico ≥ 5 mm e (iii) sangramento à sondagem.

Figura 1 - Padrão consolidado para fluxograma de relato de ensaios clínicos.

Foram critérios de exclusão para o presente estudo: (1) história positiva de antibioticoterapia nos últimos seis meses, (2) história positiva de tratamento periodontal básico nos últimos seis meses, (3) envolvimento sistêmicos que pudessem interferir na progressão da doença ou na resposta ao tratamento (ex.: diabetes, desordens imunológicas), (4) necessidade de profilaxia antibiótica para a

realização de procedimentos odontológicos de rotina, (5) uso de anti-inflamatórios por longo período de tempo, (6) tabagismo e (7) gravidez.

4.4 Delineamento do Estudo

Os indivíduos selecionados receberam preparo inicial básico com instruções específicas de higiene oral, regularização de restaurações em excesso, exodontias devidamente indicadas e realização de RAR por quadrantes, em 4 semanas, sendo todos os pacientes tratados por um mesmo especialista em Periodontia. O estudo foi do tipo boca dividida, sendo selecionados para as avaliações clínicas e microbiológicas dois dentes contralaterais multi-radulares com sítios periodontais com profundidade de sondagem ≥ 5 mm. De acordo com uma tabela numérica aleatória gerada pelo site o site Randomization.com (<http://www.randomization.com>), cada um dos dentes selecionados recebeu um dos seguintes tratamentos: retalho de acesso com RAR ou retalho de acesso com RAR + TFDa. Os parâmetros clínicos periodontais e microbiológicos foram avaliados no *baseline* (período pré-intervenção), pós-terapia básica (reavaliação) e 3 meses após o procedimento cirúrgico. Os pacientes foram submetidos a controles pós-operatórios semanais no 1º mês e mensais até completar 3 meses pós-intervenção.

Figura 2 - Delineamento Experimental.

Um pesquisador (G.H.A.V.) não envolvido na coleta de dados e tratamentos realizou o recrutamento dos pacientes e a alocação dos elementos dentários para os grupos Controle e Teste. Esta alocação foi ocultada em envelopes selados, não transparentes, contendo apenas o número de identificação do paciente com a respectiva data de nascimento e iniciais do seu nome completo. Os envelopes permaneceram lacrados até o momento da intervenção. Os exames clínicos periodontais (pré e pós- intervenção) foram realizados por um único examinador (J.P.C) devidamente treinado e calibrado, o qual desconhecia os grupos experimentais do presente estudo. O cegamento dos examinadores também foi respeitado para a avaliação microbiológicas (I.B). Os procedimentos de RAR a retalho e utilização do protocolo da TDFa foram realizados por um operador (S.H.L.M) treinado para estas finalidades e, também, cego em relação aos grupos experimentais do estudo. Após a realização da RAR a retalho em todos os elementos dentários do paciente, outro operador, acessava os envelopes dos pacientes para identificar qual elemento dentário deveria receber a TFDa. Após o respectivo tratamento, os envelopes eram novamente lacrados.

4.5 Calibração do Examinador

O índice Kappa foi utilizado para avaliar a calibração do examinador para coleta dos parâmetros clínicos periodontais a fim de mensurar a concordância diagnóstica intra-examinador. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para critérios de diagnóstico, o índice aceitável de concordância de Kappa deve ser maior ou igual a 0,85 (OMS, 1997). Este nível de concordância foi utilizado para a calibração do examinador no presente projeto. Para isso, foram selecionados 10 pacientes, com pelo menos 1 par de dentes com profundidade de sondagem ≥ 5 mm. Cada paciente foi examinado duas vezes por meio de sonda periodontal computadorizada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA) (Figura 1), com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e segundo exame, a fim de se obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador, a qual foi aferida determinando-se o índice Kappa.

Figura 3 - Exame Periodontal com sonda periodontal computadorizada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA). (A) Mesial (B) Distal.

4.6 Monitoramento Microbiológico

No *baseline*, bem como em +30 após realização de TPNC e +90 dias após a realização de TPC, amostras de placa subgengival foram coletadas nas bolsas periodontais proximais (mesial e distal) dos dentes selecionados. Para a coleta da placa subgengival, os sítios foram isolados com roletes de algodão estéreis e secos com jatos de ar. A placa supragengival foi, então, cuidadosamente removida com a utilização de uma cureta estéril. Posteriormente, outra cureta estéril foi utilizada para a coleta de placa subgengival, partindo da porção mais profunda da bolsa para a região coronal (Figura 4). As amostras de placa bacteriana subgengival coletadas foram imediatamente depositadas em frascos esterilizados do tipo eppendorf contendo 150µL de solução tampão (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6 – solução TE). Foram adicionados a esta solução 100µL de NaOH a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Os eppendorfs, previamente identificados com o código do paciente, data e sítio coletado, foram armazenados sob refrigeração a -20oC. Contagens de 40 espécies bacterianas subgengivais foram determinadas em cada amostra usando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization* no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da Universidade de Guarulhos (Universidade de Guarulhos – UNG, Guarulhos, SP, Brasil) conforme descrição de Sampaio *et al.* (2011).

Figura 4 - Coleta de placa subgengival com curetas Gracey: (A) 11-12; (B) 13-14.

4.6.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar- triptose de soja com 5% de sangue desfibrilado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrilado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de Mycoplasma suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5mL contendo 1mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3500g por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas

com dodecilsulfato de sódio (SDS - C₁₂H₂₅NaO₄S, Synth®, Labsynth, Diadema, SP, Brasil) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15mg/mL de lisozima (Sigma) e 5mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (Smith *et al.*, 1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *kit random primer digoxigenin labeling* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). As espécies avaliadas (Tabela 1) foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal.

Tabela 1 - Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica *DNA-DNA Checkerboard Hybridization*.

Complexo Azul	Complexo Roxo	Complexo Amarelo	Complexo Verde
<i>A. gerencseriae</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>C. gingivalis</i>	<i>S. gordonii</i>
<i>A. israelii</i>	<i>V. parvula</i>	<i>C. ochracea</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>A. naeslundii I</i>		<i>C. sputigena</i>	<i>S. mitis</i>
<i>A. viscosus</i>		<i>E. corrodens</i>	<i>S. oralis</i>
			<i>S. sanguinis</i>
			<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Complexo Laranja	Complexo Vermelho	Especies “não-orais”	
<i>C. gracilis</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>E. saburreum</i>	
<i>C. rectus</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>G. morbillorum</i>	
<i>C. showae</i>	<i>T. denticola</i>	<i>L. buccalis</i>	
<i>E. nodatum</i>		<i>P. acnes</i>	
<i>F. nuc ss Nucleatum</i>		<i>P. melaninogenica</i>	
<i>F. nuc ss polymorphum</i>		<i>N. mucosa</i>	
<i>F. nuc ss Vincentii</i>		<i>S. anginosus</i>	
<i>F. periodonticum</i>		<i>S. noxia</i>	
<i>P. micra</i>		<i>T. socranskii</i>	
<i>P. intermedia</i>			
<i>P. nigrescens</i>			
<i>S. constellatus</i>			

4.6.2 Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As suspensões de biofilme subgingival foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônio a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK

Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do Minislot foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1g e 10g de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do Minislot 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C , por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 vezes de solução salina citratada (SSC) (1 vez de SSC= 150mM NaCl - Vetec), 15M de citrato de sódio – pH 7,0 (J.T.Baker, Estado de México, México), 25mM de fosfato de sódio – pH 6,5 (Na_2HPO_4 , Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no Miniblotter 45 (Immuntics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do Miniblotter 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 g/mL, em 130 μL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 vezes de SSC, 20mM de Na_2HPO_4 (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C .

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do Miniblotter 45 (Immuntics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na_2HPO_4 , a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína - pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada duas vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20 - pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-Star™ *Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um

cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado e calibrado que desconhecia os grupos experimentais e terapias utilizadas no presente estudo. A leitura foi realizada duas vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas duas linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias (duas últimas das 30 canaletas do Minislot). Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 a aproximadamente 10^6 células; e 5 equivaleu a mais de 10^6 células. Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas. Um total de 240 amostras foi analisado.

4.7 Variáveis de resultado

Foram definidas como variáveis primárias deste estudo as diferenças obtidas no NCI em bolsas periodontais profundas (PS inicial ≥ 5 mm) aos 90 dias após a TPNC da PCA. Os demais parâmetros clínicos (IP, SS, RG e PS) e microbiológicos e analisados, bem como número de bolsas periodontais residuais, número de pacientes com necessidade de terapia periodontal adicional e número de pacientes classificados de acordo com o risco de progressão da DP (baixo, moderado ou alto) foram definidos como variáveis secundárias. Os parâmetros clínicos (PS, NCI e RG) e microbiológicos foram analisados em subgrupos levando-se em consideração a PS inicial.

4.8 Terapia Periodontal Básica

Todos os pacientes, antes da realização da terapia periodontal cirúrgica, foram submetidos a um exame radiográfico periapical da boca toda, realizado por meio da técnica do paralelismo, dispondo de posicionador radiográfico. Os mesmos foram também agrupados em um programa de higiene oral (PHO) de acordo com suas necessidades específicas. Neste programa, os pacientes receberam instruções para um

efetivo autocontrole de placa bacteriana, incluindo informações sobre a Técnica de Bass (Bass, 1954) e limpeza interproximal com fio dental e escovas interdentais. Eles foram também orientados a utilizarem escovas de cerdas macias e motivados a escovar o dorso da língua uma vez ao dia e receberam um mesmo dentífrício que foi utilizado durante todo o período experimental (Colgate Total®, Anakol Ind. Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Após a realização deste programa de higiene oral, os pacientes foram submetidos à avaliação dos parâmetros clínicos periodontais já descritos anteriormente, sendo realizadas também as coletas de amostras de placa bacteriana subgingival nos sítios selecionados (*baseline* – período pré-intervenção). Logo em seguida, foram submetidos à RAR por quadrantes, em 4 semanas, com instrumentos manuais (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos. Para finalizar, foi realizado polimento coronário com taças de borracha em todos os elementos dentários presentes na cavidade bucal.

4.9 Terapia Periodontal Cirúrgica

As cirurgias a retalho foram realizadas 8 semanas após o início do preparo básico. Os pacientes foram monitorados clinicamente, e os sítios que apresentavam $PS \geq 5\text{mm}$ e presença de SS foram submetidos a terapia cirúrgica de raspagem a retalho. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um especialista em Periodontia. Inicialmente os pacientes foram submetidos à anti-sepsia extra-oral com solução de clorexidina 2% e intra-oral por meio de bochecho com solução de clorexidina 0,12%. A região a ser operada recebeu anestésias locais infiltrativas com solução de lidocaína a 2% e 1:100.000 de adrenalina. A seguir, foi realizada incisão intra-sulcular com lâmina de bisturi nº 15C englobando o sítio com $PS \geq 5\text{mm}$ e os dentes adjacentes. Um retalho mucoperiosteal foi realizado até a exposição da crista óssea e depósitos de cálculo subgingival e/ou tecido de granulação foram removidos por meio de RAR com curetas Gracey convencionais e Mini-Five, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e aparelhos ultrassônicos. Logo após a conclusão da RAR foi iniciada a TFDa na região operada, no grupo sorteado para esta terapia adjuvante. Finalizada a terapia, o retalho foi posicionado no mesmo local de origem e estabilizado com suturas simples por meio de fio nylon 5-0. Com o objetivo de evitar sintomatologia dolorosa, foi prescrito analgésico (Paracetamol 750mg, 01

comprimidos a cada 6 horas, por 48 horas). As suturas foram removidas após 7 dias e foi estabelecido um regime de controle de placa supra-gengival semanal no primeiro mês e mensal até completar 3 meses pós-intervenção cirúrgica.

Figura 5 - Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Controle: A) Primeiro molar superior; B) Sondagem pré-operatória evidenciando PS $\geq$ 5 mm; C) Incisão intra-sulcular com lâmina de bisturi 15C; D) Retalho total E) Raspagem e Alisamento Radicular com remoção de todo tecido de granulação; F) suturas simples com fio Nylon 5,0.

4.10 Protocolo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

Após acesso cirúrgico e realização da RAR a retalho, as lojas cirúrgicas selecionadas para receber a TFDa foram irrigadas com soro fisiológico, foram secas com gaze estéril, sendo aguardado um período de 10 minutos, até que não houvesse mais sangramento. Logo em seguida, foi aplicado o fotossintetizador cloridrato de fenotiazina, cujo principal componente é o azul de toluidina, na concentração de 10mg/mL (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria), o qual permaneceu em contato por 5 minutos. Posteriormente, foi feita irrigação com soro fisiológico para a remoção dos excessos do fotossensitizador e as áreas coradas foram irradiadas com um laser diodo de comprimento de onda de 660nm, poder máximo de 60 mW/cm² e densidade de energia de 0,6J/cm² (Helbo therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Áustria), durante 60 segundos por sítio. O tratamento foi realizado nos 6 sítios do dente, totalizando 6 minutos de aplicação de luz laser por dente. Dentes com lesão de bifurcação tiveram acréscimo de mais 60 segundos no interior da lesão. Este protocolo foi preconizado por Qin, Y. *et al.* (2008), os quais consideraram este tempo ideal para a absorção da

fenotiazina pelas bactérias e completa atuação da fotoestimulação. No grupo controle foi realizado procedimento “sham” simulando o tratamento com a TFDa, porém, sem a ativação pelo laser visando cegar o paciente quanto ao tratamento.

Figura 6 - Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Teste: A) Primeiro molar superior; B) Sondagem pré-operatória evidenciando $PS \geq 5,5\text{mm}$; C) Incisão intra-sulcular com lâmina de bisturi 15C; D) Retalho total E) Aplicação do fotossensibilizador cloridrato de fenotiazina (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems) na concentração de 10mg/mL - Grupo Teste; F) Ativação do laser diodo em 6 pontos por elemento dentário (670 nm , 75 mW , $0,25\text{ W/cm}^2$, $2,49\text{ J/cm}^2$, 10 s por ponto); G) Suturas simples com fio Nylon 5,0.

