UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

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

ANDRÉ LUIS GOMES MOREIRA

PG-PERIO
FORP-USP

RIBEIRÃO PRETO

2014

ANDRÉ LUIS GOMES MOREIRA

Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento não cirúrgico da Periodontite Agressiva: 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).

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messoria

RIBEIRÃO PRETO

2014

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

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Moreira, André Luis Gomes.

Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento não cirúrgico da Periodontite Agressiva: um estudo clínico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego / André Luis Gomes Moreira ; orientador Michel Reis Messoria. - Ribeirão Preto, 2014.

119 f. : il.

Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2014.

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

MOREIRA, A. L. G. Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento não cirúrgico da Periodontite Agressiva: 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).

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José e Neuza,**

Por materializarem o amor em minha vida... Por terem me ensinado sólidos preceitos morais e éticos, os quais foram ferramentas essenciais para que eu chegasse até aqui... Por constituírem parte da minha motivação e vontade de seguir em frente... Estes que são o meu tesouro.

A minha irmã **Bárbara,**

Por ser meu porto seguro e fonte inesgotável de inspiração. Obrigado pela paciência, incentivo, força e principalmente pelo carinho.

A minha avó Francisca (*in memoriam*),

Pelo exemplo de fortaleza moral, fé e determinação. Com a senhora, eu aprendi o valor da fé, aprendi a refletir, duvidar e nunca encarar a realidade como pronta. Aqui aprendi a ver a vida de um jeito diferente.

AGRADECIMENTOS

Após tantos obstáculos superados ao longo desta jornada, com força de vontade, foco e perseverança, Eu consegui realizar este feito. No entanto, nada teria se concretizado se não fosse a existência de pessoas especiais que me ajudaram durante esta minha trajetória. Desta forma, agradeço:

À Deus e a **todos os espíritos de luz**, que me auxiliaram e me guiaram em cada uma das minhas escolhas.

À **minha família**, pais, irmã, primos e tios pelas vibrações positivas e apoio.

À **Jacira e família**, por todo apoio que me foi prestado durante a minha mudança para Ribeirão Preto. Seguramente, sem o seu auxílio tudo teria sido muito mais difícil.

Em especial, ao meu orientador, **Prof. Michel Reis Messora**, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional e pelos conhecimentos adquiridos durante o desenvolvimento deste e de muitos outros projetos. Desde o início, demonstrou confiança em minhas ideias e posições, sendo um dos grandes motores propulsores deste trabalho.

Ao coordenador do curso de Pós-graduação em Periodontia, **Prof. Arthur Belém Novaes Júnior**, pela oportunidade de ter aprendido um pouco mais de ciência.

Aos professores do curso de Periodontia, **Prof. Mário Taba Júnior**, **Prof. Sérgio Luís Scombatti de Souza** e **Profa. Daniela Palioto**, por tudo que aprendi durante esses anos de convívio.

Ao **Prof. Márcio Grisi**, pela oportunidade de conhecer novas tecnologias e novas formas de ensino, bem como por todo o conhecimento clínico cedido nestes anos de clínica na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

À minha amiga e dupla, **Paula Pessôa**, quem participou de todas as fases deste projeto, realizando etapas indispensáveis para que todos os dados necessários pudessem ser obtidos. Sua competência, dedicação e carinho foram essenciais nesta etapa da minha vida e serei grato para sempre por isso. Muito obrigado por existir em minha vida.

À **Patrícia Garani**, que foi mais do que uma companheira de pós-graduação, fiel e valiosa amiga que guardarei para sempre no canto mais nobre do meu coração.

Aos amigos e amigas das turmas de mestrado e doutorado: **Danilo Maeda, Cristine D’Almeida, Mariana Salles, Kelly Vargas, Túlio Pignaton, Felipe Santos, Gustavo Vieira, Umberto Ramos, Carolina Delmondes e Carolina Rego**. Companhias em todos os momentos... Amizades que ficarão distantes, mas serão reais. Obrigado pela troca de experiências, pelo convívio, pelas alegrias e incertezas... Obrigado por todos esses momentos vividos e partilhados juntos.

À **Patrícia Lucio**, que de forma especial e carinhosa me deu força, garra e coragem, apoiando-me nos momentos difíceis. Iluminou de maneira especial os meus pensamentos, levando-me a buscar mais conhecimentos.

Aos Amigos do MTG, **Antônio, Gabriel, Leo, Lucas, Felipe, Renato, Mauricio, Douglas, João e Tiago** pela amizade inesperada, pelos muitos momentos de risos e “besteirol”. Certamente, minha vida em Ribeirão Preto seria sem graça sem vocês.

Aos **pacientes** participantes, os quais permitiram que seus tratamentos fossem aplicados para o desenvolvimento científico.

À **Milla Tavares**, pelas longas conversas, risos e aprendizado laboratorial.

Aos meus primeiros alunos de iniciação científica **Ana Jovina, Caio guedes, Gustavo Carvalho e Jéssica DiPaula** por todos os momentos de trabalho e risos no biotério de animais pequenos. Saibam que aprendi muito com vocês.

À **Profa. Luciene Figueiredo**, à **Izilvânia Barros** e demais profissionais da Universidade de Guarulhos pela recepção e realização dos exames microbiológicos.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)** da Universidade de São Paulo e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

A **todos os professores** que contribuíram para minha formação.

A todos os funcionários da FORP, por todo carinho e disponibilidade, especialmente **Tatiana, Dulce, Daniela, Carla Daniela, Suely, Dona Laura, Isabel e Regiane**.

***NÃO IMPORTA QUÃO ESTREITO SEJA O PORTÃO,
QUÃO CARREGADO DE CASTIGOS O CAMINHO,
EU SOU O MESTRE DO MEU DESTINO;
EU SOU O CAPITÃO DA MINHA ALMA.***

NELSON MANDELA

RESUMO

RESUMO

MOREIRA, A. L. G. **Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento não cirúrgico da Periodontite Agressiva: um estudo clínico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego.** 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O tratamento da Periodontite Agressiva (PA) representa um desafio para os clínicos, pois não existem protocolos padronizados para um controle eficiente da doença. Este estudo clínico controlado, aleatório e duplo-cego avaliou o efeito de múltiplas aplicações da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) como adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico (TPnc) em pacientes diagnosticados com PA. Utilizando um modelo de estudo do tipo boca dividida, 20 pacientes com diagnóstico clínico de PA foram tratados com TFDa (Grupo Teste) associada à raspagem e alisamento radicular (RAR) ou apenas RAR (Grupo Controle). As aplicações da TFDa foram realizadas em 4 episódios (dias 0, 2, 7 e 14). Todos os pacientes foram acompanhados por 90 dias. Os seguintes parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos foram analisados: i) profundidade de bolsa à sondagem (PS) e nível de inserção clínico (NCI); ii) contagem de 40 espécies subgengivais em amostras de placa bacteriana (*checkerboard DNA-DNA hybridization*); iii) avaliação dos níveis de Interleucina (IL)-1 β , IL-10 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) no fluido crevicular gengival (Luminex). Os dados obtidos foram estatisticamente analisados. Na análise de bolsas periodontais profundas (PS inicial ≥ 7 mm), o Grupo Teste apresentou, aos 90 dias, redução de PS ($-3,96 \text{ mm} \pm 0,83$) e ganho de inserção clínica ($2,77 \text{ mm} \pm 1,05$) significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles do Grupo Controle (PS = $-2,56 \pm 0,72$; NCI = $1,75 \pm 1,07$). Foi constatado, também, um número significativamente menor de bolsas periodontais residuais (PS ≥ 5 mm) no Grupo Teste quando comparado ao Grupo Controle aos 90 dias ($p < 0,05$). Na análise microbiológica, o Grupo Teste apresentou proporções significativamente menores de espécies microbianas dos complexos vermelho e laranja, bem como maiores proporções de espécies do complexo azul quando comparado ao Grupo Controle aos 90 dias ($p < 0,05$). Na análise imunológica, observou-se níveis de IL-1 β no Grupo Controle significativamente maiores que aqueles do Grupo Teste aos 14, 30 e 90 dias ($p < 0,05$). Em relação aos níveis de IL-10, apenas o Grupo Teste apresentou valores significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles do baseline aos 30 dias. Para TNF- α , não foi possível observar diferenças significativas nas comparações inter e intragrupos em todos os períodos experimentais. O Grupo Teste apresentou razão IL-1 β /IL-10 significativamente menor que aquela do Grupo Controle aos 90 dias ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a utilização de aplicações múltiplas da TFDa como recurso adjuvante à TPnc de pacientes com PA: i) melhora significativamente os parâmetros clínicos periodontais, reduzindo a necessidade de tratamentos periodontais adicionais aos 90 dias; ii) elimina de forma mais eficaz periodontopatógenos dos complexos vermelho e laranja; iii) melhora os parâmetros imunoinflamatórios, reduzindo a concentração de citocinas proinflamatórias e aumentando os níveis de citocinas anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Periodontite agressiva; Terapia Fotodinâmica; Fotossensibilizantes.

ABSTRACT

ABSTRACT

MOREIRA, A. L. G. **Clinical, microbiological and immunological effects of antimicrobial Photodynamic Therapy on non-surgical treatment of Aggressive Periodontitis: a double-blind split-mouth randomized controlled clinical trial.** 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Treatment of Aggressive Periodontitis (AP) is challenging for clinicians because there are no standardized protocols for effective disease control. This double-blind randomized controlled clinical trial evaluated the effects of multiple applications of antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) as an adjunct to scaling and root planning (SRP) on patients diagnosed with AP. Using a split-mouth model, 20 patients with clinical diagnosis of AP were treated with aPDT associated with SRP (Test Group) or SRP alone (Control Group). aPDT applications were performed along with SRP and 2, 7 and 14 days after SRP. All patients were monitored during 90 days. The following clinical, microbiological and immunological parameters were analyzed: i) probing pocket depth (PPD) and clinical attachment level (CAL), ii) counts of 40 subgingival species in plaque samples (checkerboard DNA-DNA hybridization) and iii) levels of interleukin (IL)-1 β , IL-10 and tumor necrosis factor (TNF)- α in gingival crevicular fluid (Luminex). Data were statistically analyzed. In deep periodontal pockets (initial PPD $\geq$ 7 mm), the Test Group presented a decrease in PPD (-3.96 ± 0.83 mm) and a clinical attachment gain (2.77 ± 1.05 mm) significantly higher than the Control Group (PPD = -2.56 ± 0.72 mm; CAL = 1.75 ± 1.07 mm) at 90 days ($p < 0.05$). It was also observed significantly fewer residual periodontal pockets (PPD $\geq$ 5 mm) in the Test Group when compared to the Control Group at 90 days ($p < 0.05$). Regarding microbiological analysis, the Test Group presented proportions of red and orange complexes significantly lower and proportions of blue complex significantly higher than the Control Group at 90 days ($p < 0.05$). Immunological analysis demonstrated significantly lower levels of IL-1 β in the Control Group when compared to the Test Group at 14, 30 and 90 days ($p < 0.05$). Only the Test Group presented significantly higher IL-10 levels in relation to baseline values at 30 days ($p < 0.05$). Intra and inter-groups comparisons of the mean levels of TNF- α did not demonstrate significant differences. IL-1 β /IL-10 ratio was significantly lower in the Test Group than in the Control Group at 90 days ($p < 0.05$). It can be concluded that repeated aPDT as an adjunct to SRP in the non-surgical treatment of AP: i) significantly improves clinical periodontal parameters, reducing the need for further treatments at 90 days; ii) eliminates periodontal pathogens of red and orange complexes more effectively and iii) enhances the host immunoinflammatory response, decreasing the levels of proinflammatory cytokines and increasing the levels of anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Aggressive Periodontitis; Photodynamic Therapy; Photosensitizing.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Padrão consolidado para fluxograma de relato de ensaios clínicos.....	39
Figura 2 -	Delineamento experimental	40
Figura 3 -	A) Aplicação do fotossensibilizador cloridrato de fenotiazina (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems) na concentração de 10mg/mL - Grupo Teste; B) 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); C) Minilaser 2075 F (Helbo Photodynamic Systems) com sonda de fibra óptica de 0,6 mm de diâmetro (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems).....	49
Figura 4 -	Contagens médias (x 10 ⁵) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e em 30 e 90 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 – 30 dias; (†) Grupo Teste – 30 dias; (Ψ) Grupo Controle - 90 dias; (Φ) Grupo Teste - 90 dias. Teste de Wilcoxon ($p < 0,0012$ para espécies orais e $p < 0,002$ para espécies não orais)	58
Figura 5 -	Frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos no diferentes períodos experimentais em bolsa periodontais moderadas. A cor verde claro caracteriza a proporção individual do <i>A. actinomycetemcomitans</i> . ¶ diferença significativa quando comparado aos valores do <i>baseline</i> no mesmo grupo experimental (Teste t pareado, $p < 0,05$); * diferença significativa entre os grupos em um mesmo período experimental (Teste t pareado, $p < 0,05$)	59

Figura 6 - Frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos no diferentes períodos experimentais em bolsa periodontais profundas A cor verde claro caracteriza a proporção individual do *A. actinomycetemcomitans*. ¶ 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, $p < 0,05$) 60

Figura 7 - Níveis médios (pg/mL) e desvios-padrão de IL-1 β , IL-10 e TNF- α para os grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais em bolsas periodontais moderadas (A,C e F) e profundas (B, D e F). Em G e H pode ser observada a razão IL-1 β /IL-10 encontrada em ambos os grupos para bolsas moderadas e profundas, respectivamente. (*) Diferença significativa quando comparado ao *baseline* ($p < 0,05$); (¥) Diferença significativa entre os grupos Controle e Teste em um mesmo período de análise ($p < 0,05$) 63

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	45
Tabela 2 -	Características demográficas dos pacientes e grupos experimentais no <i>baseline</i>	53
Tabela 3 -	Médias e desvios-padrão de PS, NCI e RG para os grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais em bolsas periodontais moderadas e profundas, bem como os resultados das comparações intra e inter-grupos.....	54
Tabela 4 -	Frequências absolutas e relativas de sítios com placa e sangramento à sondagem para os grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais, bem como os resultados das comparações intra e inter-grupos.....	55
Tabela 5 -	Frequências absolutas e relativas para as variáveis “bolsas residuais”, “necessidade cirúrgica” e “risco de progressão da doença” nos grupos Controle e Teste aos 90 dias pós-operatórios, bem como os resultados das comparações inter-grupos.....	56

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
ELISA	Imunoensaio enzimático
FCG	Fluido crevicular gengival
<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
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1-beta
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
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
RANK-L	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-beta
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
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TPNC	Terapia Periodontal Não Cirúrgica
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
UNG	Universidade de Guarulhos
USP	Universidade de São Paulo
W/cm ²	Watt/centímetro ao quadrado
μ g	Micrograma
μ g/mL	Micrograma/mililitro
μ L	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Por cento
>	Maior
≥	Maior ou igual
=	Igual
≤	Menor ou igual
<	Menor
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>g</i>	Unidade de aceleração
H ₂	Hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
M	Concentração molar
<i>n</i>	Tamanho da amostra
N ₂	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
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.....	83
Anexo B -	Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	86
Anexo C -	Comprovante de submissão do artigo científico em inglês para publicação em periódico internacional classificado como Qualis A1 no Sistema CAPES	87
Anexo D -	Artigo científico submetido para publicação no periódico <i>Journal of Clinical Periodontology</i>	88

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	28
PROPOSIÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Consentimento para a pesquisa.....	38
3.2 Cálculo do tamanho da amostra.....	38
3.3 Seleção dos pacientes.....	38
3.4 Delineamento do estudo.....	40
3.5 Monitoramento clínico.....	41
3.6 Calibração do examinador	42
3.7 Monitoramento imunológico	42
3.8 Monitoramento microbiológico	43
3.8.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	44
3.8.2 Checkerboard DNA-DNA Hybridization	45
3.9 Variáveis de resultado.....	47
3.10 Terapia Periodontal Não Cirúrgica (TPNC).....	48
3.11 Protocolo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa).....	48
3.12 Análise estatística	50
3.12.1 Parâmetros clínicos	50
3.12.2 Parâmetros microbiológicos	50
3.12.3 Parâmetros imunológicos	51
RESULTADOS	52
4.1 Monitoramento clínico.....	53
4.2 Monitoramento microbiológico	56
4.3 Monitoramento imunológico	61
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	82

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A Doença Periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes e pode levar à perda dentária, afetando grande parte da população. Em um recente levantamento epidemiológico realizado nos Estados Unidos, foi demonstrado que um em cada dois americanos com 30 anos de idade ou mais possui DP¹. Neste estudo, 47% da amostra examinada, representando 64,7 milhões de adultos, apresentava periodontite nas formas leve (8,7%), moderada (30%) e severa (8,5%). Para adultos com 65 anos de idade ou mais, o percentual de ocorrência de periodontite moderada ou severa foi de 64%¹.

