Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Pós-Graduação em Periodontia

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA ANTIMICROBIANA FOTODINÂMICA NA
MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOINFLAMATÓRIA E CICATRICIAL DOS
TECIDOS PERIODONTAIS. ESTUDO CLÍNICO, CONTROLADO E
RANDOMIZADO EM PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA.**

PATRÍCIA FREITAS DE ANDRADE

Ribeirão Preto

2010

Patrícia Freitas de Andrade

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA ANTIMICROBIANA FOTODINÂMICA NA
MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOINFLAMATÓRIA E CICATRICIAL DOS
TECIDOS PERIODONTAIS. ESTUDO CLÍNICO, CONTROLADO E
RANDOMIZADO EM PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA.**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto – USP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutora
em Periodontia.

Ribeirão Preto

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

ANDRADE, PATRÍCIA FREITAS DE

Avaliação da terapia antimicrobiana fotodinâmica na modulação das respostas imunoinflamatória e cicatricial dos tecidos periodontais. Estudo clínico, controlado e randomizado em pacientes com Periodontite Crônica. Ribeirão Preto, 2010.

130 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: de Souza, Sérgio Luís Scombatti.

1. Doenças periodontais/terapia.
2. Terapia fotodinâmica.
3. Laser.
4. Agentes fotosensibilizadores.

Nome: ANDRADE, PF

Título: Avaliação da terapia antimicrobiana fotodinâmica na modulação das respostas imunoinflamatória e cicatricial dos tecidos periodontais. Estudo clínico, controlado e randomizado em pacientes com Periodontite Crônica.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Periodontia.

Aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Doutora Patrícia

Naquela imensa sala da faculdade
Vi um gesto puro de humildade
No rosto de uma jóia divina
Era o gesto meigo de uma flor
Traduzindo a todos o seu valor
Com suas mãos leves de menina

Dizem que ser pequeno não é defeito
Ela faz tudo tão perfeito
Que exala carinho ao seu redor
Com a doce voz de um anjinho
Tratando a todos com carinho
Ela é tudo o quanto há de melhor

Disse-me que é mineira
Mas sua bondade altaneira
Parece que veio do infinito
És a beleza pura de um ser humano
É por querê-la bem que estou falando
Eu a vejo como um anjo de Deus bendito

Seu nome ficará na história
Eu te desejo imensa glória
Nesta sua vida promissora
És doce, amável e inteligente
Trata com afago seus pacientes
Por isso te venero, graciosa Doutora

Tu és a graciosa boneca viva
A vitória régea nativa
No jardim de um sonhador
És a rainha de um grande templo
Para todos nós um farto exemplo
De paz, carinho e amor.

João Neto

(Poesia que ganhei de presente de um paciente da tese, tendo um grande significado em minha vida.)

DEDICATÓRIA

Aos meus **pacientes**

Agradeço-lhes muito pela confiança em meu trabalho, permitindo-me compreender melhor a Odontologia e, principalmente, encantar-me com a grandeza do ser humano.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por permitir que eu usufrua da beleza que é o exercício desta profissão, por me ensinar que através da fé tudo é possível e por colocar pessoas tão especiais e iluminadas em minha vida.

Ao meu **anjo da guarda** pela certeza de estar sempre ao meu lado, guiando-me pelo caminho do bem e protegendo-me.

Aos meus **pais**, meus exemplos de bondade, dignidade e luta. Agradeço pelo apoio incondicional, por me ajudarem a realizar os meus sonhos e, principalmente, por acreditarem neles.

Ao **Luiz Felipe**, meu grande e verdadeiro amor, pelo companheirismo, paciência, apoio e por tornar a minha vida mais prazerosa e doce.

À minha **família** por todo o amor, respeito e apoio.

Ao **Tônico** e à **Doly** pela atenção e por cuidarem tão bem dos meus pais, fazendo-os muito felizes.

À **família Puntel** pelo grande carinho, atenção, acolhimento e por enriquecerem tanto a minha vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pela sua competência e inteligência que o tornam um grande pesquisador, pela amizade que nasceu durante o período de pós-graduação e, principalmente, pela confiança em mim e no meu trabalho.

Ao **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior** pelo carinho sempre demonstrado, pela confiança em meu trabalho e incentivo à minha formação como pesquisadora.

À **Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto Bulle** pela co-orientação desta pesquisa, pelo respeito, confiança, oportunidades, trocas de experiências e, principalmente, pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi** por compartilhar todo o seu conhecimento, confiança em meu trabalho, oportunidades e carinho demonstrado. Ser sua orientada na clínica durante o mestrado e o doutorado foi uma experiência muito enriquecedora e gratificante.

Ao **Prof. Dr. Mário Taba Júnior** pela atenção, respeito e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet** (FOB-USP), **Prof. Dr. João Santana da Silva** (FMRP-USP), funcionária **Cristiane Milanezi** (FMRP-USP), alunos de pós-graduação **Cássio do Nascimento** (FORP-USP), **Fabrine S. M. Tristão** (FMRP-USP), **Fernanda A. Rocha** (FMRP-USP), **Patrícia Garani Fernandes** (FORP-USP), **Andrea Marcaccini** (FORP-USP), **Sandra Sato** (FORP-USP), bióloga **Izilvânia Barreto** (UNG) e funcionária **Fabíola S. de Oliveira** (FORP-USP). Vocês foram imprescindíveis para a realização desta pesquisa. Muito obrigada!

À **Dulce de Oliveira Negretti** e **Tatiana Angeli Passos Fernandes**, secretárias do depto. de CTBMF e Periodontia, pela inestimável e constante ajuda, carinho e confiança sempre demonstrados e, principalmente, pela amizade sincera.

Aos colegas da pós-graduação em Periodontia, **Rafael**, **Guilherme**, **Raquel**, **Germana**, **Adriana**, **Annelissa**, **Priscila Nóbrega**, **Priscila Paganini**, **Flávia**, **Luciana Bastos**, **Patrícia Garani**, **Danilo**, **Luciana Maia**, **Ingrid**, **Karina**, **Dânia**, **Andrea**, **Joseane** e **Janine**, pela amizade e companheirismo.

Ao **João Moura** por toda amizade, carinho, respeito e por estar comigo, principalmente, nos momentos difíceis da minha vida.

Às funcionárias da clínica de especialização da FORP-USP, **Sueli Cooke Militello** e **Zilda Fernandes**, por toda atenção e por contribuírem para o bom funcionamento da clínica de especialização, sempre nos ajudando.

Às secretárias da seção de pós-graduação, **Isabel C. Galino Sola** e **Regiane Cristina Moi Sacilotto**, pela inestimável eficiência, atenção, disposição e cordialidade.

Ao **Prof. Dr. José Eustáquio da Costa** (UFMG) pelo carinho, confiança em meu trabalho e pela oportunidade de trabalhar junto à especialização de Periodontia da UFMG.