4.11 Análise Estatística dos dados obtidos

As análises foram realizadas com o *software* Bioestat (BioEstat, Versão 5.3. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil). O paciente foi considerado como a unidade estatística ($n = 20$). Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A distribuição dos dados clínicos e microbiológicos foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças intra e inter-grupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

4.11.1 Parâmetros clínicos

Em cada paciente, foi calculada a média e o desvio-padrão de PS, NCI e RG para cada par de dentes analisados nos diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, +60 e +150). Para SS e IP, foram calculadas as frequências absoluta e relativa desses parâmetros em cada paciente. As diferenças dentro de cada grupo para PS, NCI e RG nos três tempos experimentais, bem como as diferenças inter- grupos foram avaliadas pela Análise de Variância de medidas repetidas e Teste t pareado, respectivamente. As diferenças intra e inter-grupos para SS e IP foram avaliadas pelos testes de Friedman e Qui-Quadrado, respectivamente.

4.11.2 Parâmetros microbiológicos

Os níveis de cada espécie bacteriana testada foram calculados pela transformação dos escores obtidos na leitura dos filmes radiográficos após a realização do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em valores absolutos: escore 1 = 10.000 células; escore 2 = 100.000 células; escore 3 = 500.000 células; escore 4 = 1.000.000 células; e escore 5 = 10.000.000 células. Em cada paciente, foi calculada a média das contagens bacterianas ($\times 10^5$) para cada par de dentes analisados (4 amostras de placa bacteriana subgengival). Foi calculada, então, a contagem média de cada espécie nos diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, +60 e +150). Os dados foram também agrupados em complexos, os quais foram descritos por Socransky *et al.* (Socransky *et al.*, 1998). As diferenças intragrupos nas contagens médias de cada espécie bacteriana foram avaliadas pelo Teste de Wilcoxon. As análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, conforme descrito por Socransky *et al.* (1991). Resumidamente, foi computado um valor geral de p conforme as seguintes fórmulas: i) $1-(1-k)^{42}$ para espécies orais; ii) $1-(1-k)^{25}$ para espécies não periodontais, sendo k o valor de p estabelecido para o presente estudo (0,05). Dessa forma, valores de $p < 0,0012$ e valores de $p < 0,002$ foram considerados estatisticamente significantes para as espécies orais e não orais, respectivamente.

Resultados

O fluxograma deste estudo está apresentado na Figura 1. Todos os pacientes incluídos na amostra completaram o estudo. Nenhum incômodo ou efeito adverso foi relatado em relação a ambos tratamentos durante todo o período experimental, denotando segurança dos tratamentos. As características demográficas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 2. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais na frequência de bolsas periodontais no *baseline*, bem como nos tipos de elementos dentários selecionados para as análises. Todos os registros de dados clínicos e procedimentos experimentais foram realizados entre abril de 2014 e outubro de 2015. A cicatrização pós-operatória ocorreu sem complicações em todos os casos após a realização da terapia periodontal cirúrgica. Nenhum indivíduo relatou desconforto com a aparência ou estética dos dentes em relação ao manchamento dental pelo corante utilizado.

Tabela 2 - Características demográficas dos pacientes e grupos experimentais no *baseline*.

Variável	Todos	Grupos		Valor de <i>p</i>
	Média ± DP	Controle	Teste	
Número de pacientes	20			
Idade	44.95 ± 4.17			
Gênero (F/M)	10 / 10			
Número de dentes no <i>baseline</i>	25.15 ± 1.42			
Primeiros Molares		15	15	NS
Segundos Molares		5	5	NS
Número de bolsas periodontais presentes no <i>baseline</i>				
PS = 5 mm		17	18	NS
PS = 6 mm		18	19	NS
PS ≥ 7 mm		5	3	NS

F = Feminino; M = Masculino; PS = Profundidade de sondagem; DP = Desvio-padrão. NS = Diferenças não significativas (Teste do Qui-Quadrado, $p > 0,05$)

5.1 Monitoramento Clínico

A análise estatística mostrou que não houve diferenças entre os grupos quanto aos parâmetros clínicos iniciais (NIC e RG). Após 3 meses da TPC, reduções significantes na PS de $5,70 \pm 0,53$ para $3,40 \pm 0,50$ mm ($p < 0,001$) e de $5,63 \pm 0,45$ para

2,70±0,30 mm ($p < 0,001$) foram observadas para GC e GT, respectivamente. O NCI diminuiu de 6,18±0,74 para 4,18±0,66 mm ($P < 0,001$) no GC e de 6,05±0,82 para 3,70±0,85 ($p < 0,001$) no GT. Em ambos os grupos houve aumento significativo na RG, de 0,48±0,53 para 0,78±0,49 ($p < 0,001$) no GC e de 0,43±0,73 para 1,00±0,60 ($p < 0,001$) no GT. Para a comparação intergrupos foram calculadas as diferenças entre as medidas iniciais e finais para cada grupo. Foram encontradas diferenças estatísticas intergrupos apenas na PS, todos os demais parâmetros clínicos avaliados não observadas diferenças estatisticamente significantes. Os resultados clínicos alcançados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação intergrupos das médias ± desvios padrões dos parâmetros clínicos no *baseline*, +60 e +150.

VARIÁVEL	TEMPO	GRUPOS EXPERIMENTAIS		Comparação inter-grupos em um mesmo tempo (Teste t pareado)		
		Controle (N=20)	Teste (N=20)	Diferenças entre as médias	IC 95%	Valor de <i>p</i>
PS (mm)	Tempo 1	5.70±0.53	5.63±0.45	0,075	-0.2942 a 0.4442	0,3416
	Tempo 2	5.70±0.50*	5.60±0.50*	0,075	-0.2942 a 0.4442	0,3416
	Tempo 3	3.40±0.50*	2.70±0.30*	0,7	0.3884 a 1.0116	< 0.0001
NCI (mm)	Tempo 1	6.18±0.74	6.05±0.82	0,125	-0.4946 a 0.7446	0,3426
	Tempo 2	6.30±0.69*	6.30±0.73*	0	-0.5486 a 0.5486	0,5
	Tempo 3	4.18±0.66*	3.70±0.85*	0,475	-0.1201 a 1.0701	0,0572
RG (mm)	Tempo 1	0.48±0.53	0.43±0.73	0,05	-0.4732 a 0.5732	0,4238
	Tempo 2	0.60±0.51*	0.68±0.61*	-0,075	-0.4961 a 0.3461	0,3602
	Tempo 3	0.78±0.49*	1.00±0.60*	-0,225	-0.6624 a 0.2124	0,1521

PS = Profundidade de sondagem; NCI = Nível clínico de inserção; Recessão gengival; DP = Desvio-Padrão; IC = Intervalo de confiança

Períodos de avaliação: *baseline* (tempo 1); 60 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 2); 90 dias após a realização das cirurgias (tempo 3). Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa inter-grupo ($p < 0,05$).

Com relação aos índices de placa e sangramento a sondagem, apesar que ao longo do tratamento terem sido observado reduções nos valores, elas não foram estatisticamente significantes.

Tabela 4 - Comparação inter e intragrupos das médias $\pm$ desvios padrões com relação aos índices de placa e sangramento a sondagem no *baseline*, +60 e +150.

		Controle		Teste		Teste do Qui-Quadrado	
		Número	(%)	Número	(%)	Risco Relativo	Valor de <i>p</i>
Sítios com placa	<i>baseline</i>	35	87,5	31	77,5	1.00	NS
	60 dias	30	75	25	62,5	1.17	NS
	150 dias	19	47,5	13	32,5	0.87	NS
Sítios com Sangramento	<i>baseline</i>	33	82,5	33	82,5	1.13	NS
	60 dias	28	70	24	60	1.20	NS
	150 dias	13	32,5	25	50	1.46	NS

Diferenças significativas inter-grupos em um mesmo tempo (Teste do Qui-Quadrado): $p > 0,1$: não significativo (NS); $p < 0,05$: significativo.

5.2 Monitoramento Microbiológico

Os participantes do presente estudo, de maneira geral, apresentaram elevadas contagens de patógenos periodontais dos complexos laranja e vermelho no *baseline*. Os resultados da análise microbiológica estão representados na Figura 7, a qual apresenta as médias da contagem total das 40 espécies subgingivais ao longo do período experimental para os Grupos Controle e Teste, bem como os resultados das mudanças estatisticamente significativas ocorridas nas contagens médias de cada grupo aos 60 e 150 dias quando comparadas aos valores obtidos no *baseline* e após terapia básica periodontal.

Não houve diferenças significativas em relação às bactérias do complexo vermelho na análise intra-grupos no grupo controle, entretanto uma redução estatisticamente significativa foi observado no grupo teste quando comparado o *baseline* e 150 dias na redução da bactéria *T. denticola* ($p < 0,05$).

No Grupo Controle, aos 60 dias após terapia básica periodontal, foi observada uma redução significativa de *Aa* e *T. socranskii*. Aos 150 dias, observou-se redução significativa de *Aa* e 1 espécie do complexo amarelo (*S. gordonii*). Um aumento significativo foi observada em uma espécie do complexo azul (*A. israelii*) nos dois

períodos avaliados (T2 e T3).

No grupo Teste, aos 60 dias após terapia básica periodontal, foi observada redução significativa em 1 espécie do complexo amarelo (*S. mitis*), 1 espécie do complexo laranja (*C. gracilis*) e na bactéria *L. buccalis*. No mesmo período foi observado um aumento significativo em 2 espécies do complexo azul (*A. gerencseriae* e *A. oris*). Aos 150 dias, foi observada redução significativa em 1 espécie do complexo vermelho (*T. denticola*) e na bactéria *L. buccalis*. Também foi encontrado, porém aos 150 dias, um aumento significativo nas mesmas 2 espécies do complexo azul (*A. gerencseriae* e *A. oris*).

Figura 7 - Contagens médias das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e em 60 e 150 dias pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos, bem como os resultados das comparações intra-grupos. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas. Diferenças significativas quando comparado ao *baseline*: (*) Grupo Controle – 60 dias; (Ψ) Grupo Teste – 60 dias; (Σ) Grupo Controle - 150 dias; (Φ) Grupo Teste - 150 dias. Diferenças significativas quando comparado ao T2: (†) Grupo Controle – 150 dias; (Ω) Grupo Teste – 150 dias.

Em ambos os grupos foi observado no *baseline* percentuais consideravelmente baixos de *Aa* e uma maior prevalência de bactérias dos complexos laranja e vermelho. Foi constatado também um aumento significativo em relação ao *baseline* no percentual do complexo laranja em ambos os grupos aos 150 dias. Em ambos os grupos apresentaram percentuais de complexo verde significativamente maiores que aqueles do *baseline* aos 150 dias. Aos 150 dias, foi observado diferenças significativas intergrupos com relação aos complexos verde, laranja e outros tipos de

bactérias.

Figura 8 - Frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgingival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos no diferentes períodos experimentais. ¶ diferença significativa quando comparado aos valores do *baseline* no mesmo grupo experimental (Teste t pareado, $p < 0,05$); * diferença significativa entre os grupos em um mesmo período experimental (Teste t pareado, $p < 0,05$).

Discussão

Todo tratamento tem como objetivo alcançar a cura ou controle da doença. Todavia, vários são os obstáculos a serem superados para que este objetivo seja alcançado. O biofilme da cavidade oral é o responsável por duas das doenças mais comuns e prevalentes em todo o mundo: cárie e a doença periodontal (Gruner *et al.*, 2016). Um tratamento periodontal eficaz deve provocar mudanças no microambiente local e suprimir o crescimento de periodontopatógenos. Microrganismos que vivem em uma matriz de glicocalíce são menos acessíveis à antibióticos. O uso de agentes antimicrobianos para o tratamento da doença periodontal é ineficaz quando não há uma prévia desorganização do biofilme comumente resultando em fracassos no tratamento. Tal situação pode gerar o desenvolvimento de bactérias resistentes à antibióticos. Esta resistência é minimizada pela utilização da TFDa (Moreira *et al.*, 2015). Os polissacarídeos presentes na matriz extracelular dos biofilmes orais são extremamente susceptíveis aos efeitos fototóxicos do oxigênio singlete (Decker *et al.*, 2016). O emprego da TFDa é rápido e possui um protocolo simples que permite aos clínicos eliminar bactérias patogênicas, bem como neutralizar fatores de virulência imediatamente após a RAR (Ramos *et al.*, 2016).

Os resultados clínicos do presente trabalho demonstraram uma similaridade entre os grupos na fase de tratamento para todos os parâmetros avaliados. O grupo teste recebeu uma única aplicação TFDa durante o acesso cirúrgico para raspagem e alisamento dos sítios comprometidos. Não existem na literatura estudos prévios que avaliaram a TFDa como adjuvante à terapia periodontal cirúrgica, porém diversos são os estudos que abordam o efeito coadjuvante da TFDa à terapia periodontal não-cirúrgica. Esses estudos demonstraram que uma única aplicação da TFDa após raspagem manual (Christodoulides *et al.*, 2008; Chondros *et al.*, 2009) ou instrumentação ultra-sônica (Polansky *et al.*, 2009), não foi capaz de produzir resultados clínicos melhores do que somente a aplicação da terapia convencional em pacientes saudáveis e sem administração de antibioticoterapia sistêmica. Por outro lado uma publicação apresentou superioridade da aplicação adjunta de TFDa em todos os parâmetros avaliados (Braun *et al.*, 2008).