O biofilme bacteriano é o fator etiológico primário para o início da inflamação gengival e subsequente destruição dos tecidos periodontais². Entretanto, a presença isolada do biofilme responde por uma pequena proporção (20%) de variações na expressão da DP³. De acordo com um novo modelo de patogênese, o principal componente de destruição de tecidos duros e moles na DP é resultado da ativação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro às agressões bacterianas⁴. Fatores de risco adquiridos e ambientais (ex.: *diabetes mellitus*, fumo e estresse), bem como algumas características geneticamente transmitidas (ex.: polimorfismos gênicos para a Interleucina [IL]-1) podem acentuar a resposta inflamatória decorrente da agressão bacteriana e, eventualmente, a suscetibilidade à DP⁴.

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 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 subgengival⁵. A efetividade da remoção de cálculo dentário por meio da utilização de instrumentos manuais é influenciada de forma significativa pela profundidade de sondagem (PS) inicial, pela anatomia dentária e pela destreza do operador^{5,6}. Com o aumento da PS, a eliminação dos depósitos mineralizados subgengivais e do biofilme torna-se mais difícil. A quantidade de cálculo dentário residual sobre a superfície radicular em bolsas com mais de 6 mm de profundidade pode chegar a 44%, enquanto que bolsas de 4 a 5 mm de profundidade podem ter até 29% de cálculo residual, independentemente do tipo de instrumentação utilizada⁶. A capacidade de invasão tecidual e celular exibida por alguns periodontopatógenos^{7,8}, especialmente presentes em formas agressivas da DP, também

dificulta marcadamente o efetivo controle da microbiota subgengival por meio da RAR. Neste contexto, novas abordagens capazes de otimizar os procedimentos de RAR e a eficácia do tratamento da DP, principalmente da Periodontite Agressiva (PA), devem ser investigadas.

A PA é uma forma de DP que acomete, geralmente, indivíduos jovens e leva à rápida perda do aparato de inserção periodontal⁹. Este tipo de periodontite apresenta um perfil microbiológico composto predominantemente por microrganismos anaeróbios Gram-negativos, dentre os quais destacam-se *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Eikenella corrodens* (Ec) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)^{10,11}. Tais microrganismos, por meio de componentes estruturais (lipopolissacarídeos, produtos metabólicos residuais e enzimas) induzem um desequilíbrio na resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro^{12,13}, aumentando a produção tecidual de várias citocinas inflamatórias, tais como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), IL-1 α , IL-1 β e IL-6¹⁴. Estas moléculas, especialmente a IL-1 β , são capazes de estimular a atividade mononuclear de fagócitos e de induzirem a produção de Prostaglandina E2 e collagenases pelos fibroblastos gengivais, o que conduz ao colapso dos tecidos de suporte periodontais^{15,16}. Alguns estudos relataram níveis mais elevados de IL-1 β no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes portadores de periodontite quando comparados com indivíduos saudáveis ou com apenas gengivite¹⁷⁻¹⁹, bem como uma diminuição dos seus níveis após a realização da terapia periodontal não cirúrgica (TPNC)^{18,19}. Alguns estudos também demonstraram que a progressão e o início da doença periodontal podem estar associados a um desequilíbrio nos níveis de IL-1 β e IL-10 no FCG²⁰. Diferentemente da IL-1 β , a IL-10 parece ter uma função anti-inflamatória, uma vez que participa na supressão de metaloproteinases da matriz e na estimulação da produção da osteoprotegerina²⁰. Indivíduos portadores de PA, por exemplo, possuem uma elevada razão IL-1 β /IL-10 no FCG, sendo esta proporção parcialmente invertida após a execução da terapia periodontal^{21,22}.

O tratamento da PA representa um desafio para os clínicos, pois não existem protocolos padronizados para um controle eficiente da doença²³. O plano de tratamento da PA está tradicionalmente centrado na RAR associada a um controle efetivo da placa supragengival²⁴. 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-orais²⁵. Os relatos da Federação Europeia de Periodontologia e da Academia Americana de Periodontologia sugerem que pacientes com PA são beneficiados pela terapia antimicrobiana adjuvante com antibióticos sistêmicos²⁶⁻²⁸. 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^{23,28,29}. Este fato é de particular importância em pacientes com PA, uma vez que é notória a alta prevalência de *Aa* e de patógenos anaeróbios na microbiota subgengival^{11,30-32}. Investigações prévias já demonstraram que a supressão destas bactérias abaixo dos níveis de detecção resulta em melhoras consideráveis dos parâmetros clínicos periodontais^{33,34}. 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 bacteriana³⁵.

Neste contexto, buscam-se novas alternativas capazes de remover de forma eficiente as bactérias periodontais que colonizam as superfícies duras dentárias. A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) pode tornar-se uma novo método de tratamento antimicrobiano, sendo utilizada como adjuvante ou como uma terapia convencional para o tratamento da PA³⁶. A TFDa tem sido avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo*³⁶⁻⁴⁵ e tem como princípio a erradicação de células por meio da utilização de um fotossensibilizador (agente de absorção óptica - corante) e uma fonte de luz (laser de baixa intensidade com comprimento de onda apropriado), podendo, assim, promover a eliminação de microrganismos presentes na DP^{36,42,43}.

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 periodonto. Então, após a sua ativação pela luz, ele torna-se excitado, partindo do estado de singlete para o estado de duplete ou tripleto⁴⁶. Esta mudança de estado leva a uma transferência de elétrons que resulta na formação de espécies de oxigênio singlete, as quais são citotóxicas e promovem a morte bacteriana⁴⁰. A TFDa pode também reduzir alguns fatores de virulência, como lipopolissacarídeos e proteases³⁹. 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 microorganismo podem influenciar no sucesso da técnica⁴⁷.

A fotossensibilização pode ser importante no tratamento da PA devido à capacidade de penetração do fotossensibilizador nos tecidos epitelial e conjuntivo⁴⁰, atingindo os periodontopatógenos, particularmente o *Aa*, que podem infiltrar por meio da barreira epitelial nos tecidos periodontais. Além disso, a TFDa possui vantagens, tais como: redução do tempo de tratamento, não utilização de anestesia, eliminação bacteriana em um curto espaço de tempo, improvável desenvolvimento de resistência bacteriana e ausência de danos aos tecidos do hospedeiro³⁹. Ainda, o laser de baixa potência é capaz de alterar o comportamento celular, pois afeta a cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a síntese de colágeno, a angiogênese e a liberação de fatores de crescimento que poderão acelerar a cicatrização da ferida⁴⁸.

Poucos estudos avaliaram os efeitos da TFDa no tratamento da PA. de Oliveira *et al.*³⁶, em um estudo com desenho experimental de boca dividida, trataram dez pacientes com o diagnóstico clínico de PA. Os pacientes receberam TFDa utilizando uma fonte de luz laser com 690 nm de comprimento de onda associada ao fotossensibilizador fenotiazida (grupo teste) ou apenas RAR com instrumentos manuais (grupo controle). Avaliações clínicas do índice de placa, índice gengival, sangramento à sondagem, PS, recessão gengival e nível clínico de inserção (NCI) relativo foram realizadas no *baseline* e 3 meses após o tratamento com uma sonda periodontal automatizada. TFDa e RAR apresentaram resultados clínicos similares no tratamento não-cirúrgico da PA. de Oliveira *et al.*⁴³ investigaram os níveis de citocinas presentes no FCG de pacientes com PA após o tratamento com TFDa ou RAR, em um estudo com desenho experimental de boca dividida. Amostras do FCG foram coletadas (-7, 0, +1, +7, +30 e +90 dias) e as concentrações de TNF- α e Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B (RANK-L) foram determinadas. RAR e TFDa proporcionaram efeitos similares nos níveis de TNF- α e RANK-L existentes no FCG de pacientes com PA.

Novaes Jr *et al.*⁴⁵ investigaram as alterações ocorridas na composição microbiológica subgengival de dez indivíduos com PA após o tratamento com TFDa ou com RAR em um estudo com desenho experimental de boca dividida. Amostras de

placa subgengival foram coletadas (-7, 0, e +90 dias) e a contagem de 40 espécies subgengivais foi determinada utilizando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization*. A TFDa foi mais eficaz 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 a terapias poderia ser benéfica para o tratamento não-cirúrgico da PA.

Embora todos os estudos clínicos citados anteriormente tenham demonstrado o potencial da TFDa para o tratamento da PA, em nenhum deles foram avaliados os efeitos decorrentes da associação da RAR com a TFDa. Considerando que a TFDa não é um método mecânico verdadeiro, é esperada a ocorrência de cálculo dentário residual com seu uso isolado³⁶. Este fato pode dificultar a penetração do fotossensibilizador e, assim reduzir o seu efeito⁴⁵. Dessa forma, tratamentos combinados (RAR + TFDa) podem ser indicados, desde que RAR e TFDa podem ter efeitos sinérgicos ou mesmo aditivos⁴⁵. A RAR pode fisicamente reduzir a biomassa bacteriana sobre a superfície radicular e na bolsa periodontal, enquanto que a TFDa apresenta um diferente espectro de atividade devido à sua natureza não invasiva e habilidade em eliminar microrganismos causando alterações na membranas e/ou proteínas da membrana plasmática e lesões no DNA bacteriano⁴⁵.

A frequência de aplicação da TFDa é outro ponto que merece ser discutido. Os estudos clínicos citados anteriormente^{36,43,45} avaliaram o tratamento da PA com aplicação da TFDa em episódio único. Especula-se que o efeito de um único episódio de TFDa pode ser insuficiente para evitar a recolonização dos sítios tratados, especialmente por *Tf* e *Pg*, como foi observado por Novaes Jr et al.⁴⁵. Embora exista a recomendação dos fabricantes sobre as múltiplas aplicações da TFDa durante a primeira semana de cicatrização para que os efeitos antimicrobianos da terapia sejam potencializados, não há evidências científicas que suportem este conceito no tratamento da PA. O primeiro estudo utilizando TFDa com aplicações múltiplas foi realizado por Lulic *et al.*⁴⁴ Estes autores investigaram o efeito de múltiplas aplicações da TFDa (5 sessões em um intervalo de duas semanas) como adjuvante à RAR (grupo teste) na manutenção periodontal de pacientes com periodontite crônica e compararam os resultados obtidos com o uso de RAR somente (grupo controle). Maiores reduções nos

valores de PS foram obtidos nos sítios tratados com TFDa (grupo teste) quando comparados com aqueles tratados apenas com debridamento mecânico (grupo controle) após 6 meses. Significativos ganhos de inserção clínica e reduções de PS e sangramento à sondagem foram observados apenas no grupo teste. Este estudo de princípio de provas demonstrou que a TFDa em aplicações múltiplas associada à RAR promoveu benefícios clínicos adicionais em relação ao uso isolado da RAR, podendo ser recomendada para a manutenção periodontal de pacientes com bolsas periodontais residuais.

Recentemente, em um estudo clínico com grupos paralelos, foi avaliado o tratamento da PA de 36 pacientes por meio de RAR associada ao uso de antimicrobianos sistêmicos ($n = 18$) ou à TFDa em múltiplas aplicações ($n = 18$). Embora o uso da TFDa não tenha promovido reduções nos valores de PS ou no número de bolsas residuais (≥ 7 mm) após 6 meses pós-operatórios de forma equivalente ao uso de antimicrobianos sistêmicos, melhoras significativas nos valores de PS e do NCI foram observadas quando comparados àqueles obtidos no *baseline*⁴⁹. É importante ressaltar que neste estudo não foi possível mensurar o efeito adicional da TFDa à RAR, uma vez que o desenho experimental não apresentou um grupo de pacientes tratados apenas com RAR.

Em suma, a literatura não relata um tratamento específico para a PA. Existem apenas sugestões de uso de diversos antibióticos, com doses e tempos de administração diferentes. Devido à possibilidade de efeitos colaterais e ao desenvolvimento de resistência bacteriana resultantes do uso de antimicrobianos sistêmicos, novas abordagens de tratamento da PA devem ser investigadas. Uma dessas abordagens é a TFDa, a qual pode ser bastante promissora para a erradicação de periodontopatógenos. Até o presente momento, nenhum estudo avaliou comparativamente o tratamento da PA com RAR associada ou não a múltiplas aplicações da TFDa.

PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

- ✓ Avaliar o tratamento da PA em humanos com múltiplas aplicações da TFDa associada à RAR ou com RAR somente.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar parâmetros clínicos periodontais (índice de placa, PS, recessão gengival, NCI e sangramento à sondagem) antes e após tratamento da PA com múltiplas aplicações da TFDa associada à RAR ou somente RAR;
- ✓ Avaliar o número de bolsas periodontais residuais, bem como o percentual de pacientes classificados de acordo com o risco para a progressão da doença (baixo, moderado ou alto) aos 90 dias após tratamento da PA com múltiplas aplicações da TFDa associada à RAR ou somente RAR;
- ✓ Avaliar os níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 presentes no fluido crevicular gengival antes e após tratamento da PA com múltiplas aplicações da TFDa associada à RAR ou somente RAR;
- ✓ Avaliar a razão IL-1 β /IL-10 antes e após tratamento da PA com múltiplas aplicações da TFDa associada à RAR ou somente RAR;
- ✓ Avaliar a microbiota subgengival antes e após tratamento da PA com múltiplas aplicações da TFDa associada à RAR ou somente RAR.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 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 (protocolo nº: 03679312.1.0000.5419 – Anexo 2) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT02049008).

3.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado levando-se em consideração um erro tipo alfa estimado em 5% e um erro tipo beta em 20% para detectar diferenças pós-operatórias de 1 mm no NCI entre os grupos experimentais com desvio-padrão intragrupo de 2 mm. O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) e utilizou como dados referenciais os valores de NCI do estudo de de Oliveira *et al.*³⁶ Foi determinada, então, uma amostra de 18 pacientes para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados de NCI. Considerando a possibilidade de desistências de pacientes no período pós-operatório, 20 pacientes foram selecionados para o estudo.

3.3 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). Os pacientes selecionados apresentavam PA generalizada cujo diagnóstico clínico foi realizado de acordo com a classificação internacional das doenças periodontais adotada pela Academia Americana de Periodontologia⁵⁰. De acordo com esta classificação, os pacientes devem apresentar (1) boa saúde geral, (2) perda de inserção interproximal generalizada envolvendo no mínimo 3 dentes além de primeiros molares e incisivos, (3) quantidade de depósitos microbianos inconsistente com a severidade da destruição periodontal e (4) agregação

familiar (durante a anamnese os pacientes foram questionados se pelo menos um membro da família apresentava-se com história de DP). Além disso, foram considerados os seguintes critérios de inclusão para o presente estudo: (i) idade inferior a 35 anos, (ii) um mínimo de 20 dentes presentes na cavidade bucal e (iii) presença de dois pares de dentes uni-radiculares contralaterais com sítios periodontais proximais apresentando PS e NCI ≥ 5 mm.