Aos **Professores de Periodontia** (PUC-MG, UFMG, USP-Bauru e APCD-Bauru) por todos os ricos ensinamentos transmitidos e por servirem de exemplo e incentivo para que eu realizasse a pós-graduação.

Às minhas grandes amigas-irmãs, **Camila, Cecília, Carol, Thaís, Marcela, Mariana e Cristina**, por todo o apoio e amizade.

À **CAPES** pelo recurso financeiro através da bolsa de pós-graduação.

À **FAPESP** pelo financiamento desta pesquisa (processo: 07/04916-9).

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO	12
2. PROPOSIÇÃO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 MATERIAL E MÉTODOS – TESTE ELISA.....	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS – REAL-TIME PCR.....	36
4. RESULTADOS	39
4.1 RESULTADOS – TESTE ELISA	40
4.2 RESULTADOS – REAL-TIME PCR	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	78
ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	78
ANEXO 2 - Artigo 1: Title: Effects of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal repair: a randomized clinical trial.	79
ANEXO 3 - Artigo2: Title: Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to scaling and root planning in modulation of gene expression. A randomized controlled clinical study.	104

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi analisar o efeito adjunto da terapia antimicrobiana fotodinâmica (aPDT) aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR) na modulação das respostas imunoinflamatória e cicatricial dos tecidos periodontais, através de análises imunoenzimática e de expressão gênica.

Material e Métodos: Foram selecionados 15 pacientes portadores de Periodontite Crônica, apresentando dentes molares inferiores bilaterais com lesões de bifurcação classe III e indicados para extração. Cada par de dentes foi dividido aleatoriamente em grupo controle (GC), no qual foi realizada a RAR, e em grupo teste (GT), no qual além da RAR, foi realizada a aPDT. Previamente à execução desta terapia inicial básica (baseline: tempo 0), amostras de fluido crevicular gengival (FCG) foram coletadas, visando à determinação dos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β), metaloprotease-8 (MMP-8), osteoprotegerina/ligante do receptor de ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$ (OPG/RANKL) e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) através do teste Elisa. Após 45 dias da realização da terapia inicial (tempo 1), coletou-se novas amostras de FCG e, em seguida, foram realizadas cirurgias a retalho associadas à RAR no GC, enquanto no GT, as cirurgias a retalho foram associadas à RAR + aPDT. Após 21 dias de pós-operatório (tempo 2), amostras de FCG foram novamente coletadas, os tecidos de granulação neoformados no interior das lesões de bifurcação classe III foram removidos e armazenados para extração do RNA total e análise através do Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) e os dentes foram devidamente extraídos. O Real-Time PCR avaliou quantitativamente os níveis de mRNAs dos seguintes genes: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), metaloproteinase-2 (MMP-2), inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2),

osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor de ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL), colágeno tipo I (COL I), fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) e sialoproteína óssea (BSP).

Resultados: Teste Elisa: Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à concentração de TGF- β no FCG 45 dias após a terapia inicial básica (GT = 38,35pg/ μ l $\pm$ 71,56pg/ μ l; GC = 5,92pg/ μ l $\pm$ 11,14pg/ μ l; $p=0,04$), bem como em relação ao volume de FCG 21 dias após a realização das cirurgias a retalho (GT = 2,34 μ l $\pm$ 1,81 μ l; GC = 3,04 μ l $\pm$ 2,00 μ l; $p=0,03$), a favor do GT. Em ambos os grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tempos de avaliação em relação às quantidades e concentrações de IL-1 β , MMP-8, relação OPG/RANKL e TGF- β no FCG.

Real-Time PCR: Quanto à análise de expressão gênica, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos somente para os níveis de mRNAs da MMP-2 (GT = 3,26 $\pm$ 0,89; GC = 4,23 $\pm$ 0,97; $p=0,01$), relação entre TIMP-2/MMP-2 (GT = 0,91 $\pm$ 0,34; GC = 0,73 $\pm$ 0,32; $p=0,04$), OPG (GT = 0,84 $\pm$ 0,45; GC = 0,30 $\pm$ 0,26; $p=0,001$) e também entre a relação OPG/RANKL (GT = 0,60 $\pm$ 0,86; GC = 0,23 $\pm$ 0,16; $p=0,04$), favorendo também o GT.

Conclusão: O protocolo de aPDT utilizado neste estudo e associado aos procedimentos de RAR foi capaz de modular as respostas imunoinflamatória e cicatricial dos tecidos periodontais, através do aumento da concentração de TGF- β no FCG 45 dias após a terapia inicial básica e da diminuição do volume de FCG e aumento dos níveis de mRNAs de TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL 21 dias após a realização das cirurgias a retalho.

1. INTRODUÇÃO

A Periodontite, doença de etiologia bacteriana, ocorre quando há um desequilíbrio entre os microrganismos periodontopatógenos e a resposta de defesa do hospedeiro. Este desequilíbrio é caracterizado pela exacerbação da resposta inflamatória e imunológica, frente à ação da placa microbiana. As bactérias Gram-negativas, através de seus componentes microbianos, especialmente os lipopolissacarídeos (LPS), bem como através de seus produtos residuais e enzimas, estimulam as células presentes nos tecidos periodontais a sintetizar citocinas inflamatórias e imunorreguladoras, como TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IL (interleucina) -1 α , IL-1 β , INF- γ (interferon- γ), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-13.¹⁻⁶ Estudos têm sugerido que a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nos tecidos periodontais seja um fator relevante para a determinação do curso e/ou severidade da doença, provavelmente, regulando o balanço entre as MMPs (metaloproteases da matriz) e os TIMPs (inibidores teciduais das metaloproteases), bem como entre o RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$) e a OPG (osteoprotegerina).^{1,2,7} O balanço entre as MMPs e os TIMPs está relacionado à destruição de tecido conjuntivo, enquanto o balanço entre RANKL e OPG está relacionado à reabsorção óssea alveolar.^{1,2,3,7}

As MMPs, enzimas encontradas nos tecidos periodontais e no fluido crevicular gengival, estão envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular, desempenhando um importante papel em processos fisiológicos e patológicos.⁸ A atividade das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas (TIMPs) capazes de inibir praticamente todos os membros da família das MMPs de forma não específica.⁹ Acredita-se que o balanço entre as MMPs e TIMPs esteja relacionado ao turnover fisiológico dos tecidos periodontais, assim como à destruição tecidual verificada na doença periodontal.¹⁰⁻¹³ Em

condições fisiológicas, os TIMPs estão em balanço com as MMPs, sendo a matriz extracelular remodelada de maneira extremamente controlada. Contudo, na doença periodontal, verifica-se a elevação dos níveis de MMPs, sem o concomitante aumento na expressão dos TIMPs, o que determina a atividade proteolítica e leva à degradação de tecido conjuntivo.¹⁴