Os protocolos utilizados nestes estudos consistiram na irrigação com cloreto de fenotiazina 10mg/ml após a raspagem e alisamento radicular, espera do tempo pré-irradiação de 1 a 3 minutos, variando entre os estudos, irrigação com soro fisiológico

e aplicação de TFDa 10 segundos por sítio com o laser vermelho de 660nm. Neste estudo, foi utilizado um tempo de pré-irradiação de 5 minutos, tempo considerado ótimo para a absorção da fenotiazina pelas bactérias (Qin, Y. *et al.*, 2008).

A análise dos parâmetros clínicos deste estudo demonstrou que a associação da TPC à TFDa promoveu maior redução de PS e melhores valores com relação ao inserção clínica quando comparada ao uso isolado da TPC. Dessa forma, o uso da TFDa pode potencializar os efeitos do acesso cirúrgico para RAR auxiliando na redução da microbiota subgengival periodontopatogênica, uma vez que a penetração do fotossensibilizador nos tecidos epitelial e conjuntivo (Komerik *et al.*, 2003) pode atingir os microrganismos que infiltram nos tecidos periodontais por meio da barreira epitelial (Moreira *et al.*, 2015).

No presente estudo, as médias de redução de PS, aos 90 dias de pós-cirúrgico, em relação aos valores do *baseline*, para os grupos Controle e Teste, foram 2,3 mm e 2,93 mm, respectivamente. Este efeito benéfico incremental da TFDa à RAR refletiu diretamente na redução da necessidade de tratamentos periodontais adicionais para o paciente após a reavaliação dos resultados da TPC aos 150 dias. Neste período, o Grupo Teste também apresentou frequência relativa de bolsas periodontais residuais significativamente menor que aquela do Grupo Controle. Bolsas periodontais residuais representam nichos bacterianos que podem servir como foco de reinfecção. A elevada frequência de bolsas residuais tem associação com um maior risco de progressão da DP (Badersten *et al.*, 1990; Claffey *et al.*, 1990; Claffey e Egelberg, 1995; Lang e Tonetti, 2003). Um estudo de acompanhamento durante 11 anos de pacientes em manutenção periodontal demonstrou que dentes com bolsas residuais profundas (PS > 5 mm) apresentaram 7,7 vezes mais chances de necessidade de exodontia (Matulienė *et al.*, 2008). De acordo com Lang (Lang e Tonetti, 2003), pacientes com 8 ou mais sítios periodontais com PS $\geq$ 5mm são classificados como indivíduos de alto risco para a progressão da DP. Portanto, a estabilidade periodontal está diretamente relacionada a um número mínimo de bolsas residuais. No presente estudo, considerando cada grupo, foi possível constatar maior número de pacientes com baixo risco de progressão da DP no Grupo Teste do que no Grupo Controle.

O fato do efeito antimicrobiano da TFDa produzir efeitos clínicos adicionais apenas com relação a redução da PS quando comparado apenas à descontaminação manual, provavelmente ocorreu pelo fato da raspagem a campo aberto já ser, por si

só, um meio comprovadamente eficaz na redução e ou eliminação tanto do biofilme dental como de cálculos subgengivais e cimento necrótico (Slots *et al.*, 1979; Garrett, 1983; Shiloah e Patters, 1996).

Tanto o presente estudo como estudos anteriores não aplicaram a TFDa como monoterapia em pacientes com periodontite crônica não-tratada (Braun *et al.*, 2008; Christodoulides *et al.*, 2008; Chondros *et al.*, 2009; Lulic *et al.*, 2009; Polansky *et al.*, 2009). Isso se deve ao fato de, apesar de possuir um efeito previamente avaliado sobre a redução da microbiota sugengival, a TFDa não é capaz de remover o cálculo e cimento necrótico, importantes na patogênese periodontal como fatores retentivos de biofilme subgengival (Socransky e Haffajee, 2002; Pinheiro *et al.*, 2010). Contudo, na doença periodontal agressiva, a aplicação da TFDa como monoterapia realizada por Oliveira *et al.*, obteve resultados clínicos semelhantes à raspagem e alisamento radicular (De Oliveira, Schwartz-Filho, *et al.*, 2007).

Monzavi *et al.* (2016) em um estudo comparou a RAR isolada ou associada a TFDa. Através de um protocolo de aplicações múltiplas, também observando melhoras clínicas significativas na redução na PS, no entanto benefícios adicionais com relação ao NIC e índice de placa não foram observados.

Muitos estudos têm demonstrado que a RAR reduz significativamente a prevalência e os níveis de espécies patogênicas, tais como *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*, que estão relacionadas com redução na profundidade de sondagem (Haffajee *et al.*, 1997; Darby *et al.*, 2005). A capacidade que a TFDa tem de eliminar as bactérias foi demonstrada em estudos *in vitro*. A exposição de culturas bacterianas a laser de diodo na presença de azul de metileno como fotosensibilizador levou a uma taxa de morte celular de 95-99% em várias espécies testadas (*A. actinomicetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. Intermedia* e *S. sanguis*) (Chan e Lai, 2003). Da mesma forma, laser de He/Ne foi capaz de matar grandes proporções de bactérias presentes em amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica, sensibilizados por azul de toluidina (Sarkar e Wilson, 1993), o que também foi observado em biofilmes de *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. Actinomycetemcomitans* (Dobson e Wilson, 1992). Uma significativa redução no número de *T. denticola* também foi detectada nas cavidades orais de ratos,

em que o azul de toluidina foi utilizado em conjunto com luz laser (Komerik *et al.*, 2003).

Esse efeito da TFDa também tem sido observado em estudos clínicos. Em um estudo (Theodoro *et al.*, 2012) foram analisadas amostras de biofilme subgingival de 33 pacientes com periodontite crônica, uma redução significativa na proporção de sítios positivos para periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *P. nigrescens*) foi observado 180 dias após o tratamento periodontal no grupo em que a TFDa foi associada à RAR quando comparado com o grupo que recebeu somente RAR. Além disso, a TFDa foi capaz de suprimir a concentração de *F. nucleatum* em 24 pacientes com periodontite crônica localizada, e um estudo (Chondros *et al.*, 2009) realizado em pacientes sob terapia periodontal de suporte mostrou uma redução estatisticamente significativa de *F. nucleatum* e *E. nodatum* no grupo onde foi realizada a TFDa. Uma significativa redução no número de *T. Denticola* ($p = 0,0221$) foi detectada após TPC no Grupo Teste no presente estudo, como também, apesar de não estatisticamente significativa ($p = 0,0604$) observou-se uma importante redução na prevalência de *T. gingivalis*.

O fato de não haver diferenças estatísticas nas reduções dos complexos bacterianos foi outro fator que igualou as terapias. No que se refere aos parâmetros microbiológicos, foi possível constatar, no Grupo Teste, quando comparado ao Grupo Controle, uma menor proporção de espécies bacterianas dos complexos laranja e vermelho aos 90 dias pós-operatórios. Sítios periodontais que apresentam bactérias do complexo vermelho têm maior risco de perda de inserção (Hamlet *et al.*, 2004), bem como apresentam maior gravidade e progressão da DP do que sítios que possuem contagens reduzidas dessas bactérias (Silva-Senem *et al.*, 2013). De fato, esses patógenos periodontais estão fortemente associados com a presença de bolsas residuais e respostas insatisfatórias no tratamento periodontal (Colombo *et al.*, 2012).

A baixa presença de *Aa* durante todo o estudo é um importante ponto a discutir pois a alta prevalência deste periodontopatógeno caracteriza um quadro de PA, visto que esse microrganismo é um importante patógeno relacionado com a etiologia da PA (Annaji *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016). Tal resultado diverge no encontrado no estudo de Moreira *et al.* (2015) que avaliaram microbiologicamente amostras de pacientes com PA e encontraram grandes proporções desse microrganismo no *baseline*.

Assim como encontrado no presente estudo, Petelin *et al.* (2015) também encontraram reduções significantes na presença da bactéria *T. denticola* após 6 meses de aplicações múltiplas da TFDa em bolsas periodontais profundas quando comparados a RAR. Tais resultados corroboram ao encontrado com o presente estudo, evidenciando uma maior eficiência em eliminar este periodontopatógeno através dessa modalidade terapêutica.

Sigusch *et al.* (2010), avaliaram em pacientes com periodontite crônica que apresentavam sítios periodontais positivos para a presença de *F. nucleatum* os efeitos clínico e microbiológico da TFDa. Os pacientes foram divididos em dois grupos, sendo um deles tratado com RAR + TFDa e outro com apenas RAR. No grupo que recebeu TFDa, foram observados maior redução de PS e ganho de inserção clínica do que no grupo tratado apenas com RAR. A TFDa também foi capaz de reduzir as concentrações de *F. nucleatum* de forma mais significativa que a RAR isoladamente. Os autores concluíram que a redução na concentração de *F. nucleatum* pode estar intimamente associada com os melhores parâmetros clínicos observados no grupo que recebeu a TFDa, uma vez que esse patógeno está associado com a DP e, especialmente, com o SS. Semelhante ao nosso estudo foram observados maiores reduções de PS no grupo que recebeu TFDa, não foi observado a diferença significativa na redução de *F. Nucleatum*, todavia, uma maior redução numérica foi observada no grupo Teste tanto em +60 ($p = 0,062$) quanto em +150 ($p = 0,0989$) quando comparado ao grupo controle que no mesmo período tiveram reduções menos significantes 0,4101 e 0,2507, respectivamente.

A proporção de espécies compatíveis com o hospedeiro também foi afetada pela TFDa no presente estudo. No Grupo Teste, foram observadas proporções significativamente maiores de espécies *Actinomyces* (complexo azul) do que aquelas do Grupo Controle. De fato, além da redução dos patógenos periodontais, um aumento das espécies benéficas é importante para um tratamento periodontal bem sucedido (Moreira *et al.*, 2015). Neste estudo, o Grupo Teste apresentou um aumento na proporção de espécies do complexo azul aos 150 dias similar ao obtido por Mestnik *et al.* (2012) quando antimicrobianos sistêmicos foram associados à RAR no tratamento da PA.

Um importante ponto a ser discutido em relação aos resultados clínicos da fase pós-cirúrgica é a influência do controle do biofilme supragengival para a manutenção

da saúde periodontal. Os resultados mostram uma similaridade no nível de controle do biofilme dental, bem como de sangramento gengival durante a reavaliação (Costa *et al.*, 2014). Estudos anteriores apontam que a realização de terapia periodontal de suporte a cada 3 meses seria suficiente para a manutenção dos resultados da terapia periodontal. Os pacientes desse estudo foram controlados semanalmente e mensalmente até ser completado o período de reavaliação (Lindhe e Nyman, 1987; Ramfjord, 1987; 1993; Axelsson *et al.*, 2004). Assim, o controle do biofilme supragengival certamente foi importante para a estabilidade dos resultados em todos os grupos durante o período pós-cirúrgico.

Até o presente momento, este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos da TFDa como adjuvante à TPC no tratamento da PC. Um desenho experimental do tipo boca dividida foi escolhido para que cada indivíduo fosse seu próprio controle e fosse reduzida a variabilidade inter-individual nas respostas imunoinflamatórias periodontais. Uma limitação do presente estudo foi a impossibilidade de realização da coleta microbiológica aos 30 dias de pós-operatório. Seria interessante, em futuros estudos, realizar um monitoramento dos pacientes por períodos maiores a fim de verificar se a terapia combinada (TPC+TFDa) pode sustentar as mudanças obtidas nos parâmetros clínicos e microbiológicos a longo prazo, verificando assim o momento que ela já não gera efeito benéfico.

Conclusão

A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que as duas terapias utilizadas foram efetivas na melhora das condições periodontais de pacientes com Periodontite Crônica Avançada.

A utilização da TFDa parece ser uma opção viável, em conjunto com a o acesso cirúrgico para a raspagem e alisamento radicular, para o tratamento periodontal de sítios com bolsas profundas.

A aplicação única da TFDa como recurso adjuvante à TPC de pacientes com PCA foi capaz de reduzir significativamente a PS 90 dias após o tratamento, reduzindo a necessidade de tratamentos periodontais adicionais, bem como diminuindo significativamente os níveis de bactérias presentes em amostras do biofilme subgengival analisadas 90 dias após o tratamento.