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

Foram adotados como 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 sistêmico que possa interferir na progressão da doença ou na resposta ao tratamento (ex.: *diabetes mellitus*, desordens imunológicas), (4) envolvimento protéticos extensos, (5) necessidade de profilaxia antibiótica para a realização de procedimentos odontológicos de rotina, (6) uso de anti-inflamatórios por longo período de tempo, (7) tabagismo e (8) gravidez.

3.4 Delineamento do estudo

Antes do estudo começar, os indivíduos selecionados receberam instruções específicas de higiene oral e raspagem supragengival em todos os elementos dentários. Foram selecionados para as avaliações clínicas, microbiológicas e imunológicas dois pares de dentes uni-radulares contralaterais com sítios periodontais proximais apresentando $PS \geq 5$ mm. De acordo com uma tabela numérica aleatória gerada por um programa computadorizado, cada um dos pares dentários selecionados recebeu um dos seguintes tratamentos: RAR (Grupo Controle) ou RAR associada a múltiplas aplicações da TFDa (Grupo Teste). Os parâmetros clínicos periodontais, imunológicos e microbiológicos foram avaliados no *baseline* (período pré-intervenção) e após a realização da TPNC (Figura 2).

Figura 2 – Delineamento experimental.

Um pesquisador (M.R.M) 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 (P.G.F.P.O.) devidamente treinado e calibrado, o qual desconhecia os grupos experimentais do presente estudo. O cegamento dos examinadores também foi respeitado para as avaliações imunológicas (R.C.V.C.) e microbiológicas (I.B.). Os procedimentos de RAR foram realizados por um operador (A.L.G.M) treinado para estas finalidades e, também, cego em relação aos grupos experimentais do estudo. Após a realização da RAR em todos os elementos dentários do paciente, outro operador, responsável apenas pela aplicação da terapia adjuvante, acessava os envelopes dos pacientes para identificar quais pares de elementos dentários deveriam receber a TFDa. Após o respectivo tratamento, os envelopes eram novamente lacrados.

3.5 Monitoramento clínico

O índice de placa visível (IP) de cada paciente, avaliado dicotomicamente⁵¹, foi determinado pela porcentagem das superfícies dos dentes com depósitos de placa corados com solução evidenciadora. Foram avaliados, em 6 sítios de cada elemento dentário (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual), os seguintes parâmetros clínicos periodontais: (i) PS da bolsa periodontal (mm): foi medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa; (ii) NCI (mm): foi mensurado a partir da junção cimento-esmalte ao fundo da bolsa; (iii) Sangramento à sondagem (SS), avaliado dicotomicamente⁵²: a presença do sangramento foi considerada positiva quando ocorreu em até 20s após a inserção da sonda para medida da PS; (iv) Recessão gengival (RG): foi mensurada a partir da junção-cimento esmalte até a margem gengival.

Os parâmetros clínicos periodontais e o índice de placa de cada paciente foram registrados no *baseline*, bem como em +30 e +90 dias após a realização da TPNC.

3.6 Calibração do examinador

Foram selecionados 10 pacientes apresentando pelo menos 2 pares de dentes uniradiculares contralaterais com PS ≥ 5 mm nos sítios proximais. Cada paciente foi examinado duas vezes por meio de sonda periodontal computadorizada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA), com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e segundo exame. Foi realizada também uma análise de Correlação de Pearson entre os dados obtidos nos dois períodos de tempo. Valores de $r > 0,90$ no teste de Correlação de Pearson foram considerados para estimar a confiabilidade diagnóstica do examinador.

3.7 Monitoramento imunológico

No *baseline*, bem como em +14, +30 e +90 dias após a realização da TPNC, foram coletadas amostras do FCG dos elementos dentários selecionados. A placa supragengival desses elementos foi removida e os sítios foram cuidadosamente secos com jatos de ar, sendo, posteriormente, isolados com roletes de algodão estéreis. As amostras do FCG foram obtidas dos sítios mesiais e distais com a utilização de tiras de papel absorvente (Periopaper[®], Oralflo Inc., Amityville, NY, EUA). As tiras foram cuidadosamente inseridas junto à margem do sulco gengival, permanecendo por um período de 30 segundos. Posteriormente, as mesmas foram colocadas em microtubos esterilizados, os quais foram armazenados a uma temperatura de -80°C .

Foi determinado o valor de proteína total de cada amostra por meio de imunoenaios enzimáticos convencionais (ELISA), utilizando-se kits comercialmente disponíveis (DCTM Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A leitura colorimétrica foi realizada através de um espectrofotômetro a 650nm (TP-Reader, ThermoPlate[®], Brasil) e os valores foram expressos em ng/dL.

Para quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10), utilizou-se kits disponíveis comercialmente (HSCYTMAG-60SK – MilliplexTM map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa filtro foi umedecida com o *washing buffer* e, em seguida, a solução foi aspirada dos poços. *Beads* magnéticos

revestidos com os anticorpos monoclonais para os três analitos (TNF- α , IL-1 β e IL-10) foram adicionadas aos poços. As amostras e padrões (variando de 0,13 a 2000 pg/mL para cada analito) foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, adicionou-se aos poços a Estreptavidina R-ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes não-ligados, foi acionado *sheath fluid* (Luminexs, MiraiBio, Alameda, CA, USA) aos poços. As placas foram então analisadas pelo MAGPIX[®], obtendo-se a intensidade de fluorescência média. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas individualmente e os níveis de citocinas foram estimados a partir de uma curva polinomial de quinto grau utilizando-se o software xPONENT[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). Um total de 640 amostras foi analisado.

3.8 Monitoramento microbiológico

No *baseline*, bem como em +30 e +90 dias após a realização da TPNC, 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. As amostras de placa bacteriana subgengival coletadas foram imediatamente depositadas em frascos esterilizados do tipo *eppendorf* contendo 150 μ L de solução tampão (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6 – solução TE). Foram adicionados a esta solução 100 μ L 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 -20°C. 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 al⁵³:

3.8.1 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.⁵⁴. 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>			

3.8.2 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 (Immunitics, 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 (Na₂HPO₄, Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunetics, 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 Na₂HPO₄ (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 (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, 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 (C₄H₄O₄, 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 480 amostras foi analisado.

3.9 Variáveis de resultado

Foi definida como variável primária deste estudo as diferenças obtidas no NCI em bolsas periodontais profundas (PS inicial ≥ 7 mm) aos 90 dias após a TPNC da PA. Os demais parâmetros clínicos (IP, SS, RG e PS), microbiológicos e imunológicos 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), microbiológicos e imunológicos foram analisados em subgrupos levando-se em consideração a PS inicial. As bolsas periodontais foram classificadas de acordo com a PS inicial como moderadas (PS = 5-6 mm) ou profundas (PS ≥ 7 mm)

Para a variável “necessidade de terapia adicional”, cada grupo foi analisado separadamente. O paciente foi considerado como tendo necessidade de tratamento periodontal adicional caso apresentasse, no grupo analisado, pelo menos um dente com um sítio com PS ≥ 5 mm e SS positivo⁵⁵. O risco de progressão da doença foi também avaliado ao nível do paciente considerando-se cada grupo separadamente de acordo com Lang & Tonetti⁵⁶: baixo risco (≤ 4 sítios com PS ≥ 5 mm); risco moderado (5-8 sítios com PS ≥ 5 mm); e alto risco (≥ 9 sítios com PS ≥ 5 mm). Foram avaliadas ainda o número de bolsas residuais (PS ≥ 5 mm e SS positivo) presentes em cada grupo aos 90 dias.

3.10 Terapia Periodontal Não Cirúrgica (TPNC)

Todos os pacientes, 7 dias antes da realização da TPNC, foram submetidos a um exame radiográfico periapical completo da boca toda. Os mesmos foram incluídos 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 Bass⁵⁷ e limpeza interproximal com fio dental e escovas interdentais. Eles foram também 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 12[®], Anakol Ind. Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Após a realização deste PHO, os pacientes foram submetidos à avaliação dos parâmetros clínicos periodontais já descritos anteriormente, sendo realizadas também as coletas de amostras de placa bacteriana subgengival e do FCG nos sítios selecionados (*baseline*). Logo em seguida, receberam raspagem supragengival e um polimento coronário em todos os elementos dentários presentes na cavidade bucal.

A TPNC teve início 7 dias após a execução do PHO e da raspagem supragengival inicial. O tratamento foi realizado por um especialista em Periodontia, em um intervalo de 48 horas, por meio de raspagem (supragengival e subgengival) e aplainamento radicular de todos os elementos dentários com comprometimento periodontal, utilizando-se instrumentos manuais (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos. A instrumentação foi realizada quadrante por quadrante, até adequada limpeza da área e alisamento radicular, o qual foi verificado com auxílio de uma sonda exploradora. Os indivíduos receberam profilaxia profissional quinzenal durante três meses após o término da TPNC. Nas visitas quinzenais de controle e avaliação, a cooperação do paciente para com o estudo foi monitorada, verificando-se o estado de higiene bucal.

3.11 Protocolo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

Após a realização da RAR, as bolsas periodontais dos dentes selecionados para receber a TFDa foram irrigadas com solução salina fisiológica. Logo em seguida, foi aplicado o fotossensibilizador cloridrato de fenotiazina na concentração de 10 mg/mL (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria) a partir do fundo da bolsa até a margem

gengival. Após 1 minuto, foi realizada irrigação copiosa das bolsas periodontais com solução salina fisiológica para remoção dos excessos do corante. A área corada foi, então, irradiada com um laser diodo (Minilaser 2075 F, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria) com um comprimento de onda de 670 nm e potência máxima de 75 mW, por meio de uma sonda de fibra óptica de 0,6 mm de diâmetro (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria). A exposição à irradiação se deu em seis sítios por elemento dentário sob terapia, perfazendo o tempo total de 1 minuto por elemento, ou o equivalente a 10 segundos por sítio (densidade de potência = $0,25 \text{ W/cm}^2$, fluência por sítio = $2,49 \text{ J/cm}^2$; fluência total por dente = $14,94 \text{ J/cm}^2$) (Figura 3).

Figura 3 – A) Aplicação do fotossensibilizador cloridrato de fenotiazina (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems) na concentração de 10mg/mL - Grupo Teste; B) Ativação do laser diodo em 6 pontos por elemento dentário (670 nm, 75 mW, $0,25 \text{ W/cm}^2$, $2,49 \text{ J/cm}^2$, 10s por ponto); C) Minilaser 2075 F (Helbo Photodynamic Systems) com sonda de fibra óptica de 0,6 mm de diâmetro (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems).

Dois dentes contíguos aos dentes selecionados receberam o mesmo protocolo de TFDa. As aplicações da TFDa foram repetidas da mesma maneira até a segunda semana pós-operatória nos dias +2, +7 e +14. Imediatamente antes das aplicações, foi realizada a remoção mecânica da placa supragengival com a utilização de instrumentos manuais. Uma simulação da TFDa foi realizada concomitantemente nos pares de dentes contralaterais (Grupo Controle).

3.12 Análise estatística

As análises foram realizadas com o *software* Bioestat (BioEstat, Versão 5.3. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brazil). 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, microbiológicos e imunológicos 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.

3.12.1 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*, +30 e +90). 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. Os dados de “necessidade de terapia adicional”, “risco de progressão da doença” e “bolsas residuais” foram também apresentados como frequências absolutas e relativas. As diferenças inter-grupos foram avaliadas com o Teste do Qui-Quadrado.

3.12.2 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*, +30 e +90). Os

dados foram também agrupados em complexos, os quais foram descritos por Socransky et al.⁵⁸. 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.⁵⁹. 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.

Considerando-se a presença de bolsas periodontais moderadas (PS = 5-6 mm) e profundas (PS $\geq$ 7 mm) separadamente, foram calculadas as frequências relativas dos complexos bacterianos presentes em cada paciente e, em seguida, as médias para cada grupo experimental. As diferenças inter-grupos aos 30 e 90 dias, bem como as diferenças intra-grupos em relação aos valores obtidos no *baseline*, foram avaliadas pelo Teste t pareado.

3.12.3 Parâmetros imunológicos

Os valores de proteína total foram convertidos em pg/mL. Os níveis finais das citocinas analisadas foram obtidos pela razão entre os valores inicialmente obtidos com sistema MAGPIX[®] e os valores de proteína total convertidos em pg/mL. Em cada paciente, foi calculada a média e o desvio-padrão dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 (pg/mL) para cada par de dentes analisados (4 amostras de FCG) nos diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, +14, +30 e +90). Os níveis de citocinas foram computados para cada sítio e agrupados de acordo com a PS obtida no *baseline* (PS = 5-6 mm – bolsas moderadas; PS $\geq$ 7mm – bolsas profundas). Foi calculada também a razão IL-1 β /IL-10 para cada grupo experimental. As diferenças dentro de cada grupo nos quatro tempos experimentais, bem como as diferenças inter-grupos para TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram avaliadas pela Análise de Variância a dois critérios, seguida pelo teste *pot hoc* de Bonferroni. Os testes de Friedman e Wilcoxon foram utilizados para avaliar as diferenças intra e inter-grupos para a razão IL-1 β /IL-10, respectivamente.

RESULTADOS

O fluxograma deste estudo está apresentado na Figura 1. Todos os pacientes incluídos na amostra completaram o estudo. 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 Março de 2013 e Outubro de 2013. A cicatrização pós-operatória ocorreu sem complicações em todos os casos após a realização da RAR. Nenhum efeito adverso foi observado com a utilização da TFDa.

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

Variável	Todos Média ± DP	Grupos		Valor de <i>p</i>
		Controle	Teste	
Número de pacientes	20			
Idade	30,6 ± 4,25			
Gênero (F/M)	18/02			
Número de dentes presentes no <i>baseline</i>	23,75 ± 2,72			
		22	22	-
Número de Incisivos laterais				
Número de Caninos		16	15	NS
Número de Pré-molares		2	3	NS
Número de bolsas periodontais presentes no <i>baseline</i>				
PS = 5 mm		77	92	NS
PS = 6 mm		21	18	NS
PS ≥ 7 mm		30	25	NS

F = feminino; M = masculino; PS = profundidade de sondagem; DP = desvio-padrão.
NS = diferenças não significativas (Teste do Qui-Quadrado, $p > 0,05$)

4.1 Monitoramento clínico

Os valores de PS, NCI, RG, IP e SS para os Grupos Controle e Teste podem ser observados nas Tabelas 3 e 4. No *baseline*, nenhuma diferença significativa foi

observada entre os grupos para os valores de PS, NCI, RG, SS e IP. Aos 30 e 90 dias após a realização da TPNC, ambos os grupos apresentaram valores de PS, NCI e SS significativamente menores ($p < 0,05$) que aqueles obtidos no *baseline*.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão de PS, NCI e RG para os grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais em bolsas periodontais moderadas e profundas, bem como os resultados das comparações intra e inter-grupos.