A MMP-2, por exemplo, é uma gelatinase (também chamada de collagenase do tipo IV), que tem um importante efeito na destruição do tecido conjuntivo. Ela degrada colágeno tipo IV, proteína mais importante da membrana basal, e colágeno desnaturado tipo I, proteína mais importante dos tecidos periodontais.¹⁵⁻¹⁷ É produzida por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, monócitos/macrófagos e osteoblastos.¹⁸ Maiores níveis de mRNA para a produção de MMP-2 podem ser encontrados em sítios inflamados (menor % de colágeno) versus sítios não inflamados (maior % de colágeno), corroborando a contribuição desta molécula na patogênese da doença periodontal.¹⁹ Na ausência de inflamação, a MMP-2 é expressa em baixas quantidades, contudo na Periodontite, ocorre aumento da sua produção nos tecidos periodontais, o que potencializa a destruição do colágeno.¹⁸ O fumo, por exemplo, provoca aumento dos níveis de MMP-2, o que pode explicar a maior progressão da doença periodontal nestes pacientes.¹⁸

A MMP-8, segundo Sorsa et al.²⁰ e Ingman et al.²¹, é a principal collagenase encontrada no fluido gengival, saliva e tecido gengival inflamado. É produzida por neutrófilos, fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal e também por células endoteliais, estando relacionada à degradação do colágeno I e III, os quais representam 60% do colágeno periodontal.²² Tonetti et al.²³ encontraram maiores níveis de mRNA para MMP-8 em pacientes com Periodontite que naqueles saudáveis. Okuda et al.²⁴ avaliaram a MMP-8 no fluido gengival, observando que os níveis desta metaloprotease também aumentam após a realização de cirurgias (retalho associado ou não com a matriz derivada do esmalte), mas tendem a retornar aos valores medidos no baseline após 4 semanas de cicatrização. Da mesma

forma, Said et al.²² observaram aumento dos níveis da MMP-8 após 1 semana da realização de cirurgias (retalho e RTG) e diminuição destes após 4 semanas. Assim, é possível concluir que os níveis da MMP-8 podem refletir o processo de doença periodontal, bem como o de cicatrização, uma vez que ocorre o remodelamento do colágeno na fase inicial deste (fase inicial de cicatrização: aumento de neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais).

Além da destruição de tecido conjuntivo, a reabsorção óssea alveolar é um evento chave nas doenças periodontais.^{3,25} A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e a formação óssea mediada pelos osteoblastos. RANKL, seu receptor celular RANK (receptor de ativação do fator nuclear $\kappa\beta$) e a OPG (receptor “decoy” de RANKL) são os componentes moleculares do sistema de remodelação óssea.^{3,25} A ligação de RANKL a RANK, molécula expressa nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulatório para a diferenciação destas células em osteoclastos.^{3,25} Os efeitos de RANKL são regulados pela OPG, que inibe a reabsorção óssea, impedindo a interação entre RANK e RANKL.^{3,25} Assim como o sistema TIMPs/MMPs, as alterações no balanço da expressão de RANKL e OPG estão relacionadas à patogênese da doença periodontal.^{1-3,25}

O conhecimento dos fatores reguladores (citocinas pró e anti-inflamatórias) dos sistemas TIMPs/MMPs e OPG/RANKL é importante, tendo em vista que o desequilíbrio destes está relacionado à patogênese das doenças periodontais. Contudo, o papel individual das diversas citocinas potencialmente ligadas a este processo, os mecanismos moleculares envolvidos em suas funções e a relevância de cada citocina para a progressão da doença são pobremente conhecidos. Provavelmente, o conhecimento mais bem estabelecido com relação à patogênese das doenças periodontais está associado ao papel de citocinas inflamatórias clássicas, dentre as quais se destacam o TNF- α e a IL-1 β .^{4,5} Estas citocinas participam da regulação da imunidade mediada por células, da quimiotaxia de células inflamatórias, da

diferenciação e proliferação de clastos, atuando efetivamente na patogênese da doença periodontal.^{1,5,6} O TNF- α está envolvido na migração de leucócitos para os tecidos periodontais, na reabsorção óssea alveolar e na perda de inserção conjuntiva.⁵ Já a IL-1 β aumenta a secreção de MMPs e diminui a expressão dos TIMPs, desempenhando, portanto, um importante papel na degradação da matriz extracelular na Periodontite, além de ser considerada como um potente indutor de reabsorção óssea.⁵ Garlet et al.¹ demonstraram que a expressão de TNF- α e IL-1 β está correlacionada com a expressão de MMPs e RANKL, caracterizando uma intensa reação inflamatória e perda de osso alveolar.

Além das pró-inflamatórias, diversas citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10, são sintetizadas durante a doença periodontal.^{1,2,6,25} Estas modulam a resposta imune e estudos sugerem que elas podem apresentar um efeito protetor com relação à destruição periodontal, limitando a duração e extensão do processo inflamatório, uma vez que inibem a produção de MMPs e de fatores osteoclastogênicos (RANKL), ao mesmo tempo em que estimulam a expressão de seus respectivos antagonistas, TIMPs e OPG.^{1,2} A IL-4 e a IL-10 atuam, de modo a inibir TNF- α ou IL-1 β .⁶ Assim, a diminuição da razão entre IL-4/TNF- α e IL-4/IL-1 β , bem como entre IL-10/TNF- α e IL-10/IL-1 β está associada à maior severidade da doença periodontal.⁶ Contudo, existem controvérsias a respeito destas citocinas e, portanto, os reais papéis delas no controle da infecção periodontal e da severidade da doença requerem esclarecimentos.

Além dos efeitos dos LPS sobre as citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras e, conseqüentemente, sobre a destruição periodontal, este componente bacteriano também pode exercer efeitos diretos na indução da osteoclastogênese. Já foi demonstrado que os LPS podem exercer uma ação direta sobre a regulação de genes específicos, alterando os níveis de mRNA e, conseqüentemente, a produção das proteínas relacionadas à formação e destruição dos tecidos.²⁶ Assim, proteínas, tais como, sialoproteína óssea, osteocalcina, osteopontina e

fosfatase alcalina, têm sido avaliadas para exemplificar os eventos que ocorrem na Periodontite e no processo de cicatrização após a realização do tratamento periodontal.