Referências Bibliográficas

- (2002) Position paper: American Academy of Periodontology's guidelines for periodontal therapy. *Dent Today* **21**, 32.
- Adriaens, P. A. & Adriaens, L. M. (2004) Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000* **36**, 121-145. doi:10.1111/j.1600-0757.2004.03676.x.
- Ainamo, J. & Bay, I. (1976) [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet* **80**, 149-152.
- Alwaeli, H. A., Al-Khateeb, S. N. & Al-Sadi, A. (2015) Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci* **30**, 801-807. doi:10.1007/s10103-013-1426-y.
- American Academy of, P. (2011) Comprehensive periodontal therapy: a statement by the American Academy of Periodontology *. *J Periodontol* **82**, 943-949. doi:10.1902/jop.2011.117001.
- Andersen, R., Loebel, N., Hammond, D. & Wilson, M. (2007) Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* **18**, 34-38.
- Andrade, P. F., Garlet, G. P., Silva, J. S., Fernandes, P. G., Milanezi, C., Novaes, A. B., Jr., Palioto, D. B., Grisi, M. F., Taba, M., Jr. & Souza, S. L. (2013) Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to an association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression: a human study. *J Photochem Photobiol B* **126**, 119-125. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.06.012.
- Annaji, S., Sarkar, I., Rajan, P., Pai, J., Malagi, S., Bharmappa, R. & Kamath, V. (2016) Efficacy of Photodynamic Therapy and Lasers as an Adjunct to Scaling and Root Planing in the Treatment of Aggressive Periodontitis - A Clinical and Microbiologic Short Term Study. *J Clin Diagn Res* **10**, ZC08-12. doi:10.7860/JCDR/2016/13844.7165.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1.
- Axelsson, P., Nystrom, B. & Lindhe, J. (2004) The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol* **31**, 749-757. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00563.x.
- Azarpazhooh, A., Shah, P. S., Tenenbaum, H. C. & Goldberg, M. B. (2010) The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* **81**, 4-14. doi:10.1902/jop.2009.090285.
- Badersten, A., Nilveus, R. & Egelberg, J. (1987) Effect of nonsurgical periodontal therapy (VIII). Probing attachment changes related to clinical characteristics. *J Clin Periodontol* **14**, 425-432.
- Badersten, A., Nilveus, R. & Egelberg, J. (1990) Scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth to predict probing attachment loss. 5 years of observation following nonsurgical periodontal therapy. *J Clin Periodontol* **17**, 102-107.
- Baker, K. A. (1995) The role of dental professionals and the patient in plaque control. *Periodontol 2000* **8**, 108-113.
- Balata, M. L., Andrade, L. P., Santos, D. B., Cavalcanti, A. N., Tunes Uda, R., Ribeiro Edel, P. & Bittencourt, S. (2013) Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci* **21**, 208-214. doi:10.1590/1678-7757201302366.
- Bassir, S. H., Moslemi, N., Jamali, R., Mashmouly, S., Fekrazad, R., Chiniforush, N., Shamshiri, A. R. & Nowzari, H. (2013) Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot

- double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **40**, 65-72. doi:10.1111/jcpe.12024.
- Berakdar, M., Callaway, A., Eddin, M. F., Ross, A. & Willershausen, B. (2012) Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head Face Med* **8**, 12. doi:10.1186/1746-160X-8-12.
- Betsy, J., Prasanth, C. S., Baiju, K. V., Prasanthila, J. & Subhash, N. (2014) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **41**, 573-581. doi:10.1111/jcpe.12249.
- Bhatti, M., MacRobert, A., Meghji, S., Henderson, B. & Wilson, M. (1997) Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol* **65**, 1026-1031.
- Birang, R., Shahaboui, M., Kiani, S., Shadmehr, E. & Naghsh, N. (2015) Effect of Nonsurgical Periodontal Treatment Combined With Diode Laser or Photodynamic Therapy on Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Split-Mouth Clinical Trial. *J Lasers Med Sci* **6**, 112-119. doi:10.15171/jlms.2015.04.
- Boehm, T. K. & Ciancio, S. G. (2011) Diode laser activated indocyanine green selectively kills bacteria. *J Int Acad Periodontol* **13**, 58-63.
- Braun, A., Dehn, C., Krause, F. & Jepsen, S. (2008) Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **35**, 877-884. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01303.x.
- Brayer, W. K., Mellonig, J. T., Dunlap, R. M., Marinak, K. W. & Carson, R. E. (1989) Scaling and root planing effectiveness: the effect of root surface access and operator experience. *J Periodontol* **60**, 67-72. doi:10.1902/jop.1989.60.1.67.
- Caffesse, R. G., Sweeney, P. L. & Smith, B. A. (1986) Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *J Clin Periodontol* **13**, 205-210.
- Cappuyns, I., Cionca, N., Wick, P., Giannopoulou, C. & Mombelli, A. (2012) Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* **27**, 979-986. doi:10.1007/s10103-011-1027-6.
- Carvalho, V. F., Andrade, P. V., Rodrigues, M. F., Hirata, M. H., Hirata, R. D., Pannuti, C. M., De Micheli, G. & Conde, M. C. (2015) Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal patients: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. doi:10.1111/jcpe.12393.
- Chan, Y. & Lai, C. H. (2003) Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **18**, 51-55. doi:10.1007/s10103-002-0243-5.
- Chen, L. L., Wu, Y. M., Yan, J., Sun, W. L., Sun, Y. Z. & Ojcius, D. (2005) Association between coinfection of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* and periodontal tissue destruction in chronic periodontitis. *Chin Med J (Engl)* **118**, 915-921.
- Chondros, P., Nikolidakis, D., Christodoulides, N., Rossler, R., Gutknecht, N. & Sculean, A. (2009) Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* **24**, 681-688. doi:10.1007/s10103-008-0565-z.
- Christodoulides, N., Nikolidakis, D., Chondros, P., Becker, J., Schwarz, F., Rossler, R. & Sculean, A. (2008) Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* **79**, 1638-1644. doi:10.1902/jop.2008.070652.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. (2009) Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *J Periodontol* **80**, 364-371. doi:10.1902/jop.2009.080540.

- Claffey, N. & Egelberg, J. (1995) Clinical indicators of probing attachment loss following initial periodontal treatment in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **22**, 690-696.
- Claffey, N., Nylund, K., Kiger, R., Garrett, S. & Egelberg, J. (1990) Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth for probing attachment loss. 3 1/2 years of observation following initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* **17**, 108-114.
- Colombo, A. P., Bennet, S., Cotton, S. L., Goodson, J. M., Kent, R., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2012) Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* **83**, 1279-1287. doi:10.1902/jop.2012.110566.
- Costa, F. O., Lages, E. J., Cota, L. O., Lorentz, T. C., Soares, R. V. & Cortelli, J. R. (2014) Tooth loss in individuals under periodontal maintenance therapy: 5-year prospective study. *J Periodontol Res* **49**, 121-128. doi:10.1111/jre.12087.
- Crispino, A., Figliuzzi, M. M., Iovane, C., Del Giudice, T., Lomanno, S., Pacifico, D., Fortunato, L. & Del Giudice, R. (2015) Effectiveness of a diode laser in addition to non-surgical periodontal therapy: study of intervention. *Ann Stomatol (Roma)* **6**, 15-20.
- Danser, M. M., Timmerman, M. F., van Winkelhoff, A. J. & van der Velden, U. (1996) The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol* **67**, 478-485. doi:10.1902/jop.1996.67.5.478.
- Darby, I. B., Hodge, P. J., Riggio, M. P. & Kinane, D. F. (2005) Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **32**, 200-206. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00644.x.
- de Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Oshiiwa, M. & Garcia, V. G. (2007) Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* **78**, 566-575. doi:10.1902/jop.2007.060214.
- de Oliveira, R. R., Novaes, A. B., Jr., Taba, M., Jr., de Souza, S. L. & Papalexiou, V. (2007a) The effect of bone condensation and crestal preparation on the bone response to implants designed for immediate loading: a histomorphometric study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* **22**, 63-71.
- de Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B., Garlet, G. P., de Souza, R. F., Taba, M., Scombatti de Souza, S. L. & Ribeiro, F. J. (2009) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* **80**, 98-105. doi:10.1902/jop.2009.070465.
- de Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B., Jr. & Taba, M., Jr. (2007b) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* **78**, 965-973. doi:10.1902/jop.2007.060494.
- Deas, D. E. & Mealey, B. L. (2010) Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontol 2000* **53**, 154-166. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00334.x.
- Deas, D. E., Moritz, A. J., Sagun, R. S., Jr., Gruwell, S. F. & Powell, C. A. (2016) Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol 2000* **71**, 128-139. doi:10.1111/prd.12114.
- Decker, E. M., Bartha, V., Kopunic, A. & von Ohle, C. (2016) Antimicrobial efficiency of mouthrinses versus and in combination with different photodynamic therapies on periodontal pathogens in an experimental study. *J Periodontol Res*. doi:10.1111/jre.12379.

- Dobson, J. & Wilson, M. (1992) Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* **37**, 883-887.
- Faveri, M., Mayer, M. P., Feres, M., de Figueiredo, L. C., Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2008) Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 112-118. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00397.x.
- Faveri, M., Rebello, A., de Oliveira Dias, R., Borges-Junior, I., Duarte, P. M., Figueiredo, L. C. & Feres, M. (2014) Clinical and microbiologic effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized chronic periodontitis: smokers versus non-smokers. *J Periodontol* **85**, 581-591. doi:10.1902/jop.2013.130278.
- Feres, M., Haffajee, A. D., Allard, K., Som, S., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (2002) Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* **29**, 724-735.
- Fine, D. H., Kaplan, J. B., Kachlany, S. C. & Schreiner, H. C. (2006) How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontol 2000* **42**, 114-157. doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00189.x.
- Flemmig, T. F., Arushanov, D., Daubert, D., Rothen, M., Mueller, G. & Leroux, B. G. (2012) Randomized controlled trial assessing efficacy and safety of glycine powder air polishing in moderate-to-deep periodontal pockets. *J Periodontol* **83**, 444-452. doi:10.1902/jop.2011.110367.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Karch, H. & Klaiber, B. (1998) Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* **25**, 380-387.
- Garrett, J. S. (1983) Effects of nonsurgical periodontal therapy on periodontitis in humans. A review. *J Clin Periodontol* **10**, 515-523.
- Ge, L., Shu, R., Li, Y., Li, C., Luo, L., Song, Z., Xie, Y. & Liu, D. (2011) Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg* **29**, 33-37. doi:10.1089/pho.2009.2727.
- Giannelli, M., Formigli, L., Lorenzini, L. & Bani, D. (2012) Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol* **39**, 962-970. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01925.x.
- Gruner, D., Paris, S. & Schwendicke, F. (2016) Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent* **48**, 16-25. doi:10.1016/j.jdent.2016.03.002.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1997) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **24**, 324-334.
- Hamlet, S., Ellwood, R., Cullinan, M., Worthington, H., Palmer, J., Bird, P., Narayanan, D., Davies, R. & Seymour, G. (2004) Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res* **83**, 232-235.
- Herrera, D., Alonso, B., Leon, R., Roldan, S. & Sanz, M. (2008) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* **35**, 45-66. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01260.x.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **29 Suppl 3**, 136-159; discussion 160-132.
- Hinrichs, J. E., Wolff, L. F., Pihlstrom, B. L., Schaffer, E. M., Liljemark, W. F. & Bandt, C. L. (1985) Effects of scaling and root planing on subgingival microbial proportions standardized in terms of their naturally occurring distribution. *J Periodontol* **56**, 187-194. doi:10.1902/jop.1985.56.4.187.

- Ishikawa, I., Aoki, A. & Takasaki, A. A. (2008) Clinical application of erbium:YAG laser in periodontology. *J Int Acad Periodontol* **10**, 22-30.
- Ishikawa, I., Aoki, A., Takasaki, A. A., Mizutani, K., Sasaki, K. M. & Izumi, Y. (2009) Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontol 2000* **50**, 90-126. doi:10.1111/j.1600-0757.2008.00283.x.
- Jeffcoat, M. K. & Reddy, M. S. (2000) Advances in measurements of periodontal bone and attachment loss. *Monogr Oral Sci* **17**, 56-72.
- Kamma, J. J., Vasdekis, V. G. & Romanos, G. E. (2009) The effect of diode laser (980 nm) treatment on aggressive periodontitis: evaluation of microbial and clinical parameters. *Photomed Laser Surg* **27**, 11-19. doi:10.1089/pho.2007.2233.
- Kepic, T. J., O'Leary, T. J. & Kafrawy, A. H. (1990) Total calculus removal: an attainable objective? *J Periodontol* **61**, 16-20. doi:10.1902/jop.1990.61.1.16.
- Komerik, N., Nakanishi, H., MacRobert, A. J., Henderson, B., Speight, P. & Wilson, M. (2003) In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 932-940.
- Komerik, N., Wilson, M. & Poole, S. (2000) The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* **72**, 676-680.
- Kreisler, M., Meyer, C., Stender, E., Daublander, M., Willershausen-Zonnchen, B. & d'Hoedt, B. (2001) Effect of diode laser irradiation on the attachment rate of periodontal ligament cells: an in vitro study. *J Periodontol* **72**, 1312-1317. doi:10.1902/jop.2001.72.10.1312.
- Lang, N. P. & Tonetti, M. S. (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent* **1**, 7-16.
- Lindhe, J. & Nyman, S. (1987) Clinical trials in periodontal therapy. *J Periodontol Res* **22**, 217-221.
- Lindhe, J., Westfelt, E., Nyman, S., Socransky, S. S., Heijl, L. & Bratthall, G. (1982) Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study. *J Clin Periodontol* **9**, 115-128.
- Lopez, R. & Baelum, V. (2015) Periodontal disease classifications revisited. *Eur J Oral Sci* **123**, 385-389. doi:10.1111/eos.12227.
- Lulic, M., Leiggener Gorog, I., Salvi, G. E., Ramseier, C. A., Mattheos, N. & Lang, N. P. (2009) One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **36**, 661-666. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x.
- Matarazzo, F., Figueiredo, L. C., Cruz, S. E., Faveri, M. & Feres, M. (2008) Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* **35**, 885-896. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01304.x.
- Matia, J. I., Bissada, N. F., Maybury, J. E. & Ricchetti, P. (1986) Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent* **6**, 24-35.
- Matulienė, G., Pjetursson, B. E., Salvi, G. E., Schmidlin, K., Bragger, U., Zwahlen, M. & Lang, N. P. (2008) Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol* **35**, 685-695. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01245.x.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Soares, G., Teles, R. P., Fermiano, D., Duarte, P. M. & Faveri, M. (2012) The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **39**, 955-961. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01932.x.