VARIÁVEL	TEMPO	GRUPOS EXPERIMENTAIS		Comparações inter-grupos em um mesmo tempo (Teste t pareado)		
		Controle N=20	Teste N=20	Diferença entre as médias	IC 95%	Valor de <i>p</i>
		Média ± DP	Média ± DP			
PS (mm)						
Bolsas moderadas	<i>Baseline</i>	5,22 ± 0,35	5,32 ± 0,34	0,10	-0,3248 a 0,1248	NS
	30 dias	3,32 ± 0,81*	3,08 ± 0,88*	-0,2375	-0,3078 a 0,7828	NS
	90 dias	3,07 ± 0,68*	2,91 ± 0,45*	-0,1660	-0,2076 a 0,5396	NS
Bolsas profundas	<i>Baseline</i>	7,68 ± 0,92	7,73 ± 0,87	0,04327	-0,7887 a 0,7022	NS
	30 dias	5,94 ± 1,22*	5,14 ± 1,01*	-0,7965	-0,1344 a 1,727	NS
	90 dias	5,12 ± 0,80*	3,77 ± 0,97*	-1,356	0,6130 a 2,099	0,0019
NCI (mm)						
Bolsas moderadas	<i>Baseline</i>	5,41 ± 0,90	5,38 ± 0,93	-0,02500	-0,4237 a 0,4737	NS
	30 dias	4,10 ± 1,03*	3,63 ± 1,15*	-0,4625	-0,2401 a 1,165	0,0376
	90 dias	3,83 ± 1,07*	3,85 ± 0,91*	0,0165	-0,6554 a 0,6224	NS
Bolsas profundas	<i>Baseline</i>	7,75 ± 1,21	7,84 ± 0,89	0,1538	-1,046 a 0,7384	NS
	30 dias	6,16 ± 1,11*	5,76 ± 1,01*	-0,3534	-0,5806 a 1,287	NS
	90 dias	6,00 ± 1,04*	5,07 ± 0,64*	-1,051	0,3990 a 1,703	0,0046
RG (mm)						
Bolsas moderadas	<i>Baseline</i>	0,18 ± 0,72	0,06 ± 0,27	-0,1250	-0,2287 a 0,4787	NS
	30 dias	0,77 ± 0,74*	0,60 ± 0,92*	-0,1750	-0,3538 a 0,7038	NS
	90 dias	0,75 ± 0,91*	0,93 ± 1,04*	0,1825	-0,8099 a 0,4449	NS
Bolsas profundas	<i>Baseline</i>	0,08 ± 0,64	0,15 ± 0,98	-0,1154	-0,5871 a 0,8179	NS
	30 dias	0,23 ± 0,72	0,69 ± 0,94	-0,4677	-0,2037 a 1,139	NS
	90 dias	0,92 ± 0,86*	1,15 ± 0,69*	-0,07000	-0,4996 a 0,6396	NS

PS = profundidade de sondagem; NCI = nível clínico de inserção; RG = recessão gengival; DP = desvio-padrão; IC = intervalo de confiança.

Diferenças significativas inter-grupos (Teste t pareado): $p > 0,1$: não significativo (NS); $p < 0,05$: significativo; * Diferença significativa quando comparado ao valor do *baseline* em um mesmo grupo (Análise de Variância para medidas repetidas, Teste *post hoc* de Bonferroni).

Em relação à RG, ambos os grupos apresentaram, aos 30 e 90 dias, para bolsas periodontais moderadas, valores significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparados àqueles obtidos no *baseline*. Para bolsas periodontais profundas, os valores de RG de ambos os grupos foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles do *baseline* aos 90 dias.

Nas comparações inter-grupos, o Grupo Teste apresentou valores de SS significativamente menores ($p < 0,05$) que aqueles do Grupo Controle apenas aos 30 dias (Tabela 4). Aos 30 dias, considerando-se as bolsas periodontais moderadas, valores de NCI significativamente menores ($p < 0,05$) que aqueles do Grupo Controle foram observados no Grupo Teste (Tabela 3). Aos 90 dias, na análise de bolsas periodontais profundas, o Grupo Teste apresentou redução de PS e ganho de inserção clínica significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles do Grupo Controle (Tabela 3).

Tabela 4 – Frequências absolutas e relativas de sítios com placa e sangramento à sondagem para os grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais, bem como os resultados das comparações intra e inter-grupos.

VARIÁVEL	PERÍODO	GRUPOS EXPERIMENTAIS		Teste do Qui-Quadrado	
		Controle	Teste	Risco relativo	Valor de p
		Número (%)	Número (%)		
Sítios com Placa	<i>Baseline</i>	40 (25,00)	36 (22,50)	0,9321	NS
	30 dias	10 (6,25)	12 (7,50)	1,098	NS
	90 dias	16 (10,00)	22 (13,75)	1,183	NS
Sítios com Sangramento	<i>Baseline</i>	154 (64,16)	144 (60,00)	0,9161	NS
	30 dias	69 (28,75)*	26 (10,83)*	0,4924	<0,0001
	90 dias	36 (15,00)*	36 (15,00)*	1,000	NS

Diferenças significativas inter-grupos em um mesmo tempo (Teste do Qui-Quadrado): $p > 0,1$: não significativo (NS); $p < 0,05$: significativo; * Diferença significativa quando comparado ao valor do *baseline* em um mesmo grupo (Teste de Friedman).

Considerando cada grupo separadamente, foram analisados o número de pacientes com necessidade de terapia adicional e o risco de progressão da DP (Tabela 5). O percentual de pacientes com necessidade de tratamento periodontal adicional após o término da TPNC foi de 35% e 65% nos grupos Teste e Controle, respectivamente. Foram registradas 35 bolsas periodontais residuais em 13 pacientes no Grupo Controle e

14 bolsas em 7 pacientes no Grupo Teste. A frequência de bolsas periodontais residuais foi significativamente menor ($p < 0,05$) no Grupo Teste quando comparada àquela do Grupo Controle aos 90 dias. Na análise do risco de progressão da DP, enquanto 80% dos pacientes no Grupo Teste apresentaram baixo risco de progressão da doença, no grupo Controle apenas 35% dos pacientes foram classificados nesta categoria.

Tabela 5 – Frequências absolutas e relativas para as variáveis “bolsas residuais”, “necessidade de terapia adicional” e “risco de progressão da doença” nos grupos Controle e Teste aos 90 dias pós-operatórios, bem como os resultados das comparações inter-grupos.

VARIÁVEL	GRUPOS EXPERIMENTAIS		Teste do Qui-Quadrado	
	Controle N=20 Número (%)	Teste N=20 Número (%)	Risco relativo	Valor de p
Bolsas residuais	35 (27,34)	14 (10,37)	0,5053	0,0004
Necessidade de terapia adicional ao nível do paciente	13 (65,00)	7 (35,00)	0,5385	0,0564
Risco de progressão da doença ao nível do paciente				
Baixo	7 (35,00)	16 (80,00)	2,957	0,0040
Moderado	9 (45,00)	3 (15,00)	0,4118	0,0384
Alto	4 (20,00)	1 (5,00)	0,3684	0,1515

Diferenças significativas inter-grupos (Teste do Qui-Quadrado): $p > 0,1$: não significativo; $p \geq 0,05$ a $p \leq 0,1$: tendência; $p < 0,05$: significativo.

4.2 Monitoramento microbiológico

De forma geral, os indivíduos tratados no presente estudo apresentaram elevadas contagens de patógenos periodontais, como *Aa* e espécies dos complexos laranja e vermelho no *baseline*. A Figura 4 apresenta as médias da contagem total ($\times 10^5$) das 40 espécies subgengivais 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 30 e 90 dias quando comparadas aos valores obtidos no *baseline*.

No Grupo Teste, aos 30 dias, foi observada uma redução significativa de *Aa*, de 3 espécies do complexo laranja (*Fn*, *F. nuc. polymorphum*, *F. periodonticum*) e de 3

espécies do complexo vermelho (*Tf*, *Pg* e *Td*), bem como aumento significativo em 1 espécie do complexo azul (*A. viscosus*) em relação aos valores do *baseline*. Aos 90 dias, foi observada uma redução significativa de *Aa* e de *Tf*.

No Grupo Controle, aos 30 dias, foi observada uma redução significativa de *T. socranskii*, 1 espécie do complexo laranja (*F. nuc. polymorphum*), 2 espécies do complexo vermelho (*Tf* e *Pg*), bem como aumento de 1 espécie do complexo azul (*A. viscosus*). Aos 90 dias, notou-se uma redução significativa apenas de *Aa*. As Figuras 5 e 6 apresentam as frequências relativas médias dos complexos microbianos presentes nos indivíduos dos dois grupos terapêuticos nos diferentes períodos experimentais, considerando-se bolsas periodontais moderadas e profundas separadamente, bem como os resultados das comparações intra e inter-grupos.

Em bolsas periodontais moderadas (Figura 5), ambos os grupos apresentaram, aos 30 e 90 dias, percentuais significativamente menores de *Aa* e do complexo vermelho quando comparados àqueles do *baseline*. Foi constatado também um aumento significativo em relação ao *baseline* no percentual do complexo azul em ambos os grupos, aos 30 e 90 dias. Apenas o Grupo Teste apresentou percentuais de complexo laranja significativamente menores que aqueles do *baseline* aos 30 e 90 dias. Nas diferenças inter-grupos, verificou-se que o Grupo Teste apresentou percentuais médios de *Aa* e do complexo laranja significativamente menores que aqueles do Grupo Controle aos 30 dias. Uma percentagem significativamente maior do complexo azul também foi constatada no Grupo Teste quando comparado ao Grupo Controle aos 30 dias. Aos 90 dias, nenhuma diferença significativa inter-grupos foi observada.

Na análise de bolsas periodontais profundas (Figura 6), foi observado um percentual significativamente maior do complexo azul no Grupo Controle aos 30 dias e no Grupo Teste aos 30 e 90 dias quando comparados aos valores obtidos no *baseline*. Apenas o Grupo Teste apresentou percentuais de complexos vermelho e laranja significativamente menores que aqueles do *baseline* aos 30 e 90 dias. Nenhuma diferença significativa inter-grupos foi observada aos 30 dias. Aos 90 dias, o Grupo Teste apresentou percentuais dos complexos vermelho e laranja significativamente menores que aqueles do Grupo Controle. Um percentual significativamente maior de complexo azul também foi observado no Grupo Teste quando comparado ao Grupo Controle.

Figura 4 – Contagens médias (x 10⁵) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e em 30 e 90 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 – 30 dias; (†) Grupo Teste – 30 dias; (Ψ) Grupo Controle - 90 dias; (Φ) Grupo Teste - 90 dias. Teste de Wilcoxon ($p < 0,0012$ para espécies orais e $p < 0,002$ para espécies não orais).

Figura 5 – Frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos no diferentes períodos experimentais em bolsa periodontais moderadas. A cor verde claro caracteriza a proporção individual do *A. actinomycetemcomitans*. ¶ 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, $p < 0,05$).

Figura 6 – Frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgingival dos indivíduos dos dois grupos terapêuticos no diferentes períodos experimentais em bolsa periodontais profundas A cor verde claro caracteriza a proporção individual do *A. actinomycetemcomitans*. ¶ 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, $p < 0,05$).

4.3 Monitoramento imunológico

Os níveis de IL-1 β , IL-10 e TNF- α no FCG estão apresentados na Figura 7. Os sítios periodontais analisados foram estratificados em níveis moderado e profundo de acordo com os valores de PS obtidos no *baseline*. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os níveis de IL-1 β , IL-10 e TNF- α no *baseline*.

Bolsas periodontais moderadas

Não foram observadas diferenças significativas intra e inter-grupos para os níveis de IL-1 β (Figura 7A). Contudo, aos 14 dias foi possível constatar uma tendência ($p = 0,0539$) de divergência nos níveis observados nos grupos Controle e Teste. Enquanto no Grupo Controle foi observado aumento nos níveis de IL-1 β em relação ao *baseline* (*baseline*: 16,91 pg/mL; 14 dias: 22,59 pg/mL), no Grupo Teste constatou-se uma diminuição nos níveis médios dessa citocina (*baseline*: 16,08 pg/mL; 14 dias: 11,15 pg/mL).

Em relação aos níveis de IL-10 (Figura 7C), apenas o Grupo Teste apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) aos 30 dias quando comparado ao *baseline*. Não foram observadas diferenças significativas inter-grupos em todos os períodos experimentais.

Para TNF- α (Figura 7E), valores significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles do *baseline* foram observados apenas no Grupo Controle aos 14 dias. Não foram observadas diferenças significativas inter-grupos em todos os períodos experimentais.

Considerando a razão IL-1 β /IL-10 (Figura 7G), o Grupo Teste apresentou valor significativamente ($p < 0,05$) menor que aquele do Grupo Controle aos 14 dias.

Bolsas periodontais profundas

Apenas no Grupo Teste foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de IL-1 β (Figura 7B) aos 14, 30 e 90 dias em relação ao *baseline*. Esses valores também foram significativamente menores ($p < 0,05$) que aqueles do Grupo Controle nos respectivos tempos de análise. A maior redução nos níveis de IL-1 β ocorreu aos 14 dias no Grupo Teste. Após este período, os valores de IL-1 β mantiveram-se reduzidos e, de certa forma, estabilizados.

Em relação aos níveis de IL-10 (Figura 7D), os grupos Controle e Teste apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles do *baseline* aos 14 e 30 dias, respectivamente. No Grupo Teste, esses valores mantiveram-se, de certa forma, estáveis após o aumento observado aos 30 dias. Diferentemente, no Grupo Controle, após o aumento observado aos 14 dias, os níveis de IL-10 pareceram retornar aos valores obtidos no período *baseline*.

Para TNF- α (Figura 7F), não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nas comparações inter e intragrupos em todos os períodos experimentais analisados.

Considerando a razão IL-1 β /IL-10 (Figura 7H), verificou-se que apenas o Grupo Teste apresentou valores significativamente menores ($p < 0,05$) que aqueles do *baseline* aos 30 e 90 dias. Embora não tenham ocorrido diferenças estatisticamente significativas, ambos os grupos apresentaram, quando comparados ao *baseline*, uma redução acentuada nos valores médios dessa razão aos 14 dias. Após esse período, enquanto no Grupo Teste os valores pareceram estar estabilizados aos 30 e 90 dias, no Grupo Controle essa razão pareceu aumentar aos 30 e 90 dias (Controle: 1,93, 4,26 e 3,96 aos 14 e 30 e 90 dias respectivamente; Grupo Teste: 0,53, 0,21 e 0,27 aos 14, 30 e 90 dias respectivamente). Diferenças significativas foram observadas entre os grupos Controle e Teste aos 90 dias ($p < 0,05$), sendo que aos 30 dias uma clara tendência ($p = 0,0844$) de diferença também foi constatada.

Figura 7. Níveis médios (pg/mL) e desvios-padrão de IL-1β, IL-10 e TNF-α para os grupos Controle e Teste nos diferentes períodos experimentais em bolsas periodontais moderadas (A, C e F) e profundas (B, D e F). Em G e H pode ser observada a razão IL-1β/IL-10 encontrada em ambos os grupos para bolsas moderadas e profundas, respectivamente. (*) Diferença significativa quando comparado ao *baseline* ($p < 0,05$); (¥) Diferença significativa entre os grupos Controle e Teste em um mesmo período de análise ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Este estudo clínico, do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo cego avaliou os efeitos da RAR, associada ou não a múltiplas aplicações da TFDa, em indivíduos sistemicamente saudáveis diagnosticados com PA generalizada, por meio da análise de parâmetros clínicos, imunológicos e microbiológicos. Os resultados obtidos demonstraram que a TFDa pode ser um eficiente recurso adjuvante à RAR no tratamento da PA.

A análise dos parâmetros clínicos deste estudo demonstrou que a RAR associada à TFDa promove maior redução de PS e ganho de inserção clínica em bolsas periodontais profundas quando comparada ao uso isolado da RAR. Esses resultados, de forma geral, não foram observados no tratamento de bolsas periodontais moderadas aos 90 dias pós-operatórios. Dois aspectos merecem ser discutidos em relação a esses achados. O primeiro deles refere-se ao fato de que o aumento na PS está relacionado com a redução da eficácia da RAR^{39,60-64}. Dessa forma, em bolsas periodontais profundas, o uso da TFDa pode potencializar os efeitos da RAR auxiliando na redução da microflora subgingival periodontopatogênica, uma vez que a penetração do fotossensibilizador nos tecidos epitelial e conjuntivo⁴⁰ pode atingir os microrganismos que infiltram nos tecidos periodontais por meio da barreira epitelial.