A sialoproteína óssea e a osteocalcina são proteínas não colágenas específicas de tecidos mineralizados. A sialoproteína óssea é expressa por osteoblastos e apresenta um efeito potencial na fase inicial de mineralização do osso alveolar, dentina e cimento radicular, atuando na formação dos cristais de hidroxiapatita.^{27,28} A osteocalcina é sintetizada principalmente por osteoblastos, apresentando um papel importante na reabsorção e mineralização óssea, sendo descrita como um importante marcador do turnover ósseo.^{28,29} Já a osteopontina, outra proteína não colágena, é sintetizada por osteoblastos e osteoclastos, sendo necessária para o início da mineralização óssea, assim como a sialoproteína óssea.^{28,30} Também está relacionada à união de osteoclastos à superfície óssea e sua ausência prejudica a reabsorção óssea (geração de sinais intracelulares essenciais para a mobilidade normal dos osteoclastos).³⁰ Além disso, a osteopontina é considerada como uma citocina multifuncional nos fluidos corporais, sendo secretada por células inflamatórias (macrófagos, leucócitos, células T e natural Killer) e com função quimiotática para monócitos/macrófagos.³⁰ A osteopontina tem sido associada também a uma proteção contra a morte celular, isto é, contra a apoptose induzida por LPS.²⁶ A fosfatase alcalina é uma glicoproteína produzida por neutrófilos, macrófagos, osteoblastos e fibroblastos.³¹ É bem estabelecido na literatura que a fosfatase alcalina está envolvida no processo de mineralização óssea, sendo largamente utilizada como indicador da atividade osteoblástica.^{32,33}

Além disso, é importante ressaltar que a infecção periodontal impede o processo de cicatrização, exercendo efeito sobre os fatores de crescimento e formação de proteínas essenciais à saúde do periodonto, como o colágeno.^{34,35} Os fatores de crescimento são moléculas polipeptídicas, constituindo uma classe de mediadores biológicos naturais, que regulam e estimulam eventos celulares críticos envolvidos no reparo tecidual, como síntese de

DNA, proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação, síntese de componentes da matriz extracelular (regulam MMPs) e angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos).^{36,37} Desta forma, os fatores de crescimento podem ser considerados como importantes marcadores do processo de reparo e da regeneração periodontal.

O fator de crescimento TGF- β é produzido por neutrófilos e macrófagos que estão presentes durante as fases iniciais de cicatrização. Os efeitos biológicos deste fator estão associados à quimiotaxia, atividade mitótica de células epiteliais e do ligamento periodontal e regulação de componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e proteoglicanos.³⁸ Kuru et al.,³⁸ observando que alguns fatores de crescimento estão presentes no fluido gengival e que alterações em suas concentrações poderiam estar relacionadas com a atividade de cicatrização após cirurgias periodontais, mediram a concentração de TGF- β no fluido gengival coletado de sítios que foram submetidos à técnica de regeneração tecidual guiada ou à cirurgia a retalho e compararam com amostras de sítios saudáveis. As amostras de fluido gengival foram coletadas por meio de filtros de papel no baseline (pré-cirúrgico) e em intervalos de até 26 semanas em 16 pacientes submetidos à RTG e 11 pacientes submetidos à cirurgia a retalho. Os níveis de TGF- β foram determinados pelo ELISA. O tratamento dos defeitos periodontais reduziu de forma significativa a profundidade média de sondagem e melhorou o nível clínico de inserção. O volume médio de fluido gengival aumentou significativamente em todos os sítios nas duas semanas pós-cirúrgicas, retornando, posteriormente, aos níveis iniciais, com exceção dos sítios que receberam RTG, os quais mostraram quantidades ainda elevadas com 7 semanas de pós-operatório. Já, nos sítios controles, não foram observadas alterações em relação ao volume de fluido crevicular gengival. O aumento do volume de fluido nos sítios testes refletiu os estágios inflamatórios iniciais da cicatrização periodontal, em que há um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos gengivais e da passagem de fluidos para o espaço extravascular. Neste estudo,

observou-se que os níveis de TGF- β no fluido crevicular gengival aumentaram transitoriamente após a realização das cirurgias periodontais, e desta forma, os autores concluíram que a análise das alterações dos níveis de TGF- β após tratamento periodontal pode ser útil no monitoramento do processo de cicatrização.

Devido à ação bacteriana sobre o processo imunoinflamatório e regulação direta da expressão gênica de proteínas envolvidas na formação e destruição dos tecidos periodontais, é de extrema importância a utilização de procedimentos efetivos para a descontaminação das superfícies radiculares, a fim de se otimizar o processo de cicatrização periodontal.

A Periodontite pode ser tratada com sucesso através da melhoria da higiene oral, eliminação de fatores retentivos de placa e realização de procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR), combinados ou não com cirurgias periodontais. Entretanto, estes procedimentos podem ter resultados limitados em determinadas formas da doença, ou em sítios, nos quais há uma dificuldade de acesso à instrumentação mecânica.³⁹⁻⁴⁶ Além disso, bolsas periodontais já tratadas podem ser recolonizadas por microrganismos oriundos de outros sítios ou nichos orais infectados.⁴⁷ Diante do exposto, justifica-se a avaliação de terapias complementares aos procedimentos convencionais de RAR.

Na Periodontia, a terapia antimicrobiana fotodinâmica (aPDT) tem sido avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo*.^{40,41,48-57} Esta tem como princípio a erradicação de células alvo através da utilização de um fotosensibilizador (corante = agente de absorção óptica) e uma fonte de luz (laser de baixa intensidade com comprimento de onda apropriado), podendo, assim, promover a eliminação de microrganismos presentes na doença periodontal.^{58,59} Esta modalidade terapêutica foi desenvolvida para o tratamento de neoplasias, porém vários microrganismos, inclusive, espécies encontradas na cavidade oral, podem ser eliminadas

através da aPDT.^{58,59} Além disso, alguns fatores de virulência bacterianos, como LPS e proteases, podem ser reduzidos através da fotossensitização.⁵⁶

Na aPDT, a luz emitida pelo laser de baixa intensidade ativa um fotossensitizador específico (corantes, como o azul de metileno ou azul de toluidina, geralmente), que atua como um agente de absorção óptica, provocando apoptose ou necrose da célula alvo.^{58,59} Como a maioria das bactérias periodontais não absorve a luz visível de alguns tipos de laser que operam em baixa intensidade, é necessária a utilização de um corante, que seja capaz de atravessar a membrana celular das bactérias Gram-negativas e de absorver a luz laser de comprimento de onda específico no momento da irradiação. Isso é essencial para que o laser terapêutico tenha ação antimicrobiana sobre as bactérias periodontais. Devido à complexidade estrutural das bactérias Gram-negativas (possuem uma membrana celular envolta pela parede celular, assim como as bactérias Gram-positivas; entretanto, possuem também uma membrana lipídica externa à parede celular), apenas fotossensitizadores hidrofílicos, de baixo peso molecular e com carga catiônica, como exemplo, os derivados da fenotiazina (azul de toluidina e azul de metileno), tem habilidade de se difundir através da membrana.⁶⁰

Durante a aPDT, as bactérias expostas ao fotossensitizador são irradiadas pela luz laser, o que promove a absorção de fótons pelo corante. Em seguida, a energia absorvida pelo corante é transferida para as moléculas vizinhas (oxigênio), determinando a formação de moléculas reativas, como oxigênio singleto, íons superóxidos, hidroxilas e outros radicais livres, o que causa, conseqüentemente, uma oxidação irreversível de componentes bacterianos, como membrana celular, ribossomos, proteínas, lipídeos e DNA.⁵⁸⁻⁵⁹ A aPDT não causa danos aos tecidos do hospedeiro, pois as células eucariotas se defendem contra o ataque de radicais de oxigênio através de enzimas, como catalase e superoxidase dismutase.⁶¹ Além disso, a concentração do fotossensitizador e a dosagem de energia da luz laser necessárias para matar o agente infeccioso têm pouco efeito sobre os tecidos adjacentes do hospedeiro.⁶²