- Mizutani, K., Aoki, A., Coluzzi, D., Yukna, R., Wang, C. Y., Pavlic, V. & Izumi, Y. (2016) Lasers in minimally invasive periodontal and peri-implant therapy. *Periodontol 2000* **71**, 185-212. doi:10.1111/prd.12123.
- Mombelli, A., Cionca, N. & Almaghlouth, A. (2011) Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery? *Periodontol 2000* **55**, 205-216. doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00356.x.
- Monzavi, A., Chinipardaz, Z., Mousavi, M., Fekrazad, R., Moslemi, N., Azaripour, A., Bagherpasand, O. & Chiniforush, N. (2016) Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* doi:10.1016/j.pdpdt.2016.02.007.
- Moraes, S. R., Siqueira, J. F., Jr., Colombo, A. P., Rocas, I. N., Ferreira, M. C. & Domingues, R. M. (2002) Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod* **28**, 86-89.
- Moreira, A. L., Novaes, A. B., Jr., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B., de Oliveira, P. G., Casati, M. Z., Casarin, R. C. & Messoria, M. R. (2015) Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* **86**, 376-386. doi:10.1902/jop.2014.140392.
- Nagahara, A., Mitani, A., Fukuda, M., Yamamoto, H., Tahara, K., Morita, I., Ting, C. C., Watanabe, T., Fujimura, T., Osawa, K., Sato, S., Takahashi, S., Iwamura, Y., Kuroyanagi, T., Kawashima, Y. & Noguchi, T. (2013) Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* **48**, 591-599. doi:10.1111/jre.12042.
- Nagarakanti, S., Gunupati, S., Chava, V. K. & Reddy, B. V. (2015) Effectiveness of Subgingival Irrigation as an Adjunct to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Systematic Review. *J Clin Diagn Res* **9**, ZE06-09. doi:10.7860/JCDR/2015/13862.6210.
- Needleman, I. G., Collins, A. M. & Moles, D. R. (2000) Periodontal flap surgery with 25% metronidazole gel. (1). Clinical outcomes. *J Clin Periodontol* **27**, 187-192.
- Neely, A. L., Holford, T. R., Loe, H., Anerud, A. & Boysen, H. (2001) The natural history of periodontal disease in man. Risk factors for progression of attachment loss in individuals receiving no oral health care. *J Periodontol* **72**, 1006-1015. doi:10.1902/jop.2001.72.8.1006.
- Novaes, A. B., Jr., Schwartz-Filho, H. O., de Oliveira, R. R., Feres, M., Sato, S. & Figueiredo, L. C. (2012) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci* **27**, 389-395. doi:10.1007/s10103-011-0901-6.
- O'Leary, T. J., Drake, R. B. & Naylor, J. E. (1972) The plaque control record. *J Periodontol* **43**, 38. doi:10.1902/jop.1972.43.1.38.
- Oliver, R. C., Brown, L. J. & Loe, H. (1998) Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol* **69**, 269-278. doi:10.1902/jop.1998.69.2.269.
- Pallasch, T. J. (2000) Global antibiotic resistance and its impact on the dental community. *J Calif Dent Assoc* **28**, 215-233.
- Paster, B. J. & Dewhirst, F. E. (2009) Molecular microbial diagnosis. *Periodontol 2000* **51**, 38-44. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00316.x.
- Petelin, M., Perkic, K., Seme, K. & Gaspirc, B. (2015) Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci* **30**, 1647-1656. doi:10.1007/s10103-014-1632-2.

- Pinheiro, S. L., Donega, J. M., Seabra, L. M., Adabo, M. D., Lopes, T., do Carmo, T. H., Ribeiro, M. C. & Bertolini, P. F. (2010) Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* **25**, 87-91. doi:10.1007/s10103-009-0671-6.
- Polansky, R., Haas, M., Heschl, A. & Wimmer, G. (2009) Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* **36**, 575-580.
- Prates, R. A., Yamada, A. M., Suzuki, L. C., Franca, C. M., Cai, S., Mayer, M. P., Ribeiro, A. C. & Ribeiro, M. S. (2011) Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg* **29**, 835-844. doi:10.1089/pho.2010.2894
- 10.1089/pho.2010.2984.
- Preshaw, P. M. (2009) Definitions of periodontal disease in research. *J Clin Periodontol* **36**, 1-2. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01320.x.
- Preus, H. R., Gunleiksrud, T. M., Sandvik, L., Gjermo, P. & Baelum, V. (2013) A randomized, double-masked clinical trial comparing four periodontitis treatment strategies: 1-year clinical results. *J Periodontol* **84**, 1075-1086. doi:10.1902/jop.2012.120400.
- Qin, Y., Luan, X., Bi, L., He, G., Bai, X., Zhou, C. & Zhang, Z. (2008a) Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci* **23**, 49-54. doi:10.1007/s10103-007-0454-x.
- Qin, Y. L., Luan, X. L., Bi, L. J., Sheng, Y. Q., Zhou, C. N. & Zhang, Z. G. (2008b) Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res* **43**, 162-167. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01007.x.
- Queiroz, A. C., Suaid, F. A., de Andrade, P. F., Oliveira, F. S., Novaes, A. B., Jr., Taba, M., Jr., Palioto, D. B., Grisi, M. F. & Souza, S. L. (2013) Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. doi:10.1007/s10103-013-1379-1.
- Rabbani, G. M., Ash, M. M., Jr. & Caffesse, R. G. (1981) The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. *J Periodontol* **52**, 119-123. doi:10.1902/jop.1981.52.3.119.
- Ramfjord, S. P. (1987) Maintenance care for treated periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **14**, 433-437.
- Ramfjord, S. P. (1993) Maintenance care and supportive periodontal therapy. *Quintessence Int* **24**, 465-471.
- Ramos, U. D., Ayub, L. G., Reino, D. M., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B. & Novaes, A. B., Jr. (2016) Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. *J Clin Periodontol* **43**, 147-155. doi:10.1111/jcpe.12498.
- Richardson, A. C., Chadroff, B. & Bowers, G. M. (1990) The apical location of calculus within the intrabony defect. *J Periodontol* **61**, 118-122. doi:10.1902/jop.1990.61.2.118.
- Rosling, B., Hellstrom, M. K., Ramberg, P., Socransky, S. S. & Lindhe, J. (2001) The use of PVP-iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**, 1023-1031.
- Ruhling, A., Fanghanel, J., Houshmand, M., Kuhr, A., Meisel, P., Schwahn, C. & Kocher, T. (2010) Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. *Clin Oral Investig* **14**, 637-644. doi:10.1007/s00784-009-0347-4.
- Sampaio, E., Rocha, M., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Duarte, P. M., Gomes Lira, E. A. & Feres, M. (2011) Clinical and microbiological effects of azithromycin in the

- treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **38**, 838-846. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01766.x.
- Sarkar, S. & Wilson, M. (1993) Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res* **28**, 204-210.
- Schwarz, F., Aoki, A., Becker, J. & Sculean, A. (2008) Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol* **35**, 29-44. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01259.x.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Gatto, R., Marzo, G. & Monaco, A. (2013a) Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* **28**, 669-682. doi:10.1007/s10103-011-1002-2.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Graziani, F., Gatto, R. & Monaco, A. (2013b) Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* **40**, 514-526. doi:10.1111/jcpe.12094.
- Sherman, P. R., Hutchens, L. H., Jr., Jewson, L. G., Moriarty, J. M., Greco, G. W. & McFall, W. T., Jr. (1990) The effectiveness of subgingival scaling and root planning. I. Clinical detection of residual calculus. *J Periodontol* **61**, 3-8. doi:10.1902/jop.1990.61.1.3.
- Shiloah, J. & Patters, M. R. (1996) Repopulation of periodontal pockets by microbial pathogens in the absence of supportive therapy. *J Periodontol* **67**, 130-139. doi:10.1902/jop.1996.67.2.130.
- Sigus, B. W., Engelbrecht, M., Volpel, A., Holletschke, A., Pfister, W. & Schutze, J. (2010) Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol* **81**, 975-981. doi:10.1902/jop.2010.090246.
- Silva-Senem, M. X., Heller, D., Varela, V. M., Torres, M. C., Feres-Filho, E. J. & Colombo, A. P. (2013) Clinical and microbiological effects of systemic antimicrobials combined to an anti-infective mechanical debridement for the management of aggressive periodontitis: a 12-month randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* **40**, 242-251. doi:10.1111/jcpe.12052.
- Siqueira, J. F., Rocas, I. N., De Uzeda, M., Colombo, A. P. & Santos, K. R. (2002) Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol* **51**, 1090-1096. doi:10.1099/0022-1317-51-12-1090.
- Slots, J. (1979) Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* **6**, 351-382.
- Slots, J., Mashimo, P., Levine, M. J. & Genco, R. J. (1979) Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol* **50**, 495-509. doi:10.1902/jop.1979.50.10.495.
- Slots, J., Research, S. & Therapy, C. (2004) Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* **75**, 1553-1565. doi:10.1902/jop.2004.75.11.1553.
- Smith, G. L., Socransky, S. S. & Smith, C. M. (1989) Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* **4**, 41-46.
- Soares, G. M., Mendes, J. A., Silva, M. P., Faveri, M., Teles, R., Socransky, S. S., Wang, X., Figueiredo, L. C. & Fere, M. (2014) Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **41**, 366-376.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* **28**, 12-55.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-144.

- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C. & Dibart, S. (1991) Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* **18**, 766-775.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, G. L. & Dzink, J. L. (1987) Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **14**, 588-593.
- Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17**, 788-792.
- Souza, E., Medeiros, A. C., Gurgel, B. C. & Sarmento, C. (2016) Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* **31**, 187-196. doi:10.1007/s10103-015-1836-0.
- Stein, E., Koehn, J., Sutter, W., Schmidl, C., Lezaic, V., Wendtlandt, G., Watzinger, F. & Turhani, D. (2009) Phenothiazine chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg* **27**, 71-77. doi:10.1089/pho.2008.2265.
- Takasaki, A. A., Aoki, A., Mizutani, K., Schwarz, F., Sculean, A., Wang, C. Y., Koshy, G., Romanos, G., Ishikawa, I. & Izumi, Y. (2009) Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol 2000* **51**, 109-140. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00302.x.
- Teles, F. R., Teles, R. P., Uzel, N. G., Song, X. Q., Torresyap, G., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2012) Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* **47**, 95-104. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01409.x.
- Theodoro, L. H., Silva, S. P., Pires, J. R., Soares, G. H., Pontes, A. E., Zuza, E. P., Spolidorio, D. M., de Toledo, B. E. & Garcia, V. G. (2012) Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci* **27**, 687-693. doi:10.1007/s10103-011-0942-x.
- Tribble, G. D. & Lamont, R. J. (2010) Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontol 2000* **52**, 68-83. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00323.x.
- Waerhaug, J. (1978) Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *J Periodontol* **49**, 119-134. doi:10.1902/jop.1978.49.3.119.
- Wasserman, B. & Hirschfeld, L. (1988) The relationship of initial clinical parameters to the long-term response in 112 cases of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **15**, 38-42.
- Wilson, M. (2004) Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 412-418. doi:10.1039/b211266c.
- Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J. & van der Velden, U. (1998) Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* **25**, 857-864.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A. & Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **33**, 254-264. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.00905.x.

Anexos

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza e Sérgio Henrique Lago Martins (denominados Pesquisadores) convidamos o(a) Sr(a) portador(a) do RG _____ e CPF _____, (denominado participante da pesquisa) a participar da pesquisa, cujo título é **“Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana como coadjuvante na terapia cirúrgica de acesso à raspagem em pacientes com Periodontite Crônica Avançada”**. Através deste Termo de Consentimento o participante da pesquisa autoriza a sua participação na pesquisa, pois foram dadas todas as informações necessárias para que ele pudesse tomar esta decisão. Este documento foi elaborado em duas vias de igual valor e conteúdo para o participante da pesquisa ler e assinar, caso ele aceitasse participar da pesquisa, ficando ele com uma das vias.

O participante da pesquisa fica ciente de que:

1. A pesquisa é de responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza e tem a participação do mestrando em Periodontia Sérgio Henrique Lago Martins.
2. Esta pesquisa será feita para que se possam verificar os benefícios da ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana. Para isso, o Sérgio Henrique fará alguns exames antes e depois de executar as cirurgias nos dentes do participante da pesquisa selecionado. O tratamento da gengiva de toda a boca do participante da pesquisa será também realizado pelo Sérgio Henrique.
3. Os produtos que serão usados no tratamento do participante da pesquisa são registrados por órgãos internacionais e/ou pelo governo brasileiro e não oferecem risco à saúde.
4. Os procedimentos que poderão causar incômodo ao participante da pesquisa são: exames que serão feitos na boca, fotografias, limpeza dos dentes e anestesia. Depois das cirurgias, o local poderá ficar um pouco inchado e o participante da pesquisa poderá sentir dor, mas será explicado e dado por escrito a ele as recomendações para diminuir a chance de isso ocorrer. Além disso, será receitado depois das cirurgias um remédio analgésico e antiinflamatório para diminuir a chance de inchar e para aliviar a dor do participante da pesquisa.
5. Serão realizadas terapias diferentes, uma em cada lado da boca, sendo uma considerada controle e a outra experimental, como tratamentos para uma mesma doença. A terapia que possivelmente promoverá benefícios extras será disponibilizada a todos os participantes da pesquisa.
6. O participante da pesquisa se compromete a contar aos pesquisadores se possui algum problema de saúde ou se já teve alguma alergia a algum material ou medicamento, pois isto é muito importante para a realização das cirurgias.
7. Fica garantido ao participante da pesquisa que o Sérgio Henrique o acompanhará desde o primeiro exame até o final do seu tratamento da gengiva, estando ele à disposição para tirar dúvidas durante o tratamento.