O segundo aspecto refere-se aos efeitos de redução de PS na necessidade de tratamentos periodontais adicionais para o paciente, bem como no risco de progressão da DP. No presente estudo, as médias de redução de PS, aos 90 dias, em relação aos valores do *baseline*, para os grupos Controle e Teste, foram 2,56 mm e 3,96 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 TPNC aos 90 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^{56,65-67}. Um estudo de acompanhamento de pacientes em manutenção periodontal durante 11 anos demonstrou que dentes com bolsas residuais (PS > 5 mm) apresentaram 7,7 vezes mais chances de exodontia⁶⁸. De acordo com Lang⁵⁶, pacientes com 8 ou mais sítios periodontais com PS ≥ 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 residuais⁵⁶. No presente estudo, considerando cada grupo individualizadamente, foi possível constatar maior número de pacientes com baixo risco de progressão da DP no Grupo Teste do que no Grupo Controle.

Há dificuldades em se comparar os resultados clínicos obtidos no presente estudo com outros estudos na literatura. Estudos prévios^{36,43,45} avaliaram os potenciais efeitos da TFDa apenas como monoterapia no tratamento da PA. Considerando que a TFDa não é um método mecânico verdadeiro, é esperada a ocorrência de cálculo dentário residual com seu uso isolado³⁶. Este fato pode dificultar a penetração do fotossensibilizador e, assim, reduzir o seu efeito⁴⁵. Apenas em um recente estudo, a TFDa foi associada à RAR para o tratamento da PA⁴⁹. Trinta e seis pacientes com PA foram tratados com RAR e, em seguida, aleatoriamente divididos em dois grupos. Um deles, Grupo AB, recebeu, após a RAR, uma combinação de amoxicilina (375mg) e metronidazol (250 mg) três vezes ao dia por 7 dias. O outro grupo, Grupo aPDT, recebeu duas aplicações (no momento da RAR e aos 7 dias pós-operatórios) da TFDa. Após seis meses, ambos os tratamentos propiciaram melhoras significativas nos parâmetros clínicos periodontais (PS e NCI). Entretanto, maior redução de PS, maior ganho de inserção clínica e menor número de bolsas residuais foram verificados no Grupo AB⁴⁹. A redução média de PS em bolsas periodontais profundas no Grupo aPDT foi de 2,2 mm aos 6 meses pós-operatórios, enquanto que no Grupo AB foi de 3,9 mm. No presente estudo, o Grupo Teste apresentou redução média de PS de 3,96 mm aos 3 meses pós-operatórios na análise de bolsas periodontais profundas. Esse valor foi superior ao encontrado no Grupo aPDT do estudo de Arweiler *et al.*⁴⁹ aos 6 meses pós-operatórios. Essas diferenças podem ser explicadas, entre outros fatores, pela frequência de aplicações da TFDa. Enquanto no estudo de Arweiler *et al.*⁴⁹ 2 aplicações de TFDa foram utilizadas, no presente estudo a TFDa foi aplicada em 4 períodos após a realização da RAR, sendo o último período aos 14 dias pós-operatórios. Este fato pode ter atrasado a recolonização de patógenos periodontais nas bolsas tratadas. De acordo com Sbordone *et al.*⁶⁹, os efeitos da RAR, quando realizada isoladamente, são de curto prazo, sendo possível observar em 3 semanas pós-operatórias a recolonização de potenciais patógenos periodontais na bolsas tratadas. Neste contexto, a TFDa pode ser uma alternativa interessante ao uso de antimicrobianos sistêmicos no tratamento de formas agressivas da DP que não respondem à terapia convencional. É importante ainda considerar que a

utilização de antimicrobianos sistêmicos como terapia adjuvante à RAR requer precaução e uma atitude restritiva em relação ao seu uso deve ser adotada, uma vez que é crescente a preocupação com o surgimento de novas cepas bacterianas resistentes. Até o presente, não existe nenhum relato que associe a TFDa com o desenvolvimento de resistência bacteriana, o que a torna um recurso atrativo e, de certa forma, mais seguro para o tratamento da PA.

Os melhores resultados clínicos observado no Grupo Teste neste estudo podem, de certa forma, serem fundamentados pelos resultados microbiológicos e imunológicos obtidos. 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 em bolsas periodontais profundas. Na análise de bolsas periodontais moderadas, uma proporção significativamente menor de *Aa* também foi observada no Grupo Teste aos 30 dias pós-operatórios. Sítios periodontais que apresentam bactérias do complexo vermelho têm maior risco de perda de inserção⁷⁰, bem como apresentam maior gravidade e progressão da DP do que sítios que possuem contagens reduzidas dessas bactérias⁷¹⁻⁷³. De fato, esses patógenos periodontais estão fortemente associados com a presença de bolsas residuais e respostas insatisfatórias no tratamento periodontal⁷³⁻⁷⁶. O *Aa* também é um importante patógeno relacionado com a etiologia da PA⁷⁷⁻⁷⁹ e há relatos de que apenas a RAR não é capaz de eliminá-lo⁸⁰. A habilidade da TFDa na eliminação de periodontopatógenos já foi comprovada por alguns estudos *in vitro*^{37,41,81,82}, os quais demonstraram que a TFDa é capaz de eliminar *Aa*, *Pg* e *Fn*, mesmo quando as mesmas estão organizadas sob a forma de biofilme. A TFDa pode também inativar proteases bacterianas⁸³, reduzindo, dessa forma, a patogenicidade de algumas cepas bacterianas.

É interessante observar que, aos 30 dias pós-operatórios, as contagens totais de três espécies bacterianas do complexo laranja (*F. nuc. nucleatum*, *F. nuc. polymorphum*, *F. periodonticum*) foram reduzidas no Grupo Teste quando comparadas aos valores obtidos no *baseline*. Diferentemente, no Grupo Controle, foi observada apenas a redução de uma espécie desse complexo (*F. nuc. polymorphum*). Na análise de proporções dos complexos bacterianos, observou-se, de forma geral, uma menor proporção do complexo laranja no Grupo Teste, quando comparado ao Grupo Controle, em bolsas periodontais moderadas (aos 30 dias) e profundas (aos 90 dias). Em bolsas profundas, observou-se no intervalo de 30 a 90 dias um aumento na proporção desse complexo no Grupo Controle (22,16% e

42,19%, respectivamente). No Grupo Teste, essa proporção apresentou redução no mesmo intervalo (19,59% e 13,31%, respectivamente). As espécies de *Fn* são capazes de induzir, *in vitro*, a apoptose de leucócitos mono e polimorfonucleados⁸⁴, bem como elevam a produção de colagenase 3⁸⁵ por células epiteliais e a liberação de substâncias proinflamatórias por leucócitos periféricos (IL-1 β , TNF- α e IL-8)⁸⁶. Uma vez que a perpetuação da DP tem sido atribuída à superatividade de células do sistema imune, em termos de produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α ⁸⁷, a redução das contagens de *Fn* pode ser uma etapa crítica para o sucesso da terapia periodontal. É importante ainda destacar que a função mais importante do *Fn* na biomassa bacteriana subgengival parece ser sua habilidade em facilitar a co-agregação e otimização do crescimento de outros patógenos periodontais, como o *Aa*, *Pg* e *Tf*^{87,88}. Sigusch *et al.*⁸⁹ avaliaram os efeitos clínico e microbiológico da TFDa no tratamento de pacientes com periodontite crônica que apresentavam sítios periodontais positivos para a presença de *Fn*. 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 foi capaz, também, de reduzir as concentrações de *Fn* de forma mais significativa que a RAR isoladamente. Os autores inferiram que a redução na concentração de *Fn* 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 SS.

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) em bolsas periodontais moderadas (30 dias) e profundas (90 dias) 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 sucedido⁶³. Neste estudo, o Grupo Teste apresentou um aumento na proporção de espécies do complexo azul aos 90 dias similar àquele obtido por Mestnik *et al.*²⁹ quando antimicrobianos sistêmicos foram associados à RAR no tratamento da PA.

Nenhum estudo, até o presente, avaliou os efeitos microbiológicos da TFDa como adjuvante à RAR no tratamento da PA. Portanto, há dificuldades em se comparar os resultados do presente estudo com outras investigações na literatura. Um único

estudo prévio⁴⁵ avaliou o efeito da TFDa na terapia periodontal de indivíduos com PA. Nesse estudo, a TFDa, utilizada como monoterapia, foi mais eficaz 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 a terapias poderia ser benéfica para o TPNC da PA.

Em relação aos parâmetros imunológicos, foram observadas, no presente estudo, em bolsa periodontais profundas, concentrações significativamente menores de IL-1 β no Grupo Teste aos 14, 30 e 90 dias quando comparado ao Grupo Controle. Para IL-10, níveis maiores parecem ter ocorrido no Grupo Teste. Alguns estudos demonstraram que os níveis de IL-1 β são reduzidos após a implementação do TPNC ou cirúrgico^{21,90-92}, enquanto que os níveis de IL-10 tornam-se mais elevados^{21,90,92}. A IL-1 β está envolvida na resposta imune do tipo Th1 ou imunidade mediada por células⁹³, sendo capaz de estimular a osteoclastogênese. Contrariamente, a IL-10 é uma citocina essencial para a diferenciação e proliferação de células B (plasmócitos) e desempenha um papel importante nas respostas adaptativas⁹⁴⁻⁹⁶. Além disso, a IL-10 é um potencial inibidor da produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos e TNF- α . Os seus efeitos inibitórios sobre a IL-1 β e TNF- α são fundamentais para seu papel anti-inflamatório, uma vez que essas últimas citocinas geralmente têm atividades sinérgicas nos processos inflamatórios, amplificando a resposta do hospedeiro pela indução na liberação de mediadores secundários, como quimiocinas e prostaglandinas⁹⁵. Duas hipóteses poderiam explicar os melhores resultados imunoinflamatórios observados no Grupo Teste. A primeira delas refere-se à relação direta existente entre os níveis de citocinas locais e o perfil microbiológico presente nos tecidos periodontais^{92,97}. Nesse contexto, as menores contagens de patógenos periodontais observadas no Grupo Teste podem ter contribuído indiretamente para uma menor expressão de citocinas proinflamatórias. É possível também que a TFDa possa ter reduzido a potencialidade de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos em estimular a liberação de citocinas proinflamatórias³⁹. A segunda hipótese refere-se à própria ação do laser de baixa potência nos mecanismos inflamatórios. Estudos realizados em modelos experimentais animais^{98,99} demonstraram que o laser de baixa

potência pode aumentar a expressão do mRNA da IL-10, colágenos I e III e IL-10, bem como pode reduzir a expressão de TFN- α e IL-1 β durante a fase aguda da inflamação.

No presente estudo, o Grupo Teste apresentou razão IL-1 β /IL-10 significativamente menor que o Grupo Controle aos 14 e 90 dias em bolsas periodontais moderadas e profundas, respectivamente. De fato, alguns estudos sugerem que o desequilíbrio entre essas citocinas pode estar associado com o início e progressão da PA^{22,90,100}, uma vez que indivíduos com PA ou DP avançada não tratados apresentam uma elevada razão IL-1 β /IL-10. A expressão de altos valores dessa razão no FCG pode estar relacionada com elevadas contagens e proporções de patógenos periodontais dos complexos vermelho e laranja³⁷.

O presente estudo, bem como outros experimentos *in vitro*^{37,39,83}, pré-clínicos^{47,101} e ensaios clínicos^{44,89,102-108} demonstraram resultados encorajadores referentes à utilização da TFDa no tratamento da DP. Contudo, ainda existe uma grande controvérsia a respeito da sua eficácia e previsibilidade no tratamento da periodontite^{109,110}. Existe um intenso debate sobre alguns pontos importantes da TFDa que podem influenciar diretamente os resultados clínicos, como: tipo do laser, dose de energia utilizada, fluência e comprimento de onda selecionados, modelos dos aparelhos de lasers e protocolos de aplicações. Além disto, não existe um consenso sobre qual o fotossensibilizador mais adequado para cada situação ou ainda qual o melhor tempo de aplicação. Recentemente, a Academia Americana de Periodontologia estabeleceu que as evidências para suportar o uso da TFDa no tratamento da DP são insuficientes e conflitantes¹¹¹.

Até o presente momento, este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos da TFDa como adjuvante à RAR no tratamento da PA. 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 é o curto período de avaliação adotado. Seria interessante, em futuros estudos, o monitoramento dos pacientes por períodos maiores a fim de verificar se a terapia combinada (RAR+TFDa) pode sustentar as mudanças obtidas nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos a longo prazo.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a utilização de aplicações múltiplas da TFDa como recurso adjuvante à TPNC de pacientes com PA:

- i) melhora significativamente os parâmetros clínicos periodontais, reduzindo a necessidade de tratamentos periodontais adicionais;
- ii) elimina de forma mais eficaz periodontopatógenos dos complexos vermelho e laranja;
- iii) melhora os parâmetros imunoinflamatórios, reduzindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias e aumentando os níveis de citocinas anti-inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eke PI, Thornton-Evans G, Dye B, Genco R. Advances in surveillance of periodontitis: the Centers for Disease Control and Prevention periodontal disease surveillance project. *Journal of periodontology*. Nov 2012;83(11):1337-1342.
2. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*. Jun 1994;5:78-111.
3. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of periodontology*. Mar 1994;65(3):260-267.
4. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:108-129.
5. Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontology 2000*. 2004;36:121-145.
6. Gellin RG, Miller MC, Javed T, Engler WO, Mishkin DJ. The effectiveness of the Titan-S sonic scaler versus curettes in the removal of subgingival calculus. A human surgical evaluation. *Journal of periodontology*. Nov 1986;57(11):672-680.
7. Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontology 2000*. 2002;30:61-69.
8. Tribble GD, Lamont RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology 2000*. Feb 2010;52(1):68-83.
9. Armitage GC, Cullinan MP. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*. Jun 2010;53:12-27.
10. Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *Journal of periodontal research*. Aug 2000;35(4):232-241.
11. Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral microbiology and immunology*. Apr 2008;23(2):112-118.
12. Flemmig TF, Milian E, Karch H, Klaiber B. Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of clinical periodontology*. May 1998;25(5):380-387.
13. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontology 2000*. 2006;42:114-157.
14. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta odontologica Scandinavica*. Jun 2001;59(3):167-173.
15. Alexander MB, Damoulis PD. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Current opinion in periodontology*. 1994;39-53.
16. Schenkein HA, Barbour SE, Tew JG. Cytokines and inflammatory factors regulating immunoglobulin production in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*. 2007;45:113-127.
17. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostak L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. Aug 1991;18(7):548-554.
18. Hou LT, Liu CM, Rossomando EF. Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *Journal of clinical periodontology*. Feb 1995;22(2):162-167.

19. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. Jan 2002;29(1):48-53.
20. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*. Dec 2010;89(12):1349-1363.
21. de Lima Oliveira AP, de Faveri M, Gursky LC, et al. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *Journal of clinical periodontology*. Mar 2012;39(3):295-302.
22. Teles RP, Gursky LC, Faveri M, et al. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. Apr 2010;37(4):313-323.
23. Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T, Baka A, Konstantinidis A. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. Apr 2006;33(4):254-264.
24. Deas DE, Mealey BL. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontology 2000*. Jun 2010;53:154-166.
25. Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *Journal of periodontology*. May 1996;67(5):478-485.
26. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29 Suppl 3:136-159; discussion 160-132.
27. Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. *Journal of periodontology*. Nov 2004;75(11):1553-1565.
28. Herrera D, Alonso B, Leon R, Roldan S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of clinical periodontology*. Sep 2008;35(8 Suppl):45-66.
29. Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. Apr 2010;37(4):353-365.
30. Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T, Arakawa S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *Journal of periodontal research*. Oct 2002;37(5):324-332.
31. Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Journal of periodontology*. Oct 2003;74(10):1460-1469.
32. Kamma JJ, Nakou M, Gmur R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral microbiology and immunology*. Oct 2004;19(5):314-321.
33. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. May 1997;24(5):324-334.
34. Winkel EG, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*. Nov 1998;25(11 Pt 1):857-864.