A literatura tem relatado inúmeras vantagens da aPDT, além do potencial antimicrobiano contra as bactérias periodontopatógenas,^{48-55,57-60} tais como: não provoca o desenvolvimento de resistência bacteriana (pois o oxigênio singlete e os radicais livres atingem uma variedade de alvos celulares) e nem efeitos colaterais (surgimento de patógenos oportunistas, o que modifica a microbiota da cavidade oral ou do trato gastrointestinal), assim como pode ocorrer após o uso de antibióticos;⁶² não requer anestesia;⁴⁰ o tempo para realização da terapia é curto;⁴⁰ fácil aplicação, podendo atingir sítios de difícil acesso à instrumentação mecânica;⁵⁹ a destruição bacteriana é alcançada em poucos segundos;⁶² fotossensibilizadores bem selecionados têm a capacidade de atravessar a membrana externa das bactérias Gram-negativas, o que muitas vezes inibe a atuação de antimicrobianos e anti-sépticos;⁶⁰ não há necessidade da manutenção de altas concentrações do fotossensibilizador durante horas ou até mesmo dias no interior da bolsa periodontal, assim como ocorre com os agentes antimicrobianos locais (o fluxo do fluido crevicular gengival dificulta a manutenção de concentrações terapêuticas destes agentes);⁶² ação é local, não causando distúrbios na microbiota de outros sítios da cavidade oral (o fotossensibilizador e o laser têm efeitos somente na região em que são aplicados);⁶² redução da necessidade de procedimentos cirúrgicos após a realização da terapia inicial básica;⁵⁹ e diminuição do risco de grandes bacteremias, assim como ocorre após a instrumentação mecânica das bolsas periodontais.⁵⁹

Diante do exposto, podemos assumir que a aPDT possa talvez ser uma alternativa aos antibióticos e anti-sépticos, auxiliando o controle mecânico da placa subgengival no tratamento da doença periodontal, principalmente, nos casos de Periodontite Agressiva, pacientes que apresentam fatores de risco (fumantes e portadores de Diabetes Mellitus, por exemplo) e nos sítios em que há um difícil acesso para a descontaminação das superfícies radiculares com instrumentos manuais (dentes com lesões de bifurcação, presença de concavidades, bolsas periodontais estreitas e profundas). Além disso, a aPDT parece útil a

pacientes na fase de terapia de manutenção e também nos casos de retratamento de bolsas periodontais recolonizadas por microrganismos oriundos de outros sítios ou nichos orais infectados, visto que poderá atuar sobre o biofilme, sem ocasionar a remoção de tecido dentário com conseqüente hipersensibilidade dentinária, assim como ocorre na reinstrumentação mecânica.⁵⁹

Desta maneira, é possível pressupor que a aPDT poderá auxiliar o organismo na regulação dos processos biológicos, restabelecendo o equilíbrio e levando à cura de forma menos traumática e talvez mais rápida, principalmente, nos casos em que a realização apenas da terapia mecânica periodontal convencional não alcança resultados satisfatórios.

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar a ação complementar da aPDT aos procedimentos de RAR na modulação das respostas inflamatória, imunológica e cicatricial dos tecidos periodontais, através de análises imunoenzimática (Teste Elisa) e de expressão gênica (Real-Time PCR). Para tal, dentes molares inferiores bilaterais, apresentando lesões de bifurcação classe III e indicados para extração, foram selecionados, de forma a representar os sítios, nos quais os procedimentos de RAR apresentam resultados muito limitados.

Análise imunoenzimática: Teste Elisa. Como parâmetro da condição de doença e do processo cicatricial, os níveis de IL-1 β , MMP-8, TGF- β e OPG/RANKL no fluido crevicular gengival foram avaliados no baseline e após a realização dos tratamentos através do Teste Elisa.

Análise gênica: Real-Time PCR. Este teste quantitativo avaliou o efeito complementar da aPDT aos procedimentos de RAR na expressão de genes relacionados à produção de marcadores de inflamação, destruição e neoformação dos tecidos periodontais, tais como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), metaloproteinase-2 (MMP-2), inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2), osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor de ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL), colágeno tipo I (COL I), fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) e sialoproteína óssea (BSP).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de pacientes

Foram selecionados 15 pacientes portadores de Periodontite Crônica (6 homens e 9 mulheres, com idade entre 36 e 65 anos), apresentando dentes molares inferiores bilaterais com lesões de bifurcação classe III (Figuras 1 e 2) e indicados para extração. Foram excluídos os seguintes pacientes: fumantes; portadores de HIV; diabéticos; grávidas ou lactantes; que tenham feito uso de anti-inflamatórios e antibióticos durante os 6 meses prévios ao início da pesquisa; com necessidade de profilaxia antibiótica específica; que receberam tratamento periodontal nos seis meses anteriores ao início do estudo. Dentes molares com presença de cáries ou restaurações próximas a margem gengival, com necessidade de tratamento endodôntico ou sendo este já realizado foram também excluídos da amostra.

Figura 1. Dente 46: Sonda de Nabers, indicando a presença de lesão de bifurcação classe III.

Figura 2. Dente 36: Sonda de Nabers, indicando a presença de lesão de bifurcação classe III.

Inicialmente, os pacientes foram instruídos sobre a metodologia e objetivos do estudo e todos assinaram um termo de consentimento. O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ribeirão Preto (protocolo nº: 2007.1.1084.58.3).

Tratamento periodontal inicial

Durante o tratamento periodontal inicial, todos os pacientes foram instruídos sobre as causas e consequências da doença periodontal, receberam instruções de higiene oral, de acordo com as suas necessidades individuais, e a remoção dos fatores retentivos de placa, preenchimento de cavidades e profilaxia supragengival foram executados. Após 1 semana, realizou-se o periodontograma e radiografias periapicais de todos os dentes para a definição do diagnóstico e do planejamento do tratamento. Inicialmente, executou-se os procedimentos de raspagem e alisamento radicular dos dentes não envolvidos na pesquisa e extrações de dentes, bem como ajuste oclusal e esplintagem, foram realizados também, se indicados.

Este estudo foi executado, utilizando-se o design comumente denominado de boca dividida. Os dentes selecionados foram os últimos a receber os procedimentos do preparo inicial em uma sessão única e específica para tal, sendo todos os pacientes tratados pelo mesmo periodontista. Cada par de dentes com lesões de bifurcação classe III foi aleatoriamente designado ao grupo controle (GC) ou grupo teste (GT) por um examinador cego, através do lançamento de uma moeda, imediatamente após a finalização dos procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR), qual foi realizada com ultra-som (ponta: Swivel Ultrasonic Inserts - AF Swivel Direct Flow Straight 25K - Hu-Friedy Co., Chicago, ILL, U.S.A), curetas Gracey e mini-five Gracey números 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy Co., Chicago, ILL, U.S.A), sob anestesia local. Na terapia inicial básica, somente os procedimentos de RAR foram realizados no GC, enquanto no GT, a RAR foi associada à aPDT.