8. O participante da pesquisa pode não querer participar desta pesquisa ou pode retirar o seu consentimento a qualquer hora, sem receber penalização e sem prejudicar o seu atendimento.
9. Os dados do participante da pesquisa ficarão arquivados na FORP-USP e somente serão usados na publicação da pesquisa. Haverá total garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos dados durante todas as fases da pesquisa.
10. Conforme a Resolução CNS 466/2012, é garantido ao participante da pesquisa o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo. Fica garantido, também, que o participante da pesquisa terá assistência, se acontecer algum problema à sua saúde comprovadamente causado devido à sua participação nesta pesquisa.
11. O participante da pesquisa se compromete a comparecer às consultas marcadas, no horário combinado, e a seguir as orientações dadas pelo mestrando Sérgio Henrique.
12. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência total ao paciente durante a pesquisa. Se necessário, o participante poderá entrar em contato com Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza (tel. (16) 3602-4141 / e-mail: scombatti@forp.usp.br), com Sérgio Henrique Lago Martins (tel. (16) 98260-6410 / e-mail: sergiolago@usp.br).
13. O participante da pesquisa que sofrer qualquer dano ou prejuízo comprovadamente decorrente da pesquisa será indenizado dos gastos decorrentes desse dano.
14. O participante da pesquisa foi informado que pode comunicar suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à participação na pesquisa caso sinta vontade, por escrito à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa - FORP-USP, desde que se identifique, sendo que o seu nome será mantido em anonimato.
15. O participante da pesquisa confirma o recebimento de uma via do Termo de Consentimento idêntica a que será arquivada com os pesquisadores, devidamente assinada pelos pesquisadores e o participante da pesquisa na última folha e rubricada nas demais folhas.

Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza - CPF: 07894579890

Sérgio Henrique Lago Martins – CPF: 07370503496

Declaro que li, compreendi, concordo em participar desta pesquisa, por isso assino este documento.

Participante da pesquisa

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____.

Marcela Scatolin Calache – Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Tel.: 3602-0493 – Horário de atendimento: das 8 às 12 horas, de segunda a sexta-feira.

Anexo B - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana como coadjuvante na terapia cirúrgica de acesso à raspagem em pacientes com Periodontite Crônica Avançada

Pesquisador: Sérgio Luís Scombatti de Souza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 26497414.8.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 732.109

Data da Relatoria: 28/07/2014

Apresentação do Projeto:

A periodontite crônica (PC) é uma doença infecciosa resultando em inflamação das estruturas de suporte dos dentes, perda progressiva de inserção e perda óssea. O objetivo deste estudo será avaliar o efeitos da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) como adjuvante ao tratamento periodontal cirúrgico (TPC) em pacientes diagnosticados com periodontite crônica avançada generalizada (PCAG). Em um modelo tipo boca dividida,

20 pacientes com diagnóstico clínico de PCAG receberão inicialmente preparo básico periodontal não cirúrgico com sessões periódicas de raspagem e alisamento radicular (RAR). Depois disso, os sítios com indicação de terapia cirúrgica serão tratados com TFDa associada a raspagem e alisamento radicular (RAR) a retalho ou apenas RAR a retalho. Para protocolo da TFDa, será utilizada um fonte de luz

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 732.109

laser

660nm de comprimento de onda associada ao fotossensibilizador fenotiazida. Todos os pacientes serão acompanhados por 90 dias. Nos períodos baseline, pós-terapia básica, 30 e 90 dias após a terapia cirúrgica será realizada a avaliação clínica de índice de placa, profundidade de bolsa a sondagem, nível de inserção clínico relativo e sangramento a sondagem, além da coleta de amostras de placa subgengival para contagem de 40 espécies microbianas utilizando o método checkerboard DNA-DNA hybridization. Nos mesmos períodos serão coletadas também amostras do fluido crevicular gengival para avaliação do volume do fluido (Periotron) e dos níveis de Interleucina 1 beta, MMP-8, Fator de Necrose Tumoral alfa, RANK-L e Osteoprotegerina (OPG). Os dados obtidos serão analisados estatisticamente com os testes adequados para a amostra.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) associada à cirurgia de acesso para raspagem e alisamento radicular na descontaminação de bolsas periodontais em pacientes com Periodontite Crônica Avançada.

Objetivo Secundário:

1-Avaliar parâmetros clínicos (Índice de placa, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, mobilidade dentária, recessão gengival e nível de inserção clínica) antes e após a realização do procedimento cirúrgico + aplicação ou não da TFDa; 2-Avaliar os níveis de citocinas e marcadores do metabolismo ósseo antes e após a realização do procedimento cirúrgico + aplicação ou não da TFDa; 3-Avaliar a microbiota periodontopatogênica subgengival antes e após a realização do procedimento cirúrgico

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 732.109

+ aplicação ou não da TFDa

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O paciente terá os riscos inerentes à realização de qualquer cirurgia Periodontal, quais sejam desconforto, dor e edema pós-operatórios, os quais serão minimizados pela realização de técnicas cirúrgicas adequadas, medicação e instruções e acompanhamento pré e pós-operatórios por parte dos pesquisadores.

Benefícios:

Melhora na situação periodontal do paciente, pela realização dos tratamentos periodontais completos (não cirúrgicos e cirúrgicos), bem como um possível benefício extra ao grupo com associação da terapia fotodinâmica antimicrobiana à terapia cirúrgica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi apresentado com as devidas correções.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 168ª R.E. do CEP.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 732.109

RIBEIRÃO PRETO, 30 de Julho de 2014

Assinado por:

Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-0251 Fax: (16)3602-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

Anexo C - Comprovante de submissão do artigo científico em inglês para publicação em periódico internacional classificado como Qualis A1 no Sistema CAPES

Journal of Clinical Periodontology - PROOF

Effect of Surgical Periodontal Treatment Associated to Antimicrobial Photodynamic Therapy on Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial.

Journal:	<i>Journal of Clinical Periodontology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Randomized Clinical Trial
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Martins, Sérgio H.; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology Novaes Jr., Arthur; FORP-USP, CTBMF e Periodontia Taba, Mario, Jr; University of São Paulo, Department of Oral Surgery and Periodontology Palioto, Daniela; University of São Paulo, Department of Oral Surgery and Periodontology Messora, Michel; University of São Paulo, Department of Oral Surgery and Periodontology Reino, Danilo; FORP-USP, CTBMF e Periodontia Souza, Sergio; University of São Paulo, Department of Oral Surgery and Periodontology
Topic:	Treatment
Keywords:	Periodontal disease, Periodontal surgery, Chronic periodontitis, Antimicrobial photodynamic therapy
Main Methodology:	Clinical Trial

SCHOLARONE™
Manuscripts

Journal of Clinical Periodontology - PROOF

Anexo D - Artigo científico para submissão no periódico *Journal of Clinical Periodontology*.

Effect of Surgical Periodontal Treatment Associated to Antimicrobial Photodynamic Therapy on Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial.

Sérgio H. L. Martins¹, Arthur B. Novaes Jr.¹, Mario Taba Jr.¹, Daniela B. Palioto¹, Michel R. Messoria¹, Danilo M. Reino¹, Sérgio L. S. Souza¹

¹Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

Running title: aPDT in surgical treatment of Periodontitis.

Keywords: Chronic Periodontitis; Antimicrobial Photodynamic Therapy; Photosensitizing; Microbiology; Surgical Treatment.

Correspondence address

Prof. Dr. Sérgio L. Scombatti de Souza

Telephone: +55 16 3315 4141

Av. Cafe, s/n – FORP-USP, 14040-904, Ribeirao Preto - SP, Brazil

E-mail: scombatti@forp.usp.br

Conflict of Interest and Sources of Funding Statement

The authors declare to have no conflicts of interest in this study. This study was financially supported by the Sao Paulo Research Foundation – FAPESP (protocol number 14/09801-9).

Abstract

Aim: This randomized controlled clinical trial evaluated the effects of an adjunctive single application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in Surgical Periodontal Treatment (ST) in patients with severe chronic periodontitis (SCP).

Material and Methods: In a split-mouth design, 20 patients with SCP were treated with aPDT+ST (Test Group, TG) or ST only (Control Group, CG). aPDT was applied in a single episode, using a diode laser and a phenothiazine photosensitizer. All patients were monitored until 90 days after surgical therapy. Levels of 40 subgingival species were measured by checkerboard DNA-DNA hybridization at baseline, 30 and 90 days after surgery. Clinical and microbiological parameters were evaluated.

Results: In deep periodontal pockets, Test Group presented a significantly higher decrease in PPD than Control Group at 90 days after surgical therapy ($p<0.05$). Test Group also demonstrated significantly less periodontal pathogens of red complex (*Treponema denticola*) ($p<0.05$).

Conclusion: A single episode of aPDT adjunctive to SRP in the surgical treatment of SCP: i) significantly improved clinical periodontal parameters, reducing the need for

further treatment; ii) eliminates periodontal pathogens of the red complex more effectively (NCT02734784).

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: Patients with severe chronic periodontitis (SCP) may present continuous periodontal attachment loss after non-surgical therapy with scaling and root planning (SRP). Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) has emerged as an adjuvant method to SRP in the treatment of SCP.

Principal findings: Single episode of aPDT adjunctive to surgical treatment of SCP significantly improves clinical periodontal parameters and eliminates periodontal pathogens more effectively.

Practical implications: aPDT can be an alternative to the use of systemic antibiotics in the treatment of advanced forms of periodontal diseases unresponsive to conventional therapy (SRP).

Introduction

Chronic periodontitis is an infectious disease resulting in inflammation within the supporting tissues of the teeth, progressive attachment and bone loss and is characterized by pocket formation and/ or gingival recession (2002). Periodontal pockets, a unique environment for colonizing microorganisms, contains at least 400 species of bacteria, which are organized in biofilms (Paster and Dewhirst, 2009). The subgingival biofilm differs markedly in periodontal health and in periodontitis (Slots, 1979). Thus, treatment modalities aimed at biofilm control are essential for the treatment of periodontitis (Baker, 1995).

Scaling and root planing (SRP) is the most common periodontal treatment which has proven clinical effectiveness in terms of reducing inflammation, decreasing the probing pocket depth and improving the clinical attachment level (CAL) (Haffajee et al., 1997). SRP has some limitations, such as difficulties in accessing deeper pockets, furcation areas and root concavities (Nagarakanti et al., 2015, Rabbani et al., 1981) and difficulty to remove microbial pathogens that have penetrated into dentinal tubules and which are residing in lacunae and concavities (Mombelli et al., 2011).

The limitations of SRP become more evident particularly if the disease has led to the formation of pockets deeper than 5 mm around the affected teeth (Badersten et al., 1987, Caffesse et al., 1986, Rabbani et al., 1981). To facilitate scaling and root planing, and to allow direct visual control in deep pockets, the soft tissues can be detached surgically for better access (Deas et al., 2016).

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is becoming an effective method of antibacterial treatment and may be used as adjunct therapy for the treatment of severe periodontitis (de Oliveira et al., 2007a). aPDT has been evaluated in *in vitro* and *in vivo* studies (Sarkar and Wilson, 1993, Komerik et al., 2000, Komerik et al., 2003, de Oliveira et al., 2007b, Qin et al., 2008b, Chondros et al., 2009, Betsy et al., 2014, Carvalho et al., 2015, Moreira et al., 2015, Ramos et al., 2016). This therapy presents the principle of eliminating cells through the use of a photosensitizing agent (optical absorption-dye) and a light source (low-intensity laser with the appropriate wavelength). It may thus promote the elimination of microorganisms present in periodontal tissues (Novaes et al., 2012, Qin et al., 2008b, Petelin et al., 2015).

The use of aPDT presents divergent results on the non-surgical treatments of chronic periodontitis. Some authors achieved better clinical outcomes in favour of aPDT

(Braun et al., 2008, Andersen et al., 2007, Birang et al., 2015, Berakdar et al., 2012), while others only presented differences on bleeding on probing (Christodoulides et al., 2008, Chondros et al., 2009) and a significant reduction in the percentage of sites positive for periodontal pathogenic bacteria (Theodoro et al., 2012). On the other hand, some studies failed to show an additional benefit of aPDT on clinical periodontal parameters and subgingival microbial flora (Polansky et al., 2009, Balata et al., 2013).

The aim of this study was to evaluate the effects of single application of aPDT associated with Surgical Periodontal Treatment (ST) or ST alone in patients with severe chronic periodontitis (SCP) following surgical treatment.

Materials and Methods

Subject population

Twenty subjects were selected from the population referred to the Periodontal Clinic of the University. Subjects who fulfilled the inclusion criteria were invited to participate in the study (*ClinicalTrials.gov* ID: NCT02734784). All eligible subjects signed an Informed Consent Term. The study protocol was evaluated and approved by the Human Research Ethics Committee of the institution (protocol number 26497414.8.0000.5419).

Sample size calculation

The patient was considered the study unit. The sample size was determined to provide 80% power, in order to recognize a significant difference of 1 mm between groups with a 95% confidence interval ($\alpha=0.05$) and intragroup standard deviation of 2 mm (Novaes et al., 2012) considering the changes in probing pocket depth (PPD) as the primary outcome variable. A sample size of 18 patients was required. However, considering that some patients may be lost during follow-up, the number of subjects enrolled in this study was 20.

Inclusion and exclusion criteria

All subjects were diagnosed with generalized SCP (Armitage, 1999). The inclusion criteria were: i) good general health; ii) generalized interproximal attachment loss involving at least 2 posterior sextants with probing depth (PD) ≥ 5 mm, (iii) surgical access therapy indicated for at least two subsequent contralateral sextants. In addition, other inclusion criteria were adopted: i) age ≥ 35 years; ii) Posterior contralateral teeth with proximal sites presenting probing pocket depth (PPD) and clinical attachment level (CAL) ≥ 5 mm; iii) bleeding on probing.

The exclusion criteria were: subgingival periodontal therapy or antibiotic treatment in the previous 6 months, systemic diseases that could affect the progression of PD, extensive prosthetic involvement, need of antibiotic coverage for routine dental therapy, long-term administration of anti-inflammatory medication, smoking and pregnancy.

Experimental design, allocation concealment and treatment protocol

Before the study began, the subjects received full-mouth supragingival scaling and instructions on proper home-care techniques. Posterior contralateral teeth with proximal sites presenting PPD and CAL $\geq$ 5mm were selected for the clinical and microbiological evaluations. According to a predefined balanced block randomization table with a 1:1 allocation, each pair of teeth selected was randomly assigned to the following treatments: Flap debridement (Control Group) or Flap debridement associated to a single application of aPDT (Test Group).