35. Pallasch TJ. Antibiotic resistance. *Dental clinics of North America*. Oct 2003;47(4):623-639.
36. 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. *Journal of periodontology*. Jun 2007;78(6):965-973.
37. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. May 1993;28(3):204-210.
38. 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. *Photochemistry and photobiology*. Jun 1997;65(6):1026-1031.
39. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochemistry and photobiology*. Nov 2000;72(5):676-680.
40. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Mar 2003;47(3):932-940.
41. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *Journal of periodontology*. Oct 2004;75(10):1343-1349.
42. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*. Apr 2008;43(2):162-167.
43. 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. *Journal of periodontology*. Jan 2009;80(1):98-105.
44. Lulic M, Leiggener Gorog I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. Aug 2009;36(8):661-666.
45. 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 in medical science*. Mar 2012;27(2):389-395.
46. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*. Jan 2010;81(1):4-14.
47. 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. *Photomedicine and laser surgery*. Dec 2011;29(12):835-844.

48. Aykol G, Baser U, Maden I, et al. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *Journal of periodontology*. Mar 2011;82(3):481-488.
49. Arweiler NB, Pietruska M, Pietruski J, et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clinical oral investigations*. Feb 4 2014.
50. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. Dec 1999;4(1):1-6.
51. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *Journal of periodontology*. Jan 1972;43(1):38.
52. Ainamo J, Bay I. [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet*. Mar 1976;80(5):149-152.
53. Sampaio Edm. Azitromicina no tratamento da periodontite crônica-acompanhamento de seis meses. *Tese. Universidade de Guarulhos (Mestrado em Periodontia). Faculdade de Odontologia. Guarulhos*. 2009:71p.
54. Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. *Oral microbiology and immunology*. Mar 1989;4(1):41-46.
55. Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. Mar 2009;80(3):364-371.
56. Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral health & preventive dentistry*. 2003;1(1):7-16.
57. Bass CC. An effective method of personal oral hygiene; part II. *The Journal of the Louisiana State Medical Society : official organ of the Louisiana State Medical Society*. Mar 1954;106(3):100-112.
58. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. Feb 1998;25(2):134-144.
59. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *Journal of clinical periodontology*. Nov 1991;18(10):766-775.
60. Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA. Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *Journal of clinical periodontology*. Mar 1986;13(3):205-210.
61. Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. I. As observed in human biopsy material. *Journal of periodontology*. Jan 1978;49(1):1-8.
62. Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *Journal of periodontology*. Mar 1978;49(3):119-134.
63. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000*. 2006;42:180-218.
64. Fleischer HC, Mellonig JT, Brayer WK, Gray JL, Barnett JD. Scaling and root planing efficacy in multirrooted teeth. *Journal of periodontology*. Jul 1989;60(7):402-409.

-
65. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth to predict probing attachment loss. 5 years of observation following nonsurgical periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*. Feb 1990;17(2):102-107.
 66. Claffey N, Nylund K, Kiger R, Garrett S, Egelberg J. 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. *Journal of clinical periodontology*. Feb 1990;17(2):108-114.
 67. Claffey N, Egelberg J. Clinical indicators of probing attachment loss following initial periodontal treatment in advanced periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology*. Sep 1995;22(9):690-696.
 68. Matulienė G, Pjetursson BE, Salvi GE, et al. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *Journal of clinical periodontology*. Aug 2008;35(8):685-695.
 69. Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *Journal of periodontology*. Sep 1990;61(9):579-584.
 70. Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, et al. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *Journal of dental research*. Mar 2004;83(3):232-235.
 71. Beck JD, Koch GG, Rozier RG, Tudor GE. Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *Journal of periodontology*. Aug 1990;61(8):521-528.
 72. Beck JD, Koch GG, Zambon JJ, Genco RJ, Tudor GE. Evaluation of Oral Bacteria as Risk Indicators for Periodontitis in Older Adults. *Journal of periodontology*. Feb 1992;63(2):93-99.
 73. Silva-Senem MX, Heller D, Varela VM, Torres MC, Feres-Filho EJ, Colombo AP. 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. *Journal of clinical periodontology*. Mar 2013;40(3):242-251.
 74. Heller D, Varela VM, Silva-Senem MXE, Torres MCB, Feres EJ, Colombo APV. Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. *Journal of clinical periodontology*. Apr 2011;38(4):355-364.
 75. Colombo APV, Bennet S, Cotton SL, et al. 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. *Journal of periodontology*. Oct 2012;83(10):1279-1287.
 76. Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, et al. Comparisons of Subgingival Microbial Profiles of Refractory Periodontitis, Severe Periodontitis, and Periodontal Health Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *Journal of periodontology*. Sep 2009;80(9):1421-1432.
 77. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scandinavian journal of dental research*. Jan 1976;84(1):1-10.

-
78. van Winkelhoff AJ, de Groot P, Abbas F, de Graaff J. Quantitative aspects of the subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a patient with localized juvenile periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. Mar 1994;21(3):199-202.
 79. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Journal of clinical microbiology*. Dec 2007;45(12):3859-3869.
 80. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *Journal of periodontology*. Jan 2000;71(1):14-21.
 81. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *The Journal of applied bacteriology*. May 1995;78(5):569-574.
 82. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Archives of oral biology*. Nov 1992;37(11):883-887.
 83. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *Journal of periodontology*. Nov 2009;80(11):1790-1798.
 84. Jewett A, Hume WR, Le H, et al. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. *Infection and immunity*. Apr 2000;68(4):1893-1898.
 85. Uitto VJ, Baillie D, Wu Q, et al. *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells. *Infection and immunity*. Feb 2005;73(2):1171-1179.
 86. Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. Oct 2000;27(10):758-762.
 87. Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *Journal of bacteriology*. Nov 2009;191(22):6804-6811.
 88. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of Subgingival Microbial Complexes to Clinical-Features at the Sampled Sites. *Journal of clinical periodontology*. Aug 1988;15(7):440-444.
 89. Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A, Holletschke A, Pfister W, Schutze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *Journal of periodontology*. Jul 2010;81(7):975-981.
 90. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of dentistry*. Sep 2004;32(7):511-520.
 91. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. Jun 2008;35(6):507-513.
 92. Casarin RCV, Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti FH, Goncalves RB, Casati MZ. The Combination of Amoxicillin and Metronidazole Improves Clinical and

- Microbiologic Results of One-Stage, Full-Mouth, Ultrasonic Debridement in Aggressive Periodontitis Treatment. *Journal of Periodontology*. Aug 2012;83(8):988-998.
93. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral microbiology and immunology*. Feb 2006;21(1):12-20.
 94. Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *The Lancet infectious diseases*. Sep 2006;6(9):557-569.
 95. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19:683-765.
 96. Ford PJ, Gamonal J, Seymour GJ. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*. 2010;53:111-123.
 97. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:503754.
 98. Xavier M, de Souza RA, Pires VA, et al. Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. *Lasers in medical science*. Jan 2014;29(1):85-90.
 99. de Lima FM, Villaverde AB, Albertini R, et al. Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. *Lasers in surgery and medicine*. Jul 2011;43(5):410-420.
 100. Ren L, Jiang ZQ, Fu Y, Leung WK, Jin L. The interplay of lipopolysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *Journal of clinical periodontology*. Aug 2009;36(8):619-626.
 101. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of periodontology*. Mar 2007;78(3):566-575.
 102. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers in surgery and medicine*. 2002;30(1):60-66.
 103. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. Oct 2008;35(10):877-884.
 104. Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers in medical science*. Jan 2013;28(1):317-324.
 105. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *The Journal of clinical dentistry*. 2007;18(2):34-38.
 106. Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. Feb 2011;46(1):89-96.

-
107. Alwaeli HA, Al-Khateeb SN, Al-Sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers in medical science*. Sep 15 2013.
 108. Giannelli M, Formigli L, Lorenzini L, Bani D. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. Oct 2012;39(10):962-970.
 109. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of periodontology*. Sep 2008;79(9):1638-1644.
 110. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. Jul 2009;36(7):575-580.
 111. American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease. *Journal of periodontology*. Apr 2011;82(4):513-514.

ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Prof Dr. Michel Reis Messor e André Luís Gomes Moreira (mestrando em Periodontia), convidamos você, _____, a participar da pesquisa “Terapia Fotodinâmica antimicrobiana com aplicações múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no tratamento não cirúrgico da Periodontite Agressiva.” Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aplicação de um corante associado a uma luz laser modificada) como auxiliar no tratamento da Periodontite Agressiva. Antes de o estudo começar, você receberá instruções específicas de higiene oral e uma limpeza em todos os seus dentes.

Serão feitas fotografias e radiografias periapicais. Logo em seguida, em alguns elementos dentários (dentes teste), será executada uma descontaminação mecânica (raspagem e alisamento radicular) associada à Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (em quatro momentos ao longo de duas semanas). Outros dentes selecionados (dentes controle) receberão apenas raspagem e alisamento radicular. Ao longo do estudo, serão coletadas algumas informações clínicas (avaliação do sangramento gengival, da eficácia da sua escovação dentária e da severidade da doença periodontal) microbiológicas (coleta de bactérias aderidas nas raízes de seus dentes) e imunológicas (coleta do líquido existente entre a gengiva e a raiz de seus dentes) com a finalidade de documentação e avaliação dos resultados obtidos.

Você será acompanhado (a) por um período de 3 meses com a realização de limpezas dentárias quinzenais e, por isso garantiremos o ressarcimento de suas despesas decorrentes da sua participação nesta pesquisa (de acordo com item "IV.1 h" da Resolução do Conselho Nacional de Saúde- 196/1996). Ainda informamos que você tem direito a indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa (de acordo com item "IV. 1 i" da Resolução do Conselho Nacional de Saúde-196/1996).

Os procedimentos que poderão lhe causar incômodo são: exames clínicos, microbiológicos e imunológicos que serão realizados em sua boca, fotografias,

radiografias, raspagem e alisamento dos dentes e anestesia local. Os riscos que podem existir são os mesmos riscos atribuídos às pessoas que se submetem ao tratamento dos dentes e das gengivas e que necessitam de anestesia local. Todos os procedimentos necessários para diminuição dos riscos existentes serão cuidadosamente observados. Em caso de algum problema relacionado com a pesquisa você terá direito à assistência gratuita que será prestada pelos responsáveis pela pesquisa (de acordo com item "IV. 1 d" da Resolução do Conselho Nacional de Saúde - 196/1996).

Todos os dados relacionados com você serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados será realizada preservando sempre a sua identidade. Você será identificado (a) por um número ou apenas por suas iniciais, não tendo seu nome ou dados que lhe possa identificar revelados.

A sua participação não é obrigatória e você poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não participação neste projeto de pesquisa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Você poderá solicitar esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa sempre que julgue necessário. Este pedido poderá ser feito pessoalmente, antes ou durante a entrevista, ou depois dela, por telefone ou a partir dos contatos do pesquisador que existem no final deste documento. (de acordo com item "IV.1 e" da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196/1996).

Este documento foi elaborado em duas vias idênticas e deverá ser rubricado em todas as folhas e assinado na última página pelo participante da pesquisa e pesquisadores envolvidos. Você receberá uma via deste termo, com o endereço e telefone do pesquisador e da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP.

Eu, _____ após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais

serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Sujeito da pesquisa

RG.....

Telefone.....

Endereço.....

.....

Caso tenha alguma dúvida, você poderá entrar em contato.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria (Pesquisador Responsável)

Av. do Café s/no., CEP: 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brasil. Departamento CBTMF e

Periodontia- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP

(16) 3602-4140

André Luís Gomes Moreira (Pesquisador)

Av. do Café s/no., CEP: 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brasil. Departamento CBTMF e

Periodontia -Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP

(16) 3602-4092

Ana Aparecida Ferreira do Nascimento (Secretária do CEP)

Av. do Café s/no., CEP: 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brasil. Faculdade de

Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP

(16) 3602-3963

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM APLICAÇÕES MÚLTIPLAS ASSOCIADA À RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR NO TRATAMENTO NÃO-CIRÚRGICO DA PERIODONTITE AGRESSIVA.

Pesquisador:

Versão: Michel Reis Messoria

CAAE: 5

03679312.1.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 013978/2012

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

Adjunctive Photodynamic Therapy in the Management of Aggressive Periodontitis: a Split-mouth RCT

Journal:	<i>Journal of Clinical Periodontology</i>
Manuscript ID:	CPE-03-14-4985
Manuscript Type:	Randomized Clinical Trial
Date Submitted by the Author:	23-Mar-2014
Complete List of Authors:	MOREIRA, ANDRE; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Novaes Jr., Arthur; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology; Grisi, Márcio; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Taba, Mario, Jr; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Souza, Sergio; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Palioto, Daniela; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Oliveira, Paula Gabriela; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Casati, Marcio; School of Dentistry, Campinas State University, Department of Prosthodontics and Periodontics; School of Dentistry, Paulista University – UNIP, Dental Research Division Casarin, Renato; School of Dentistry, Paulista University – UNIP, Dental Research Division Messora, Michel; Ribeirao Preto School of Dentistry, University of Sao Paulo – USP, Departament of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology
Topic:	Treatment
Keywords:	Aggressive Periodontitis, Photodynamic Therapy, Photosensitizing, Microbiology, Cytokines
Main Methodology:	Clinical Trial

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

Adjunctive Photodynamic Therapy in the Management of Aggressive Periodontitis: a Split-mouth RCT

André L. G. Moreira¹, Arthur B. Novaes Jr.¹, Márcio F. M. Grisi¹, Mario Taba Jr.¹, Sérgio L. S. Souza¹, Daniela B. Palioto¹, Paula G. F. P. de Oliveira¹, Marcio Z. Casati^{2,3}, Renato C. Casarin², Michel R. Messoria¹

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

²Dental Research Division, School of Dentistry, Paulista University – UNIP, Sao Paulo, Brazil.

³Department of Prosthodontics and Periodontics, School of Dentistry, Campinas State University, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil.

Running title: aPDT in the treatment of Aggressive Periodontitis.

Keywords: Aggressive Periodontitis; Photodynamic Therapy; Photosensitizing; Microbiology; Cytokines.

Correspondence address

Prof. Dr. Michel R. Messori

Telephone: +55 16 3602 4135 / Fax: +55 16 3602 4788

Av. Cafe, s/n 14040-904

Ribeirao Preto / SP, Brazil

e-mail: m.messori@forp.usp.br

Conflict of Interest and Sources of Funding Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study. This study was financially supported by the Sao Paulo Research Foundation – FAPESP (protocol number 2012/13260-8).

Abstract

Aim: This randomized controlled clinical trial evaluated the effects of repeated applications of antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) adjunctive to scaling and root planing (SRP) in patients with generalized aggressive periodontitis (AgP).

Material and Methods: Using a split-mouth design, 20 patients with generalized AgP were treated with aPDT+SRP (Test Group) or SRP only (Control Group). aPDT was applied at four periods. All patients were monitored for 90 days. Clinical, microbiological and immunological parameters were statistically analyzed.

Results: In deep periodontal pockets analysis (Probing pocket depth–PPD $\geq$ 7mm at baseline), Test Group presented a decrease in PPD and a clinical attachment gain significantly higher than Control Group at 90 days ($p<0.05$). Test Group also

demonstrated significantly less periodontal pathogens of red and orange complexes and a lower ratio IL-1 β /IL-10 than Control Group ($p<0.05$).

Conclusion: Repeated aPDT adjunctive to SRP in the non-surgical treatment of AgP: i) significantly improves clinical periodontal parameters, reducing the need for further treatments; ii) eliminates periodontal pathogens of red and orange complexes more effectively and iii) enhances host immunoinflammatory response, decreasing the levels of proinflammatory cytokines and increasing the levels of anti-inflammatory cytokines (NCT02049008).