Desta forma, após a finalização dos procedimentos de RAR no GT, as bolsas periodontais foram irrigadas com soro fisiológico e aguardou-se um intervalo de 10 minutos até que não houvesse mais sangramento. Em seguida, aplicou-se sobre todas as superfícies radiculares, a partir do fundo das bolsas até a margem gengival, o fotosensibilizador a base de cloridrato de fenotiazina, cujo principal componente é o azul de toluidina (Figura 3), na concentração de 10mg/ml (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG,

Grieskirchen, Áustria), o qual agiu por 1 minuto (Figura 4). Posteriormente, foi feita uma irrigação com soro fisiológico para a remoção dos excessos do fotosensibilizador e as áreas coradas foram irradiadas com um laser de diodo de comprimento de onda de 660nm, poder máximo de 60mW/cm² e densidade de energia de 0,6J/cm² (Helbo Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Áustria), com o auxílio de uma fibra óptica com diâmetro de 0,6mm (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Áustria), durante 10 segundos por sítio (Figura 5). O tratamento foi realizado nos 6 sítios do dente, totalizando 1 minuto de aplicação da luz laser por dente (20 segundos de aplicação da luz laser no interior da lesão de bifurcação classe III).^{40,41}

Figura 3. No GT, após a RAR, foi aplicado o corante azul de toluidina no interior da lesão de bifurcação classe III, bem como nas demais superfícies dentárias.

Figura 4. Após a aplicação do corante, foi aguardado um intervalo de 1 minuto.

Figura 5. Luz laser aplicada com o auxílio de uma ponta de fibra óptica.

Cirurgias a retalho

As cirurgias a retalho foram realizadas nos dois dentes selecionados 45 dias após a terapia inicial dos mesmos, em sessão única. A cirurgia consistiu em anestésias locais infiltrativas, incisões intrasulculares, deslocamento de retalho total nas superfícies vestibular e lingual de cada dente e remoção do tecido granulomatoso (Figuras 6 e 7). No GC, foi realizada a RAR (ultra-som, curetas Gracey e mini-five Gracey), enquanto no GT, a RAR foi associada à aPDT, seguindo-se o mesmo protocolo realizado na terapia inicial (Figuras 8 e 9).

Por fim, os retalhos foram deslocados coronalmente, de modo a recobrir as entradas das bifurcações, e suturados (Figura 10). Foram prescritos analgésico (dipirona sódica) para controle da dor pós-operatória e bochechos com digluconato de clorexidina a 0,12%, 2 vezes ao dia, por 21 dias para controle de placa. As suturas foram removidas após 7 dias.

Figura 6. Após o debridamento da lesão de bifurcação classe III do GC.

Figura 7. Após o debridamento da lesão de bifurcação classe III do GT.

Figura 8. Aplicação do corante azul de toluidina sobre as superfícies radiculares do GT.

Figura 9. Aplicação da luz laser no interior da lesão de bifurcação classe III no GT.

Figura 10. Posicionamento do retalho e suturas no GT.

Coleta do tecido de granulação e extrações dentárias

Três semanas (21 dias) após a realização das cirurgias a retalho e previamente às exodontias, os tecidos de granulação neoformados no interior das lesões de bifurcação classe III foram coletados cuidadosamente, de modo a evitar a remoção de tecido gengival (Figuras 11 e 12), e em seguida, transferidos para tubos eppendorfs, contendo 750µl de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (Figura 13). Estes ficaram armazenados a -80°C para que, posteriormente, as análises de expressões gênicas pudessem ser realizadas através da técnica de PCR quantitativo (Real-Time PCR).

Figura 11. Coleta do tecido de granulação neoformado 21 dias após a realização da cirurgia a retalho no GC.

Figura 12. Coleta do tecido de granulação neoformado 21 dias após a realização da cirurgia a retalho no GT.

Figura 13. Tecidos de granulação neoformados acondicionados em tubos eppendorfs, contendo Trizol, para posterior realização do Real-Time PCR.

Coletas de fluido crevicular gengival

Foram colhidas amostras de fluido crevicular gengival (FCG) das lesões de bifurcação classe III, visando a determinação da quantidade e concentração de IL-1 β , MMP-8, TGF- β e OPG/RANKL no FCG, através do ensaio imunoenzimático (Teste Elisa), em 3 tempos: **tempo 0**: baseline = previamente à terapia inicial dos dentes selecionados para a pesquisa;

tempo 1: 45 dias após o preparo inicial e previamente à realização das cirurgias a retalho;

tempo 2: 21 dias após as cirurgias a retalho.

Para tanto, primeiramente, foi realizada a remoção cuidadosa da placa supragengival dos dentes selecionados, utilizando-se curetas periodontais, e estes foram secos com jatos de ar e isolados com rolos de algodão estéreis para que não houvesse interferência da saliva. Em seguida, um filtro de papel específico – periopaper (PerioPaper, Oraflow, Amityville, NY) (Figura 14) foi introduzido cuidadosamente no interior da bolsa periodontal vestibular da lesão de bifurcação, até que certa resistência fosse sentida, permanecendo no local por 30 segundos (Figura 15).^{22,41,63,64} Filtros contaminados por sangue ou saliva eram descartados e após 3 minutos, o procedimento de coleta era repetido.⁶⁵ As amostras foram sempre coletadas nos mesmos sítios durante os 3 períodos de avaliação do estudo.

Os filtros de papel foram utilizados para a análise do volume de fluido gengival, feita com o auxílio de um dispositivo de mensuração eletrônico previamente calibrado (Periotron 6000, Oraflow) e, posteriormente, foram colocados em tubos eppendorf estéreis para armazenamento a -80°C. Uma curva padrão, correlacionando volumes conhecidos com valores obtidos pelo aparelho Periotron (unidades de Periotron), foi obtida e a partir de um programa para análises estatísticas (GraphPad Prism, demo version 5.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), uma regressão polinomial de quarta ordem foi aplicada ponto-a-ponto para determinação do volume de FCG (em µl) colhido de cada sítio.

Figura 14. Periopaper.

Figura 15. Periopaper introduzido na bolsa periodontal.

Resumo da sequência clínica do estudo:

3.1 MATERIAL E MÉTODOS – TESTE ELISA

Previamente à realização dos testes Elisa e com o objetivo de eluir o conteúdo de FCG dos periopapers, adicionou-se o volume de 250µl de solução tampão (PBS - phosphate buffered saline; pH7.2), contendo 0,1% de solução Tween (USB Corpo., Cleveland, OH, USA), a cada tubo eppendorf, os quais foram agitados por 30 minutos em vortex e, posteriormente, centrifugados a 2000g, a uma temperatura de 4°C, durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi pipetado e aliquotado em tubos eppendorfs estéreis, sendo estes armazenados também em freezer a -80°C até a realização do ensaio imunoenzimático.