An investigator not involved in data collection and treatment performed the enrolment of patients and their assignments into interventions. Sealed non-transparent envelopes were used for allocation concealment and opened just before the interventions. A single trained operator, who was masked to clinical examinations and data collection, undertook the adjunctive treatment. Patients did not receive any information regarding the type of adjunctive treatment performed in each tooth. All study personnel, including biostatistician and examiner, were blinded to the treatment assignment. The designation of the groups was revealed only after the statistical analysis.

In both groups, weekly sessions of SRP were performed using both hand instruments and ultrasonic device, during 30 days. SRP was conducted by one trained periodontist who was not informed about the treatment allocation. 30 days after SRP procedures Test Group received flap debridement associated to aPDT protocol, as follows: application of phenothiazine chloride solution 10 mg/ml (Helbo Blue[®], Bredent Medical GmbH & Co, Germany), apico-coronally irrigation of the surgical site, 5 minutes of pre-irradiation time (Qin et al., 2008a, Qin et al., 2008b), followed by irrigation with saline solution (approximately 1 ml per tooth) and irradiation with a red laser (HELBO[®] TheraLite Laser, Bredent Medical GmbH & Co, Germany) for 10 seconds at each site (70 mW of power, and a power density of 28mW/cm²), with an optic fiber angulated 60°, 0.06 mm diameter, 8 mm length, delivering a total energy of 2.79J/cm² per site (16.72 J/ cm² per tooth). The flap was then repositioned and sutured (Figure 4). A simulation of aPDT (Sham procedure) was performed simultaneously in

contralateral teeth (Control Group) (Figure 5). The sutures were removed after 7 days. Patients from both groups received dental prophylaxis monthly until the third month. All subjects were monitored for more 90 days after the surgical procedures.

Examiner calibration

All clinical parameters were measured by a single calibrated examiner. At two separate sessions 48 hours apart, duplicate measurements of PPD and CAL were obtained from ten patients who were not related to this study and presented at least two pairs of contralateral multiple rooted teeth with PPD ≥ 5 mm in proximal sites. Calibration was accepted if percentage agreement between measurements was more than 90%.

Clinical measurements

Clinical parameters were recorded at baseline, 30 and 90 days after the surgical procedures. Plaque index (PI) (O'Leary et al., 1972) was employed to assess the oral hygiene status of the patients. Bleeding on probing (BOP) (Ainamo and Bay, 1976) was recorded based on the presence or absence of bleeding up to 30 seconds after probing at the experimental sites. PI and BOP were scored as plaque and bleeding being absent or present (0 or 1, respectively). PPD was measured from the free gingival margin to the bottom of periodontal pocket. CAL was measured from the cemento-enamel junction to the base of periodontal pocket. Gingival recession (GR) was measured from the cemento-enamel junction to the free gingival margin. BOP, PPD, CAL and GR were measured at six sites per tooth (mesio- buccal, buccal, disto- buccal, disto-lingual, lingual and mesio-lingual). All probing measurements were performed using an automated periodontal probe (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA).

Microbiological monitoring

Subgingival plaque samples were collected at baseline, 30 and 90 days post-surgical procedure from interproximal sites. Supragingival plaque was removed and subgingival samples were collected with individual sterile Gracey curettes (#11-12; #13-14) and immediately placed in separate Eppendorf tubes containing 0.15 ml of buffer solution (10mM Tris- HCl, 1mM EDTA, pH 7.6). One hundred microliters of 0.5M NaOH were added to each tube and the samples were dispersed using a vortex mixer. Counts of 40 bacterial species were performed in each sample, using the checkerboard DNA–DNA hybridization technique (Socransky et al., 1994, Matarazzo

et al., 2008) as previously described (Mestnik et al., 2012). A total of 240 samples were analyzed.

Outcome variables

Changes in the mean PPD at 90 days post-surgical procedure were defined as the primary outcome variable of the study. Secondary outcome variables were differences between groups in the following parameters: CAL, GR, PI, BOP, counts and proportions of the 40 bacterial species analyzed, numbers of patients requiring additional periodontal treatment, number of residual periodontal pockets and number of patients classified as low, moderate or high risk for PD progression at 90 days post-surgical procedure.

“Risk for PD progression” was defined at a patient level according to Lang and Tonetti (2003), as low (≤ 4 sites with $\text{PPD} \geq 5\text{mm}$), moderate (5–8 sites with $\text{PPD} \geq 5\text{mm}$) or high (≥ 9 sites with $\text{PPD} \geq 5\text{mm}$). The “need for additional periodontal treatment” was determined according to Cionca et al., 2009: a patient was considered in need for additional periodontal treatment if at least one tooth presented a site with $\text{PPD} \geq 5\text{ mm}$ and positive BOP.

Statistical analysis

Data were analyzed using statistical software (SPSS Inc.). The primary outcome measures were the differences between groups for changes in PPD. Secondary outcome measures included CAL, REC, percentage of positive clinical endpoint (pockets with final $\text{PPD} < 4\text{ mm}$) and counts and proportions of the 40 bacterial species analyzed.

The Lilliefors normality test was applied for all variables studied and the results showed necessity of non-parametric tests. The intergroup analysis for bleeding on probing, plaque index, and desired clinical endpoint (pockets that reached 3 mm PPD, or less, after treatment) were performed using Friedman test. Mann–Whitney test was used for intergroup analysis of stratified periodontal pockets, reductions above 2 mm, clinical attachment level and gingival recessions.

Microbiological data were presented as mean counts of individual bacterial species in both groups. Bacterial species were also grouped into complexes, according to (Socransky et al., 1998). Wilcoxon Test was used to detect significant differences within each group for mean counts of individual bacterial species. Analyses were performed after adjustments for multiple comparisons (Socransky et al., 1991).

Significance of differences between groups as well as changes within each group for mean proportions of microbial complexes were determined using Paired t-Test.

Results

Figure 1 presents the flow chart of the study design. All subjects successfully completed the study. The postoperative healing was uneventful in all cases.

Clinical monitoring

Means and standard deviations of PPD, CAL and GR are presented in Table 1. Absolute and relative frequencies of PI and BOP are presented in Table 2. No significant differences were observed between groups at baseline. All therapies led to a decrease in mean values of CAL, GR, PI and BOP (Table 1 and Table 2). Analyzing deep periodontal pockets, Test Group presented a statistically significantly higher reduction in PPD ($p < 0.05$) when compared to Control Group at 90 days after surgical therapy (Table 1). Gingival recession and Clinical Attachment Level showed no difference between groups on intergroup and intragroup analysis. Both groups showed no difference between risk for PD progression and need for additional periodontal treatment.

Microbiological monitoring

In general, subjects presented high counts of species of orange and red complexes bacteria at baseline. No significant differences were observed between groups in the mean counts and proportions of any of the tested species at baseline. Figure 2 demonstrates mean total counts of the 40 subgingival species evaluated. More species of orange and red complexes decreased in Test Group when compared to Control Group. Figure 3 shows changes in the proportions of microbial complexes at baseline, 30 and 90 days post-surgical procedure. Microbial profiles were affected by treatments, and the most beneficial changes were observed in subjects who received flap debridement associated with single application of aPDT: Test group showed a significant reduction in periodontal pathogens of the red complex (*T. denticola*), yellow complex (*S. mitis*), orange complex (*C. gracilis*) and significant increase in periodontal pathogens of the blue complex (*A. oris* and *A. gerencseriae*).

Discussion

Complete calculus removal is extremely difficult to perform, especially with the closed approach of scaling and root planing (Deas et al., 2016). In sites deeper than 5 mm, complete calculus removal was achieved only 11% of the time (Waerhaug,

1978): so, if the pocket depth is more than 5 mm, the chances of failure are so great that there is an indication for surgical pocket elimination or reduction.

Data from the present study indicated that aPDT in combination with flap debridement led to significant improvements in PPD over flap debridement alone. The improvement of adjunctive aPDT in PPD parameter is in line with outcomes of previous clinical studies (Christodoulides et al., 2008, Chondros et al., 2009). Braun et al. (2008) showed superior results in favor of aPDT in all evaluated parameters. On the other hand, other clinical studies have found that adjunctive aPDT may not significantly improve the clinical outcomes of non-surgical treatment of chronic periodontitis (Bassir et al., 2013, Ruhling et al., 2010, Polansky et al., 2009, Ge et al., 2011). Cappuyns et al., 2012, in a split-mouth randomized clinical trial, showed that the same improvement in the mean of BOP and PPD was achieved in three treatment modalities (SRP, aPDT and diode soft laser therapy) for treating patients affected by chronic periodontitis. Similarly, Monzavi et al. (2016), in one full-mouth double-blind randomized controlled clinical study, concluded that aPDT, as an adjunctive approach, yielded complete resolution of inflammation and significant reduction in periodontal pocket depth. However, the application of aPDT + SRP did not have any additional advantage in terms of clinical attachment gain and plaque score over conventional SRP. However it must be emphasized that the previous studies reported on the non-surgical therapy of chronic periodontitis.

The findings of the present study showed that flap debridement alone or flap debridement associated with a single application of aPDT resulted in similar gain in CAL, GR, PI and BOP, with no significant differences between groups. This observation is in agreement with the results of other clinical studies, which did not confirm statistically significant difference in CAL, GR, PI or BOP gain between SRP + aPDT and SRP alone for non-surgical treatment of periodontitis (Ramos et al., 2016, Theodoro et al., 2012, Bassir et al., 2013, Ruhling et al., 2010, Polansky et al., 2009, Ge et al., 2011, Chondros et al., 2009). In contrast, some clinical studies have supported the efficacy of aPDT in CAL, GR, PI or BOP (Moreira et al., 2015, Alwaeli et al., 2015, Giannelli et al., 2012, Berakdar et al., 2012).

The benefits of aPDT are more evident in cases of advanced periodontitis. Furcations, deep invaginations and root concavities are difficult to access with hand instruments (Wasserman and Hirschfeld, 1988, Waerhaug, 1978). The use of aPDT, however, is not affected by this problem, as it can easily irradiate those inaccessible places.

Another problem with conventional therapy is the increase of bacterial resistance to antibiotics, whereas aPDT, using reactive oxygen species to kill bacteria in a short time, is highly unlikely to cause bacterial resistance (Wilson, 2004, Crispino et al., 2015).

The aforementioned studies had used the same photosensitizer that was used in the present study (phenothiazine chloride 10mg/ml) and the protocols consisted on irrigation of the pocket and a pre-irradiation time ranging 1 to 3 minutes, followed by irrigation with saline solution and red laser application for 10 seconds per site. On the present study, a pre irradiation time of 5 minutes was used, in accordance to a previous publication that considered it the optimal preirradiation time (Qin et al., 2008a).

The clinical results observed in the present study may be supported by microbiological findings. Test Group presented significant reduced proportions of the orange complex bacteria and *T. denticola* (90 days) when compared to Control Group, and there was also a reduction of the red complex in both groups from baseline to post-operative periods. Periodontal sites that present elevated counts of red-complex bacteria have a higher risk for attachment loss (Hamlet et al., 2004) and a greater severity and progression of PD (Chen et al., 2005, Silva-Senem et al., 2013).

The percentage of host-compatible species was also affected by aPDT in the present study. Besides the reduction of periodontal pathogens, an increase of beneficial species is important for successful periodontal treatment (Teles et al., 2012). In the present study, the increase in the proportion of blue complex species observed in the Test Group and Control Group after 90 days was similar to that obtained by Mestnik et al., 2012, when systemic antimicrobials were associated with SRP.

An important point to be discussed is the influence of supragingival biofilm control for maintaining periodontal health. Previous studies indicated that the performance of periodontal supportive therapy every 3 months would be sufficient to maintain the results of periodontal therapy. Patients in the present study were controlled weekly and monthly until completion of the revaluation period (Ramfjord, 1993, Ramfjord, 1987, Lindhe and Nyman, 1987, Axelsson et al., 2004). Thus, control of supragingival biofilm was certainly important to the stability of the results in all groups during the postoperative period.

Until now, the present study is the first to evaluate the clinical and microbiological effects of aPDT as an adjunct to periodontal surgical treatment of Severe Chronic

Periodontitis. A limitation of this study is the impossibility of carrying out microbiological collection at 30 days after surgery, because it would be detrimental to periodontal healing. It would be interesting in future studies a longer follow up of patients in order to ascertain whether combination therapy can sustain the changes obtained in clinical and microbiological parameters in the long term, thus verifying how long it generates beneficial effect. In addition, a model with multiple applications aPDT before, during and after surgery may improve clinical and microbiological outcomes achieved in this study.

Conclusion

The single application of aPDT as adjunctive to flap debridement in patients with SCP was able to significantly reduce PPD 90 days after surgery, minimizing the need for additional periodontal treatments. Adjunctive aPDT was also able to significantly reduce levels of bacteria in subgingival plaque samples analyzed 90 days after treatment. The use of aPDT adjunct to surgical periodontal treatment in sites with deep pockets is a clinical option to be considered.

References

(2002) Position paper: American Academy of Periodontology's guidelines for periodontal therapy. *Dent Today* **21**, 32.

Ainamo, J. & Bay, I. (1976) [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet* **80**, 149-152.

Alwaeli, H. A., Al-Khateeb, S. N. & Al-Sadi, A. (2015) Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci* **30**, 801-807. doi:10.1007/s10103-013-1426-y.

Andersen, R., Loebel, N., Hammond, D. & Wilson, M. (2007) Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* **18**, 34-38.

Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1.

Axelsson, P., Nystrom, B. & Lindhe, J. (2004) The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol* **31**, 749-757. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00563.x.

Badersten, A., Nilveus, R. & Egelberg, J. (1987) Effect of nonsurgical periodontal therapy (VIII). Probing attachment changes related to clinical characteristics. *J Clin Periodontol* **14**, 425-432.