Clinical Relevance

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

Principal findings: Repeated aPDT adjunctive to non-surgical treatment of AgP significantly improves clinical periodontal parameters, eliminates periodontal pathogens more effectively and reduces the levels of proinflammatory cytokines.

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

Introduction

Aggressive Periodontitis (AgP) is characterized by rapid periodontal tissues destruction in young adults who are systemically healthy (Armitage & Cullinan 2010). It presents a microbiological profile predominantly composed of Gram-negative anaerobes, such as *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Eikenella corrodens* (Ec) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (Mullally et al. 2000, Faveri et al. 2008). These microorganisms induce an imbalance in immunoinflammatory host response through structural components (Flemmig et al. 1998, Fine et al. 2006), increasing the production of tissue inflammatory cytokines, for instance tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 (Seymour & Gemmell, 2001).

The management of AgP represents a challenge for clinicians because there are no standardized protocols for an efficient control of the disease (Xajigeorgiou et al. 2006). Treatment is traditionally focused on scaling and root planning (SRP) associated with effective supragingival plaque control (Deas & Mealey 2010). However, some patients still may experience continuous periodontal attachment loss (Danser et al. 1996). The European Federation of Periodontology and the American Academy of Periodontology suggest that patients with AgP may benefit from adjuvant systemic antimicrobial therapy (Herrera et al. 2002, Slots 2004, Herrera et al. 2008). However, it is important to emphasize that the use of systemic antibiotics may present some disadvantages, mainly related to the undesirable side effects and the increased risk of bacterial resistance (Pallasch 2003).

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has emerged as an enhance therapy to SRP and may become a new method for antimicrobial treatment of AgP (de Oliveira et

al. 2007). aPDT has been evaluated in *in vitro* and *in vivo* studies (Sarkar & Wilson 1993, Bhatti et al. 1997, Komerik et al. 2000, Komerik et al. 2003, Pfitzner et al. 2004, de Oliveira et al. 2007, Qin et al. 2008, de Oliveira et al. 2009, Lulic et al. 2009, Novaes et al. 2012). 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 (de Oliveira et al. 2007, Qin et al. 2008, de Oliveira et al. 2009).

Few clinical studies evaluated the potential of aPDT on treatment of AgP (de Oliveira et al. 2007, de Oliveira et al. 2009, Novaes et al. 2012). None of these studies analyzed the effects of aPDT as an adjunct to SRP. The frequency of aPDT episodes is also a crucial point that must be discussed. It is speculated that the effects of a single episode of aPDT may be insufficient to prevent recolonization of the treated sites, especially by *Tf* and *Pg*, as noted previously (Novaes et al. 2012). Repeated aPDT during the first week of non-surgical treatment may enhance the antimicrobial effects of the therapy, but there is limited scientific evidence supporting this concept in the treatment of AgP.

The aim of this study was to evaluate the effects of multiple applications of aPDT associated with SRP or SRP alone in patients with AgP.

Materials and Methods

Subject population

Twenty subjects were selected from the population referred to the Periodontal Clinic at School of Dentistry of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo (FORP-USP, Ribeirao

Preto, SP, Brazil). Subjects who fulfilled the inclusion criteria were invited to participate in the study (*ClinicalTrials.gov* ID: NCT02049008). All eligible subjects were thoroughly informed of the nature, potential risks and benefits of their participation in the study and signed a Term of Informed Consent. The study protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee at FORP-USP (No: 03679312.1.0000.5419). Research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements.

Sample size calculation

The patient was considered the study unit. The sample size was determined to provide 80% power 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 (de Oliveira et al. 2007) considering the changes in mean CAL 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 per group in this study was 20.

Inclusion and exclusion criteria

All subjects were diagnosed with generalized AgP (Armitage 1999). The inclusion criteria were as follows: i) good general health; ii) generalized interproximal attachment loss involving at least 3 teeth other than first molars and incisors; iii) microbial deposits inconsistent with the severity of periodontal destruction and iv) familial aggregation (that is, at least one other family member presenting or with a history of periodontitis-

PD). In addition, other inclusion criteria were adopted: i) ≤ 35 years of age; ii) a minimum of 20 teeth and iii) two pairs of single rooted contralateral teeth with proximal sites presenting probing pocket depth (PPD) and clinical attachment level (CAL) ≥ 5 mm.

The exclusion criteria were as follows: subgingival periodontal therapy or antibiotic treatment in the previous 6 months, systemic diseases that could affect the progression of PD (e.g. diabetes and immunological disorders), 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

This split-mouth double-masked randomized controlled clinical trial was conducted from October 2012 to January 2014. Before the study began, the subjects received full-mouth supragingival scaling and instructions on proper home-care techniques. Two pairs of single-rooted teeth with proximal sites presenting PPD and CAL ≥ 5 mm were selected for the clinical, microbiological and immunological evaluations. According to a predefined computer-generated balanced block randomization table with a 1:1 allocation, each pair of teeth selected was randomly assigned to the following treatments: SRP (Control Group) or SRP associated with multiple applications of aPDT (Test Group).

An investigator (M.R.M.) 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 (M.F.M.G.), who was masked in relation 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, was blinded to the treatment assignment. The designation of the groups was revealed only after the statistical analysis.

In both groups, SRP was performed using both hand instruments and ultrasonic device. Treatment of the entire oral cavity was completed within 48 hours. SRP was performed by one trained periodontist (A.L.G.M.) who was not informed about the treatment allocation. In Test Group, immediately after SRP procedure, the photosensitizer (Phenothiazine chloride-10 mg/mL-Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria) was applied from the bottom of periodontal pockets in a coronal direction. After 1 minute, pockets were rinsed. The diode soft laser light (Minilaser 2075F Helbo Photodynamic Systems) with a wavelength of 670 nm and a maximum power of 75 mW was subgingivally used. The irradiation was performed using an optical fiber probe of 0.6 mm in diameter (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems). Light was applied in six sites of each tooth. Each site was irradiated for 10 seconds (power density = 0.25 W/cm^2 , fluency per site = 2.49 J/cm^2 ; fluency per tooth = 14.94 J/cm^2). aPDT therapy was repeated after 2, 7 and 14 days. A simulation of aPDT was performed simultaneously in pairs of contralateral teeth (Control Group). Individuals received professional prophylaxis every 15 days for three months following non-surgical periodontal treatment. Prophylaxis protocol included oral hygiene re-instructions and polishing (as needed). All subjects were monitored for 90 days.

Examiner calibration

All clinical parameters were measured by a calibrated examiner (P.G.F.P.O). At two separate sessions 48 h 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 single rooted teeth with $PPD \geq 5$ 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 SRP. Plaque index (PI) (O'Leary et al. 1972) was employed to assess the oral hygiene status of the patients. Bleeding on probing (BOP) (Ainamo & 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 cementoenamel junction to the base of periodontal pocket. Gingival recession (GR) was measured from the cementoenamel 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).

Immunological monitoring

Gingival crevicular fluid (GCF) was collected from eight non-contiguous interproximal sites per subject using filter paper strips (Periopapers, Interstate Drug

Exchange,Amityville,NY,USA) at baseline, 14, 30 and 90 days after SRP as previously described by Luchesi et al. (2013). The amount of total protein of each sample was determined by conventional enzyme immunoassays (ELISA), using commercially available kits (DCTM Protein Assay,Bio-Rad Laboratories,Inc.,Berkeley,CA,USA). The levels of the cytokines IL-1 β , IL-10 and TNF- α in GCF samples were determined using high sensitivity available kits (HSCYTMAG-60SK-MilliplexmapTM,MerckHeadquarters Millipore,Billerica,MA,USA) and the multiplexing instrument (MAGPIX[®] analyzer,Luminex Corporation,Austin,TX,USA) according to the manufacturer's recommendations. The samples were individually evaluated and the concentrations of each cytokine were estimated from the standard curve using a five-parameter polynomial equation with specific software (Xponent[®] software,Luminex Corporation,Austin,TX,USA). A total of 640 samples were analyzed.

Microbiological monitoring

Subgingival plaque samples were collected at baseline, 30 and 90 days post-SRP from eight non-contiguous interproximal sites per subject. After the clinical parameters had been recorded, supragingival plaque was removed and subgingival samples were collected with individual sterile mini-Gracey curettes (#11–12) and immediately placed in separate Eppendorf tubes containing 0.15 ml of buffer solution (10mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH 7.6). One hundred microlitres 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 described previously by Mestnik et al. (2010). A total of 480 samples were analyzed.

Outcome variables

Changes in the mean CAL at 90 days post-SRP in deep periodontal pockets (initial PPD $\geq$ 7mm) were defined as the primary outcome variable of the study. Secondary outcome variables were differences between groups in the following parameters: PPD, GR, PI, BOP, counts and proportions of the 40 bacterial species analyzed, mean levels of each cytokine analyzed, mean ratio of IL-1 β /IL-10, 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-SRP.

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

Statistical analysis

Each clinical, microbiological and immunological parameter was computed per subject and then averaged across subjects in both groups. Changes in PPD, CAL, GR, proportions of microbial complexes and levels of cytokines over time were examined in subsets of sites according to initial PPD of 5-6mm (moderate periodontal pockets) or $\geq$ 7mm (deep periodontal pockets). The significance level was set at 5%. The significance of differences between groups for PPD, CAL and GR was determined using a Paired t-Test. Chi-Square Test was used to evaluate differences between groups

for BOP, PI, residual periodontal pockets, risk for PD progression and need for additional periodontal treatment. Repeated measures Analysis of Variance (PPD, CAL and GR) and Friedman Test (BOP and PI) were used to detect statistically significant differences within each group (over the course of the study).

Microbiological data were presented as mean counts ($\times 10^5$) 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.

Total protein values were converted to pg/mL. Final levels of the cytokines analyzed were obtained dividing the values resultant from the MAGPIX[®] system initially by the total protein content in GCF samples (pg/mL). IL-1 β /IL-10 ratio was also calculated for each group. Differences within groups in all experimental periods as well as differences between groups for mean levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 were assessed by two-way Analysis of Variance followed by *pot hoc* Bonferroni Test. Wilcoxon and Friedman tests were used to assess differences in IL-1 β /IL-10 ratio between and within groups, respectively.

Results

This study was started in October 2012 and ended in January 2014. Figure 1 presents the flow chart of the study design. All subjects successfully completed the study (Figure 1). Demographic characteristics of the sample are presented in Table 1. The

postoperative healing was uneventful in all cases. No adverse effects were observed with the use of aPDT.

Clinical monitoring

Means and standard deviations of PPD, CAL and GR are presented in Table 2. Absolute and relative frequencies of IP and BOP are presented in Table 3. No significant differences were observed between groups at baseline. All therapies led to a significant decrease in mean values of PPD, CAL and BOP ($p<0.05$). Analyzing deep periodontal pockets, Test Group presented reduction in PPD and gain in clinical attachment significantly different ($p<0.05$) from Control Group at 90 days (Table 2). Fewer subjects in Test Group ($n=7/35\%$) presented low risk for disease progression at 90 days in comparison with Control Group ($n=16/80\%$) (Table 3). The frequency of residual periodontal pockets was significantly lower ($p<0.05$) in the Test Group (Table 3).

Microbiological monitoring

In general, subjects presented high counts of periodontal pathogens such as *Aa* and species of orange and red complexes 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 ($\times 10^5$) of the 40 subgingival species evaluated. More species of orange and red complexes decreased in Test Group when compared with Control Group. Figure 3 shows changes in the proportions of microbial complexes at baseline and 90 days post-treatments in moderate and deep periodontal pockets. Microbial profiles were profoundly affected by

treatments, and the most beneficial changes were observed in subjects who received SRP and aPDT (Figures, 3A,3B).

Immunological monitoring

Figure 4 presents the entire distribution of mean values of GCF cytokines for all subjects in each group separately, considering moderate and deep periodontal pockets. No significant differences were observed between groups at baseline. There was considerable variability among individual sites in the treatment response. In deep periodontal pockets (Figure 4B), Test Group presented significantly lower mean levels of IL-1 β at 14, 30 and 90 days than Control Group ($p<0.05$). No significant differences between groups were observed in mean levels of IL-10 (Figures 4C,4D) and TNF- α (Figures 4E,4F) in moderate and deep periodontal pockets. Considering the ratio IL-1 β /IL-10 (Figures 4G,4H), Test Group presented values significantly lower ($p<0.05$) than Control Group at 14 days (moderate periodontal pockets) and 90 days (deep periodontal pockets).

Discussion

This controlled, randomized, double-blind, split-mouth clinical study evaluated the effects of SRP, associated or not with repeated aPDT, in subjects with generalized AgP, through clinical, immunological and microbiological analyses. The results showed that aPDT can be an effective adjuvant for the treatment of AgP.

Analysis of the clinical parameters showed that the combination SRP+aPDT promotes further reduction in PPD and clinical attachment gain in deep periodontal pockets as compared with SRP alone at 90 days. In general, these results were not observed in

moderate periodontal pockets. Two aspects should be considered regarding these findings. The first refers to the fact that an increase in PPD is related to a reduction in the effectiveness of SRP (Caffesse et al. 1986, Waerhaug 1978a, Waerhaug 1978b). Thus, aPDT can potentiate the effects of SRP in deep periodontal pockets, promoting the reduction of pathogenic bacterial species, since the penetration of the photosensitizer in epithelial and connective tissues (Komerik et al. 2003) may reach microorganisms that infiltrate through the epithelial barrier. The second aspect relates to the effects of reduced PPD on the need for further periodontal treatments and on the risk for PD progression. The present study demonstrated that the Test Group presented a percentage of residual periodontal pockets significantly lower than the Control Group at 90 days post-treatment. Residual pockets represent bacterial niches that can act as focus of reinfection. Elevated frequency of residual pockets is associated with a higher risk for PD progression (Lang & Tonetti 2003, Claffey et al. 1990, Claffey & Egelberg 1995). Therefore, periodontal stability is directly associated with a minimum number of residual pockets (Lang & Tonetti 2003). In this investigation, there was a greater number of patients with low risk for PD progression in Test Group than in Control Group.

There are difficulties in comparing the clinical results obtained in this study with other studies. Previous investigations (de Oliveira et al. 2009, de Oliveira et al. 2007, Novaes et al. 2012) assessed the effects of aPDT as a monotherapy on the treatment of AgP. Only in a recent study SRP was associated with aPDT to treat AgP (Arweiler et al. 2014). Thirty-six patients were randomly assigned to two groups. AB Group received amoxicillin (375mg) and metronidazole (250mg) for 7 days after SRP while aPDT Group received two applications of aPDT (at the time of SRP and 7 days

postoperatively). The average reduction of PPD in deep periodontal pockets was 2.2mm in aPDT Group and 3.9mm in AB group after 6 months (Arweiler et al. 2014). In our study, the mean reduction of PPD in Test Group at 3 months post-treatment was greater than the reduction occurred in aPDT Group at 6 months post-SRP in the study by Arweiler et al. (2014). Among other factors, these differences may be due to the frequency of applications of aPDT. While Arweiler et al. (2014) performed two sessions of aPDT, we executed 4 episodes of aPDT and the last time point was at 14 days post-SRP. This might have delayed the recolonization of treated pockets by periodontal pathogens. According to Sbordone et al. (1990), SRP presents short-term effects and the recolonization of treated pockets by potential periodontal pathogens can be observed 3 weeks post-SRP. In this context, aPDT can represent an alternative to the use of systemic antibiotics in the treatment of aggressive forms of PD unresponsive to conventional therapy.