Análise dos níveis de IL-1β, MMP-8, TGF-β e OPG/RANKL no fluido crevicular gengival

Aliquotas de cada amostra de fluido gengival foram submetidas ao teste imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kits comercialmente disponíveis para determinação dos níveis de IL-1β (RD Systems – catálogo HSLB00C), MMP-8 (RD Systems – catálogo DY908), TGF-β (RD Systems - catálogo DY240), OPG (RD Systems - catálogo DY805) e RANKL (Peprotech - catálogo 900 - K142). Todos os testes foram realizados criteriosamente de acordo com as recomendações dos fabricantes, através de análises em duplicatas.

Os resultados encontrados foram expressos em pg/ml (ou ng/ml), convertidos a pg/µl (ou ng/µl), sendo então multiplicados pelo volume inicial da amostra (250µl de solução tampão, contendo 0,1% de Tween, + volume total de FCG), de modo a obter resultados expressos em pg/amostra (ou ng/amostra).

A concentração de IL-1 β , MMP-8, TGF- β , OPG e RANKL em cada amostra de FCG foi calculada pela divisão entre a quantidade total de pg/amostra (ou ng/amostra) (determinados com o auxílio do teste Elisa) pelo volume total de FCG (em μ l) da amostra (determinado com o auxílio do aparelho Periotron). Desta forma, os resultados foram também expressos em pg (ou ng) de cada marcador/ μ l de FCG. Subsequentemente, a quantidade (pg/amostra) e a concentração (pg/ μ l) de OPG/RANKL no FCG foram determinados.

Análise estatística

Os volumes de fluido gengival por amostra e as quantidades e concentrações de IL-1 β , MMP-8, TGF- β e OPG/RANKL foram registrados através de médias e desvios padrões e, em seguida, a normalidade dos dados foi verificada através do método de Kolmogorov e Smirnov. A comparação entre os grupos teste e controle para os volumes de fluido gengival, quantidades e concentrações de IL-1 β , MMP-8, TGF- β e OPG/ RANKL em relação a cada período de tempo foi realizada através do teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon, visto que pelo menos os dados de um dos grupos foram considerados não normais. Já a comparação em cada grupo (intragrupo) entre os diferentes períodos de tempo foi realizada através da análise de variância (ANOVA) ou pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. O nível de significância de 0,05 foi empregado em todas as análises estatísticas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS – REAL-TIME PCR

Análise da expressão gênica

Inicialmente, a quantidade total de RNA das amostras foi extraída, utilizando-se o reagente Trizol. Posteriormente, adicionou-se 200µl de clorofórmio (Sigma Co., St. Louis, MO) aos tubos eppendorfs, os quais foram centrifugados a 12.000g, durante 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo eppendorf que continha 200µl de etanol a 95%.

Prosseguiu-se todo o processo, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (SV Total RNA Isolation System - Promega) e, finalmente, as amostras de RNA foram resuspensas em 60µl de água livre de RNase (tratada com dietilpirocarbonato – DEPC) e armazenadas a -20°C, enquanto uma alíquota de 2µl foi obtida, a fim de se determinar a concentração de RNA/µl das amostras, através de um espectrofotômetro. Foram utilizados para a síntese de cDNA (DNA complementar), 1µg de RNA, oligo (dT) (oligo (dT) 15 Primer - Promega), água livre de RNase e um kit, contendo transcriptase reversa (ImProm-II™ Reverse Transcriptase - Promega).

Os primers foram desenhados (Tabela 1) através do software Primer Express (Applied Biosystems, Warrington, UK) e as reações de PCR quantitativo (Real-Time PCR) foram realizadas, utilizando-se o sistema SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK). O Real-Time PCR avaliou a expressão dos seguintes genes: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), metaloproteinase-2 (MMP-2), inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2), osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor de ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL), colágeno tipo I (COL I), fosfatase

alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) e sialoproteína óssea (BSP). Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo e a β -actina (gene de expressão constitutiva – gene de referência) foi utilizada como controle positivo. As condições padrões de PCR foram 95°C (10 minutos) e, então, 40 ciclos a 94°C (1 minuto), 56°C (1 minuto) e 72°C (2 minutos), seguidas pela curva padrão de desnaturação. As condições de PCR para cada gene alvo foram otimizadas em relação à concentração do primer, ausência de formação de dímeros e eficiência da amplificação dos genes alvos e do gene controle de referência. SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 400nM de primers específicos e 2,5ng de cDNA foram usados em cada reação. A determinação dos níveis relativos de expressão gênica foi feita através de medidas em duplicatas para cada gene alvo, com a normalização pelo gene da β -actina presente na amostra, utilizando-se o método Ct (cycle threshold) e a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$.²

Análise estatística

Os dados foram registrados através de médias e desvios padrões. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad InStat. Inicialmente, utilizou-se o método de Kolmogorov e Smirnov para verificar a normalidade dos dados. As comparações entre os grupos teste e controle foram analisadas através de testes paramétricos (Teste t pareado), quando os dados de ambos os grupos foram considerados normais para o parâmetro analisado, ou através de testes não paramétricos (Wilcoxon), se pelo menos os dados de um dos grupos não fossem considerados normais. O nível de significância de 0,05% foi empregado em todas as análises estatísticas.

Tabela 1. Sequência do primer desenhado e as respectivas temperaturas de anelamento:

Gene	Sequência dos Primers (5' - 3')	Temp. de Anelamento (°C)	Número no Banco de Genes
TNF- α	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATACC	56	197692684
IL-1 β	CTTCTTCGACACATGGGATAAC TTTGGGATCTACACTCTCCAGC	59	27894305
IL-4	GTTGACCGTAACAGACATCTTTG CGAGCCGTTTCAGGAATC	58	58736974
IL-10	AGATCTCCGAGATGCCTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	24430216
MMP-2	CGACCGCGACAAGAAGTA GCACACCACATCTTCCGTCA	60	33876889
TIMP-2	CAAGTTCTTCGCCTGCATCAA TCGAAACCCTTGAGGCTT	61	73858577
OPG	CAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGA GAAGGTGAGGTAGCATGTCC	57	3107916
RANKL	CGACATCCCATCTGGTTCC GCTGGTTTTAGTGACGTACACC	65	6863047
COL I	CCCTGGTGCTACTGGTT ACCACGCTGTCCAGCAATA	61	62088773
ALP	CGGGCACCATGAAGGAAA GGCCAGACCAAAGATAGAGTT	61	116734716
OPN	AAAGCCAATGATGAGAGCAA ATTCAGGTGTTTATCTTCTTCCTTAC	58	91598938
OCN	AGCTCAATCCGGACTGT GGAAGAGGAAAAGAAGGGTGC	62	109731032
BSP	AGTGTCACCTGGAGCCAATGCA TGTGTCTTCGAGGTGCCCTT	58	13251325
β -actina	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	61	168480144

4. RESULTADOS

Quinze pacientes foram selecionados para o estudo, entretanto, um foi excluído das análises relacionadas ao tempo 2, por ter utilizado antibiótico e anti-inflamatório após a realização das cirurgias a retalho.