Baker, K. A. (1995) The role of dental professionals and the patient in plaque control. *Periodontol 2000* **8**, 108-113.

Balata, M. L., Andrade, L. P., Santos, D. B., Cavalcanti, A. N., Tunes Uda, R., Ribeiro Edel, P. & Bittencourt, S. (2013) Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci* **21**, 208-214. doi:10.1590/1678-7757201302366.

Bassir, S. H., Moslemi, N., Jamali, R., Mashmouly, S., Fekrazad, R., Chiniforush, N., Shamshiri, A. R. & Nowzari, H. (2013) Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **40**, 65-72. doi:10.1111/jcpe.12024.

Berakdar, M., Callaway, A., Eddin, M. F., Ross, A. & Willershausen, B. (2012) Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head Face Med* **8**, 12. doi:10.1186/1746-160X-8-12.

Betsy, J., Prasanth, C. S., Baiju, K. V., Prasanthila, J. & Subhash, N. (2014) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **41**, 573-581. doi:10.1111/jcpe.12249.

Birang, R., Shahaboui, M., Kiani, S., Shadmehr, E. & Naghsh, N. (2015) Effect of Nonsurgical Periodontal Treatment Combined With Diode Laser or

- Photodynamic Therapy on Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Split-Mouth Clinical Trial. *J Lasers Med Sci* **6**, 112-119. doi:10.15171/jlms.2015.04.
- Braun, A., Dehn, C., Krause, F. & Jepsen, S. (2008) Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **35**, 877-884. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01303.x.
- Caffesse, R. G., Sweeney, P. L. & Smith, B. A. (1986) Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *J Clin Periodontol* **13**, 205-210.
- Cappuyns, I., Cionca, N., Wick, P., Giannopoulou, C. & Mombelli, A. (2012) Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* **27**, 979-986. doi:10.1007/s10103-011-1027-6.
- Carvalho, V. F., Andrade, P. V., Rodrigues, M. F., Hirata, M. H., Hirata, R. D., Pannuti, C. M., De Micheli, G. & Conde, M. C. (2015) Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal patients: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. doi:10.1111/jcpe.12393.
- Chen, L. L., Wu, Y. M., Yan, J., Sun, W. L., Sun, Y. Z. & Ojcius, D. (2005) Association between coinfection of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* and periodontal tissue destruction in chronic periodontitis. *Chin Med J (Engl)* **118**, 915-921.
- Chondros, P., Nikolidakis, D., Christodoulides, N., Rossler, R., Gutknecht, N. & Sculean, A. (2009) Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* **24**, 681-688. doi:10.1007/s10103-008-0565-z.
- Christodoulides, N., Nikolidakis, D., Chondros, P., Becker, J., Schwarz, F., Rossler, R. & Sculean, A. (2008) Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* **79**, 1638-1644. doi:10.1902/jop.2008.070652.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. (2009) Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *J Periodontol* **80**, 364-371. doi:10.1902/jop.2009.080540.
- Crispino, A., Figliuzzi, M. M., Iovane, C., Del Giudice, T., Lomanno, S., Pacifico, D., Fortunato, L. & Del Giudice, R. (2015) Effectiveness of a diode laser in addition to non-surgical periodontal therapy: study of intervention. *Ann Stomatol (Roma)* **6**, 15-20.
- de Oliveira, R. R., Novaes, A. B., Jr., Taba, M., Jr., de Souza, S. L. & Papalexiou, V. (2007a) The effect of bone condensation and crestal preparation on the bone response to implants designed for immediate loading: a histomorphometric study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* **22**, 63-71.
- de Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B., Jr. & Taba, M., Jr. (2007b) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* **78**, 965-973. doi:10.1902/jop.2007.060494.

- Deas, D. E., Moritz, A. J., Sagun, R. S., Jr., Gruwell, S. F. & Powell, C. A. (2016) Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol 2000* **71**, 128-139. doi:10.1111/prd.12114.
- Ge, L., Shu, R., Li, Y., Li, C., Luo, L., Song, Z., Xie, Y. & Liu, D. (2011) Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg* **29**, 33-37. doi:10.1089/pho.2009.2727.
- Giannelli, M., Formigli, L., Lorenzini, L. & Bani, D. (2012) Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol* **39**, 962-970. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01925.x.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1997) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **24**, 324-334.
- Hamlet, S., Ellwood, R., Cullinan, M., Worthington, H., Palmer, J., Bird, P., Narayanan, D., Davies, R. & Seymour, G. (2004) Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res* **83**, 232-235.
- Komerik, N., Nakanishi, H., MacRobert, A. J., Henderson, B., Speight, P. & Wilson, M. (2003) In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 932-940.
- Komerik, N., Wilson, M. & Poole, S. (2000) The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* **72**, 676-680.
- Lang, N. P. & Tonetti, M. S. (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent* **1**, 7-16.
- Lindhe, J. & Nyman, S. (1987) Clinical trials in periodontal therapy. *J Periodontal Res* **22**, 217-221.
- Matarazzo, F., Figueiredo, L. C., Cruz, S. E., Faveri, M. & Feres, M. (2008) Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* **35**, 885-896. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01304.x.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Soares, G., Teles, R. P., Fermiano, D., Duarte, P. M. & Faveri, M. (2012) The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **39**, 955-961. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01932.x.
- Mombelli, A., Cionca, N. & Almaghlouth, A. (2011) Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery? *Periodontol 2000* **55**, 205-216. doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00356.x.

- Monzavi, A., Chinipardaz, Z., Mousavi, M., Fekrazad, R., Moslemi, N., Azaripour, A., Bagherpasand, O. & Chiniforush, N. (2016) Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.02.007.
- Moreira, A. L., Novaes, A. B., Jr., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B., de Oliveira, P. G., Casati, M. Z., Casarin, R. C. & Messoria, M. R. (2015) Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* **86**, 376-386. doi:10.1902/jop.2014.140392.
- Nagarakanti, S., Gunupati, S., Chava, V. K. & Reddy, B. V. (2015) Effectiveness of Subgingival Irrigation as an Adjunct to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Systematic Review. *J Clin Diagn Res* **9**, ZE06-09. doi:10.7860/JCDR/2015/13862.6210.
- Novaes, A. B., Jr., Schwartz-Filho, H. O., de Oliveira, R. R., Feres, M., Sato, S. & Figueiredo, L. C. (2012) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci* **27**, 389-395. doi:10.1007/s10103-011-0901-6.
- O'Leary, T. J., Drake, R. B. & Naylor, J. E. (1972) The plaque control record. *J Periodontol* **43**, 38. doi:10.1902/jop.1972.43.1.38.
- Paster, B. J. & Dewhirst, F. E. (2009) Molecular microbial diagnosis. *Periodontol 2000* **51**, 38-44. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00316.x.
- Petelin, M., Perkic, K., Seme, K. & Gaspiric, B. (2015) Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci* **30**, 1647-1656. doi:10.1007/s10103-014-1632-2.
- Polansky, R., Haas, M., Heschl, A. & Wimmer, G. (2009) Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* **36**, 575-580.
- Qin, Y., Luan, X., Bi, L., He, G., Bai, X., Zhou, C. & Zhang, Z. (2008a) Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci* **23**, 49-54. doi:10.1007/s10103-007-0454-x.
- Qin, Y. L., Luan, X. L., Bi, L. J., Sheng, Y. Q., Zhou, C. N. & Zhang, Z. G. (2008b) Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res* **43**, 162-167. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01007.x.
- Rabbani, G. M., Ash, M. M., Jr. & Caffesse, R. G. (1981) The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. *J Periodontol* **52**, 119-123. doi:10.1902/jop.1981.52.3.119.
- Ramfjord, S. P. (1987) Maintenance care for treated periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **14**, 433-437.
- Ramfjord, S. P. (1993) Maintenance care and supportive periodontal therapy. *Quintessence Int* **24**, 465-471.

- Ramos, U. D., Ayub, L. G., Reino, D. M., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B. & Novaes, A. B., Jr. (2016) Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. *J Clin Periodontol* **43**, 147-155. doi:10.1111/jcpe.12498.
- Ruhling, A., Fanghanel, J., Houshmand, M., Kuhr, A., Meisel, P., Schwahn, C. & Kocher, T. (2010) Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. *Clin Oral Investig* **14**, 637-644. doi:10.1007/s00784-009-0347-4.
- Sarkar, S. & Wilson, M. (1993) Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res* **28**, 204-210.
- Silva-Senem, M. X., Heller, D., Varela, V. M., Torres, M. C., Feres-Filho, E. J. & Colombo, A. P. (2013) Clinical and microbiological effects of systemic antimicrobials combined to an anti-infective mechanical debridement for the management of aggressive periodontitis: a 12-month randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* **40**, 242-251. doi:10.1111/jcpe.12052.
- Slots, J. (1979) Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* **6**, 351-382.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-144.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C. & Dibart, S. (1991) Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* **18**, 766-775.
- Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17**, 788-792.
- Teles, F. R., Teles, R. P., Uzel, N. G., Song, X. Q., Torresyap, G., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2012) Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontol Res* **47**, 95-104. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01409.x.
- Theodoro, L. H., Silva, S. P., Pires, J. R., Soares, G. H., Pontes, A. E., Zuza, E. P., Spolidorio, D. M., de Toledo, B. E. & Garcia, V. G. (2012) Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci* **27**, 687-693. doi:10.1007/s10103-011-0942-x.
- Waerhaug, J. (1978) Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *J Periodontol* **49**, 119-134. doi:10.1902/jop.1978.49.3.119.
- Wasserman, B. & Hirschfeld, L. (1988) The relationship of initial clinical parameters to the long-term response in 112 cases of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **15**, 38-42.

Wilson, M. (2004) Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 412-418. doi:10.1039/b211266c.

Figure Legends

Figure 1 – Study flowchart diagram explaining the clinical trial.

Figure 2 – Mean counts of 40 bacterial species in Control and Test groups at baseline, 30 and 90 days post-surgery, and results of intragroup comparisons. The species were ordered according to the microbial complexes described by Socransky et al. (1998). The results were adjusted for multiple comparisons. Statistically significant differences when compared to baseline: (*) Control Group – 30 days; (Ψ) Test Group – 30 days; (Σ) Control Group - 90 days; (Φ) Test Group - 90 days. Statistically significant differences when compared to T2: (†) Control Group – 90 days; (Ω) Group Test – 90 days.

Figure 3 – Pie charts of the mean proportions of each microbial complex at baseline, 30 and 90 days post-surgery in Test and Control groups. The colors represent different microbial complexes (Socransky et al. 1998). ¶Significant difference when compared to baseline; *Significant difference between groups in the same period of analysis. Paired t-test ($p < 0.05$).

Figure 4 - Surgical Therapy - Control Group: A) First molar; B) Preoperative probing showing $PPD \geq 5$ mm; C) Intra-sulcular incision; D) Mucoperiosteal flap E) Scaling and root planing; F) Nylon 5.0 sutures.

Figure 5 - Surgical Therapy - Test Group: A) First molar; B) Preoperative probing showing $PPD \geq 5.5$ mm; C) Intra-sulcular incision; D) Mucoperiosteal flap E) photosensitizer hydrochloride phenothiazine (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems) application at a concentration of 10mg / ml - Test Group; F) Activation of laser diode (670 nm, 75 mW, $0.25 \text{ W} / \text{cm}^2$, $2.49 \text{ J} / \text{cm}^2$, 10 sec per point); G) Nylon 5.0 sutures.

Table 1 – Means and standard deviations of PPD, CAL and GR in Test and Control groups at baseline, 30 and 90 days after surgical therapy, and the results of intra and intergroup comparisons.

Variable	Periods	Experimental Groups		Intergroup comparisons (Paired t Test)		
		Control (N=20)	Test (N=20)	Mean difference	CI 95%	<i>p</i> value
PPD (mm)	Baseline	5.70±0.53	5.63±0.45	0,075	-0.2942 to 0.4442	NS
	+ 30	5.70±0.50*	5.60±0.50*	0,075	-0.2942 to 0.4442	NS
	+ 90	3.40±0.50*	2.70±0.30*	0,7	0.3884 to 1.0116	< 0.0001
CAL (mm)	Baseline	6.18±0.74	6.05±0.82	0,125	-0.4946 to 0.7446	NS
	+ 30	6.30±0.69*	6.30±0.73*	0	-0.5486 to 0.5486	NS
	+ 90	4.18±0.66*	3.70±0.85*	0,475	-0.1201 to 1.0701	NS
GR (mm)	Baseline	0.48±0.53	0.43±0.73	0,05	-0.4732 to 0.5732	NS
	+ 30	0.60±0.51*	0.68±0.61*	-0,075	-0.4961 to 0.3461	NS
	+ 90	0.78±0.49*	1.00±0.60*	-0,225	-0.6624 to 0.2124	NS

PPD = probing pocket depth; CAL = clinical attachment level; GR = Gingival recession; SD = Standard deviation; CI = Confidence interval; NS = no significant difference; SRP = Scaling and root planing. *Significant difference when compared to baseline (repeated measures ANOVA, Bonferroni *post hoc* test. $p < 0.05$).

Table 2 – Absolute and relative frequencies for PI and BOP in Test and Control groups, and results of intra and intergroup comparisons.

Variable	Periods	Control (N=20)		Test (N=20)		Chi-Square Test	
		Number	(%)	Number	(%)	Relative risk	<i>p</i> value
PI	Baseline	35	87,5	31	78	1.00	NS
	+30	30	75	25	63	1.17	NS
	+90	19	47,5	13	33	0.87	NS
BOP	Baseline	33	82,5	33	83	1.13	NS
	+30	28	70	24	60	1.20	NS
	+90	13	32,5	25	50	1.46	NS

PI = Plaque index; BOP = Bleeding on probing; NS = no significant difference.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5