The clinical results observed in this study may be supported somehow by microbiological and immunological findings. Concerning microbiological parameters, Test Group presented reduced proportions of *Aa* (moderate pockets-30 days) and orange and red complexes bacteria (deep pockets-90 days) when compared with Control Group. 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 (Beck et al. 1992, Silva-Senem et al. 2013). The ability of aPDT to eliminate periodontal pathogens has been proven by some *in vitro* studies (Sarkar & Wilson 1993, Wilson et al. 1995, Dobson & Wilson 1992, Pfitzner et al. 2004). aPDT may also inactivate bacterial proteases (Braham et al., 2009), thereby reducing the pathogenicity of some bacterial strains. It is important to emphasize that the reduction in Fn counts (orange complex) may be a critical step for a

successful periodontal therapy (Sigusch et al. 2010). The most important function of *Fn* in subgingival bacterial biomass appears to be its capacity to facilitate the co-aggregation of other periodontal pathogens, such as *Aa*, *Pg* and *Tf* (Periasamy & Kolenbrander 2009, Socransky et al. 1988).

The percentage of host-compatible species was also affected by aPDT in this study. In the Test Group, proportions of *Actinomyces* species (blue complex) were significantly higher than in the Control Group. In fact, besides the reduction of periodontal pathogens, an increase of beneficial species is important for a successful periodontal treatment (Teles et al. 2010). In this study, the increase in the proportion of blue complex species observed in deep periodontal pockets in the Test Group after 90 days, was similar to that obtained by Mestnik et al. (2010) when systemic antimicrobials were associated with SRP in the treatment of AgP.

Regarding immunological parameters, Test Group presented a ratio IL-1 β /IL-10 significantly lower than Control Group at 14 and 90 days in moderate and deep pockets, respectively. In fact, some studies suggest that the imbalance between these cytokines can be associated with the onset and progression of AgP (Teles et al. 2010, Goutoudi et al. 2004). The elevated ratio IL-1 β /IL-10 in GCF may be related to high proportions of periodontal pathogens of red and orange complexes (Sarkar & Wilson 1993). In this context, the reduced counts of periodontal pathogens observed in Test Group may have indirectly contributed to a lower expression of proinflammatory cytokines. It is also possible that aPDT reduced the potential of lipopolysaccharides (LPS) to stimulate the release of proinflammatory cytokines (Komerik et al. 2000). In addition, it is important to emphasize that experimental studies in animal models (Xavier et al. 2014, de Lima et al. 2011) showed that low level laser can increase the mRNA expression of IL-10, type-

I collagen, type-III collagen and reduce the expression of TNF- α and IL-1 β in the acute phase of inflammation.

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate clinical, microbiological and immunological effects of repeated aPDT as an adjunctive to SRP in the management of AgP. A split-mouth design was chosen so that each individual could be its own control and hence reduce the inter-individual variability in periodontal immunoinflammatory responses. A limitation of the current study is the short-term evaluation period. Longitudinal monitoring of these subjects is essential to determine whether the combination aPDT+SRP would produce sustained beneficial changes in the parameters analyzed over time. Nevertheless, it has been suggested that short-term changes in the microbial profile may determine long-term periodontal clinical stability (Haffajee 2003, Mestnik et al 2010).

This study demonstrated encouraging results regarding the use of aPDT in the treatment of PD. Nevertheless, many controversies regarding the effectiveness and predictability of this therapy remain (Christodoulides et al. 2008, Polansky et al. 2009). Recently, the American Academy of Periodontology (2011) established that the evidences to support the use of aPDT in the treatment of PD are insufficient and conflicting.

It may be concluded that the use of repeated aPDT adjunctive to SRP provides short-term additional clinical, microbiological and immunological advantages in the treatment of AgP.

Acknowledgements

The authors thank Izilvânia Barros and Professor Luciene Figueiredo (Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, Sao

Paulo, Brazil) for their expertise in conducting the microbiological analysis. The authors also thank Professor Flávia Furlaneto (Division of Periodontics, Department of Surgery and Integrated Clinic, Dental School of Araçatuba, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, Sao Paulo, Brazil) for her support during prepare of this manuscript.

References

- (2011) American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease. *Journal of Periodontology* **82**, 513-514.
- Ainamo, J. & Bay, I. (1976) [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet* **80**, 149-152.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology/ the American Academy of Periodontology* **4**, 1-6.
- Armitage, G. C. & Cullinan, M. P. (2010) Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **53**, 12-27.
- Arweiler, N. B., Pietruska, M., Pietruski, J., Skurska, A., Dolinska, E., Heumann, C., Ausschil, T. M. & Sculean, A. (2014) Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clinical oral investigations* **4** [Epub ahead of print].
- Beck, J. D., Koch, G. G., Zambon, J. J., Genco, R. J. & Tudor, G. E. (1992) Evaluation of Oral Bacteria as Risk Indicators for Periodontitis in Older Adults. *Journal of Periodontology* **63**, 93-99.
- 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. *Photochemistry and photobiology* **65**, 1026-1031.
- Braham, P., Herron, C., Street, C. & Darveau, R. (2009) Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *Journal of Periodontology* **80**, 1790-1798.
- Caffesse, R. G., Sweeney, P. L. & Smith, B. A. (1986) Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *Journal of Clinical Periodontology* **13**, 205-210.
- 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. *Journal of Periodontology* **79**, 1638-1644.
- 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. *Journal of Periodontology* **80**, 364-371.

- Claffey, N. & Egelberg, J. (1995) Clinical indicators of probing attachment loss following initial periodontal treatment in advanced periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **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. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 108-114.
- 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. *Journal of Periodontology* **67**, 478-485.
- de Lima, F. M., Villaverde, A. B., Albertini, R., Correa, J. C., Carvalho, R. L., Munin, E., Araujo, T., Silva, J. A. & Aimbire, F. (2011) Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. *Lasers in surgery and medicine* **43**, 410-420.
- 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. *Journal of Periodontology* **80**, 98-105.
- de Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B., Jr. & Taba, M., Jr. (2007) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *Journal of Periodontology* **78**, 965-973.
- 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.
- Dobson, J. & Wilson, M. (1992) Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Archives of Oral Biology* **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 microbiology and immunology* **23**, 112-118.
- 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. *Periodontology 2000* **42**, 114-157.
- 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*. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 380-387.
- Goutoudi, P., Diza, E. & Arvanitidou, M. (2004) Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of Dentistry* **32**, 511-520. doi:10.1016/j.jdent.2004.04.003.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *The American Academy of Periodontology* **8**, 115-181.
- 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. *Journal of Dental Research* **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. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 45-66.
- 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. *Journal of Clinical Periodontology* **29 Suppl 3**, 136-159; discussion 160-132.
- 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**, 932-940.
- Komerik, N., Wilson, M. & Poole, S. (2000) The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochemistry and photobiology* **72**, 676-680.
- Lang, N. P. & Tonetti, M. S. (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral health & preventive dentistry* **1**, 7-16.
- Luchesi, V. H., Pimentel, S. P., Kolbe, M. F., Ribeiro, F. V., Casarin, R. C., Nociti, F. H. Jr., Sallum, E. A. & Casati, M. Z. (2013) Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 781-788.
- 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. *Journal of Clinical Periodontology* **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. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 885-896.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Lira, E. A. & Faveri, M. (2010) Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 353-365.
- Mullally, B. H., Dace, B., Shelburne, C. E., Wolff, L. F. & Coulter, W. A. (2000) Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **35**, 232-241.
- 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 in medical science* **27**, 389-395.
- O'Leary, T. J., Drake, R. B. & Naylor, J. E. (1972) The plaque control record. *Journal of Periodontology* **43**, 38.
- Pallasch, T. J. (2003) Antibiotic resistance. *Dental clinics of North America* **47**, 623-639.

- Periasamy, S. & Kolenbrander, P. E. (2009) Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *Journal of bacteriology* **191**, 6804-6811.
- Pfitzner, A., Sigusch, B. W., Albrecht, V. & Glockmann, E. (2004) Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *Journal of Periodontology* **75**, 1343-1349.
- Polansky, R., Haas, M., Heschl, A. & Wimmer, G. (2009) Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 575-580.
- Qin, Y. L., Luan, X. L., Bi, L. J., Sheng, Y. Q., Zhou, C. N. & Zhang, Z. G. (2008) Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research* **43**, 162-167.
- Sarkar, S. & Wilson, M. (1993) Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **28**, 204-210.
- Sbordone, L., Ramaglia, L., Gulletta, E. & Iacono, V. (1990) Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *Journal of Periodontology* **61**, 579-584. doi:10.1902/jop.1990.61.9.579.
- Seymour, G. J. & Gemmell, E. (2001) Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta odontologica Scandinavica* **59**, 167-173.
- Sigusch, B. W., Engelbrecht, M., Volpel, A., Holletschke, A., Pfister, W. & Schutze, J. (2010) Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **81**, 975-981.
- 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. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 242-251.
- Slots, J. (2004) Systemic antibiotics in periodontics. *Journal of Periodontology* **75**, 1553-1565.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D. & Dzink, J. L. (1988) Relationship of Subgingival Microbial Complexes to Clinical-Features at the Sampled Sites. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 440-444.
- 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, R. P., Gursky, L. C., Faveri, M., Rosa, E. A., Teles, F. R., Feres, M., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2010) Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 313-323.
- Waerhaug, J. (1978a) Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. I. As observed in human biopsy material. *Journal of Periodontology* **49**, 1-8. doi:10.1902/jop.1978.49.1.1.

- Waerhaug, J. (1978b) Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *Journal of Periodontology* **49**, 119-134.
- Wilson, M., Burns, T., Pratten, J. & Pearson, G. J. (1995) Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *The Journal of applied bacteriology* **78**, 569-574.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A. & Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254-264.
- Xavier, M., de Souza, R. A., Pires, V. A., Santos, A. P., Aimbire, F., Silva, J. A., Jr., Albertini, R. & Villaverde, A. B. (2014) Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. *Lasers in medical science* **29**, 85-90.

Figure Legends

Figure 1 – Flow chart of the study design.

Figure 2 – Mean counts ($\times 10^5$) of 40 bacterial species in Control and Test groups at baseline, 30 and 90 days post-SRP, and the 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 at 30 (*) and 90 (Ψ) days; Test Group at 30 (†) and 90 (Φ) days. Wilcoxon Test ($p < 0.0012$ for oral species and $p < 0.002$ for non-oral species). SRP=scaling and root planing.

Figure 3 – Pie charts of mean proportions of each microbial complex at baseline, 30 and 90 days post-SRP in Test and Control groups considering moderate (A) and deep periodontal pockets (B). The colors represent different microbial complexes (Socransky et al. 1998). The light green color represents the proportion of *Aa*. †Significant difference when compared to baseline; * Significant difference between groups in the same period of analysis. Paired t-test ($p < 0.05$). SRP=scaling and root planing.

Figure 4 – Mean levels (pg/mL) and standard deviations of IL-1β, IL-10 and TNF-α in Control and Test groups at baseline, 14, 30 and 90 days post-SRP considering moderate (A, C and F) and deep (B, D and F) periodontal pockets. IL-1β/IL-10 ratios in both groups are depicted in G (moderate periodontal pockets) and H (deep periodontal pockets). *†Significant difference when compared to baseline (* Two way ANOVA,

Bonferroni *post hoc* Test; [†]Friedman Test, $p<0.05$); ^{¥,¶}Significant difference between groups in the same period of analysis ([¥]Two way ANOVA, Bonferroni *post hoc* Test; [¶]Wilcoxon Test, $p<0.05$). SRP=scaling and root planing.

Table 1 – Demographic characteristics of subject population at baseline.

Variable	All Mean $\pm$ DP	Experimental Groups	
		Control	Test
Number of subjects	20		
Age	30.6 $\pm$ 4.25		
Gender (F/M)	18/02		
Number of teeth at baseline	23.75 $\pm$ 2.72		
Number of lateral incisors		22	22
Number of canines		16	15
Number of premolars		2	3
Number of periodontal pockets at baseline			
PPD = 5 mm		77	92
PPD = 6 mm		21	18
PPD $\geq$ 7 mm		30	25

F = female; M = male; PPD=probing pocket depth; SD=standard deviation.

Table 2 – Means and standard deviations of PPD, CAL and GR in Test and Control groups at baseline, 30 and 90 days post-SRP, and the results of intra and intergroup comparisons.

VARIABLE	TIME POINT	EXPERIMENTAL GROUPS		Intergroup comparisons (Paired t Test)		
		Control	Test	Mean difference	CI 95%	p value
		N=20	N=20			
		Mean ± SD	Mean ± SD			
PPD (mm)						
Moderate pockets	Baseline	5.22 ± 0.35	5.32 ± 0.34	0.10	-0.3248 a 0.1248	NS
	30 days	3.32 ± 0.81*	3.08 ± 0.88*	-0.2375	-0.3078 a 0.7828	NS
	90 days	3.07 ± 0.68*	2.91 ± 0.45*	-0.1660	-0.2076 a 0.5396	NS
Deep pockets	Baseline	7.68 ± 0.92	7.73 ± 0.87	0.04327	-0.7887 a 0.7022	NS
	30 days	5.94 ± 1.22*	5.14 ± 1.01*	-0.7965	-0.1344 a 1.727	NS
	90 days	5.12 ± 0.80*	3.77 ± 0.97*	-1.356	0.6130 a 2.099	0.0019
CAL (mm)						
Moderate pockets	Baseline	5.41 ± 0.90	5.38 ± 0.93	-0.02500	-0.4237 a 0.4737	NS
	30 days	4.10 ± 1.03*	3.63 ± 1.15*	-0.4625	-0.2401 a 1.165	0.0376
	90 days	3.83 ± 1.07*	3.85 ± 0.91*	0.0165	-0.6554 a 0.6224	NS
Deep pockets	Baseline	7.75 ± 1.21	7.84 ± 0.89	0.1538	-1.046 a 0.7384	NS
	30 days	6.16 ± 1.11*	5.76 ± 1.01*	-0.3534	-0.5806 a 1.287	NS
	90 days	6.00 ± 1.04*	5.07 ± 0.64*	-1.051	0.3990 a 1.703	0.0046
GR (mm)						
Moderate pockets	Baseline	0.18 ± 0.72	0.06 ± 0.27	-0.1250	-0.2287 a 0.4787	NS
	30 days	0.77 ± 0.74*	0.60 ± 0.92*	-0.1750	-0.3538 a 0.7038	NS
	90 days	0.75 ± 0.91*	0.93 ± 1.04*	0.1825	-0.8099 a 0.4449	NS
Deep pockets	Baseline	0.08 ± 0.64	0.15 ± 0.98	-0.1154	-0.5871 a 0.8179	NS
	30 days	0.23 ± 0.72	0.69 ± 0.94	-0.4677	-0.2037 a 1.139	NS
	90 days	0.92 ± 0.86*	1.15 ± 0.69*	-0.07000	-0.4996 a 0.6396	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 3 – Absolute and relative frequencies for PI, BOP, “residual periodontal pocket”, “need for additional periodontal treatment” and "risk for PD progression" in Test and Control groups, and the results of intra and intergroup comparisons.

VARIABLE	EXPERIMENTAL GROUPS		Chi-Square Test	
	Control	Test	Relative	<i>p</i> value
	N=20	N=20	risk	
	Number (%)	Number (%)		
PI				
Baseline	40 (25.00)	36 (22.50)	0.9321	NS
30 days	10 (6.25)	12 (7.50)	1.098	NS
90 days	16 (10.00)	22 (13.75)	1.183	NS
BOP				
Baseline	154 (64.16)	144 (60.00)	0.9161	NS
30 days	69 (28.75)*	26 (10.83)*	0.4924	< 0.001
90 days	36 (15.00)*	22 (13.75)*	1.000	NS
Residual periodontal pockets	35 (27.34)	14 (10.37)	0.5053	0.0004
Need for additional periodontal treatment	13 (65.00)	7 (35.00)	0.5385	0.0564
Risk for PD progression				
Low	7 (35.00)	16 (80.00)	2.957	0.0040
Moderate	9 (45.00)	3 (15.00)	0.4118	0.0384
High	4 (20.00)	1 (5.00)	0.684	NS

PI=plaque index; BOP=bleeding on probing; PD=periodontitis; NS=no significant difference. *Significant difference when compared to baseline (Friedman Test, $p<0.05$).

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4