Clinicamente, não foi possível verificar diferenças entre o GT e GC, uma vez que os tecidos gengivais de todos os pacientes apresentaram um processo adequado de cicatrização após a realização da terapia inicial básica, bem como das cirurgias a retalho. No dia das coletas dos tecidos de granulação e das extrações dentárias, os tecidos moles já se apresentavam completamente cicatrizados.

4.1 RESULTADOS – TESTE ELISA

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle em relação ao volume de FCG 21 dias após a realização das cirurgias a retalho, favorecendo o GT. No baseline (tempo 0), o volume de FCG foi $2,75 \pm 2,22\mu\text{l}$ no GT e $3,11 \pm 2,37\mu\text{l}$ no GC ($p=0,35$); aos 45 dias após a terapia inicial (tempo 1), o volume de FCG foi $2,74 \pm 2,64\mu\text{l}$ no GT e $2,85 \pm 3,02\mu\text{l}$ no GC ($p=0,35$); contudo, 21 dias após as cirurgias a retalho (tempo 2), o volume de FCG no GT foi significativamente inferior ao do GC (GT = $2,34 \pm 1,81\mu\text{l}$; GC = $3,04 \pm 2,00\mu\text{l}$; $p=0,03$). Já, as análises intragrupos dos volumes de FCG não detectaram diferenças estatisticamente significantes entre os três períodos de avaliação do estudo (Tabela 2 e Figura 16).

Em relação às quantidades de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β , não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle no baseline (tempo 0), 45 dias após a terapia inicial (tempo 1) e 21 dias após a realização dos procedimentos cirúrgicos (tempo 2). Além disso, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes períodos de tempo, em cada grupo, para as quantidades de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β (Tabelas 3-6 e Figuras 17-20).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação às concentrações de IL-1 β , MMP-8 e OPG/RANKL no FCG no baseline e nos tempos 1 e 2. Além disso, as concentrações de IL-1 β , MMP-8 e OPG/RANKL no FCG, em cada grupo, não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os três períodos de tempo avaliados (Tabelas 7-9 e Figuras 21-23).

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC em relação à concentração de TGF- β no FCG 45 dias após a terapia inicial (tempo 1), favorecendo o GT. No baseline (tempo 0), a concentração de TGF- β no FCG foi $45,59 \pm 100,22\text{pg}/\mu\text{l}$ no GT, enquanto no GC foi $25,64 \pm 50,35\text{pg}/\mu\text{l}$ ($p=1$); aos 45 dias após a realização da terapia inicial (tempo 1), a concentração de TGF- β no FCG foi significativamente maior no GT (GT = $38,35 \pm 71,56\text{pg}/\mu\text{l}$; GC = $5,92 \pm 11,14\text{pg}/\mu\text{l}$; $p=0,04$); porém, aos 21 dias de pós-operatório (tempo 2), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a concentração de TGF- β no FCG (GT = $170,04 \pm 534,38\text{pg}/\mu\text{l}$; GC = $18,51 \pm 31,45\text{pg}/\mu\text{l}$; $p=0,37$). Contudo, as concentrações de TGF- β no FCG não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os três períodos de tempo, quando avaliadas em cada grupo (Tabela 10 e Figura 24).

Tabela 2. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões dos volumes de FCG (μl).

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	$2,75 \pm 2,22$	$3,11 \pm 2,37$	0,35
Tempo 1	$2,74 \pm 2,64$	$2,85 \pm 3,02$	0,35
Tempo 2	$2,34 \pm 1,81$	$3,04 \pm 2,00$	0,03*
<i>P</i> - Intragrupo	0,85	0,45	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2). Comparações intragrupos: ANOVA para o GT e teste de Kruskal-Wallis para o GC. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Figura 16. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões dos volumes de FCG (μ l).

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Quantidades de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β no FCG

Tabela 3. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de IL-1 β (ng) no FCG.

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	167,26 $\pm$ 145,33	107,05 $\pm$ 113,88	0,16
Tempo 1	115,22 $\pm$ 89,97	167,89 $\pm$ 173,76	0,14
Tempo 2	142,19 $\pm$ 140,02	224,56 $\pm$ 230,98	0,45
<i>P</i> - Intragrupo	0,65	0,33	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 17. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de IL-1 β (ng) no FCG.

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de MMP-8 (ng) no FCG.

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	252,20 $\pm$ 468,62	300,66 $\pm$ 606,48	0,9
Tempo 1	328,98 $\pm$ 441,58	246,69 $\pm$ 347,84	0,37
Tempo 2	246,45 $\pm$ 292,44	301,23 $\pm$ 593,15	0,9
<i>P</i> - Intragrupo	0,82	0,98	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 18. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de MMP-8 (ng) no FCG.

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 5. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de OPG/RANKL (pg) no FCG.

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	0,02 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,04	0,64
Tempo 1	0,02 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,08	0,49
Tempo 2	0,06 $\pm$ 0,14	0,02 $\pm$ 0,03	0,81
<i>P</i> - Intragrupo	0,6	0,97	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 19. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de OPG/RANKL (pg) no FCG.

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 6. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de TGF- β (pg) no FCG.

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	84,26 $\pm$ 175,43	64,76 $\pm$ 91,17	0,83
Tempo 1	49,34 $\pm$ 58,89	39,75 $\pm$ 104,59	0,16
Tempo 2	147,74 $\pm$ 358,87	58,66 $\pm$ 113,86	0,43
<i>P</i> - Intragrupo	0,98	0,37	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 20. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das quantidades de TGF- β (pg) no FCG.

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Concentrações de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β no FCG

Tabela 7. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de IL-1 β no FCG (ng/ μ l).

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	83,69 $\pm$ 88,86	41,83 $\pm$ 50,60	0,08
Tempo 1	66,63 $\pm$ 77,31	90,68 $\pm$ 119,62	0,33
Tempo 2	101,50 $\pm$ 120,21	79,86 $\pm$ 62,53	0,63
<i>P</i> - Intragrupo	0,86	0,22	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 21. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de IL-1 β no FCG (ng/ μ l).

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 8. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de MMP-8 no FCG (ng/ μ l).

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	96,91 $\pm$ 124,76	161,71 $\pm$ 375,52	0,71
Tempo 1	294,65 $\pm$ 489,75	163,17 $\pm$ 244,90	0,12
Tempo 2	162,53 $\pm$ 238,01	100,90 $\pm$ 141,15	0,54
<i>P</i> - Intragrupo	0,92	0,99	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 22. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de MMP-8 no FCG (ng/ μ l).

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 9. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de OPG/RANKL no FCG (pg/ μ l).

	GT	GC	<i>P</i> - Intergrupo
Tempo 0	0,02 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,04	0,64
Tempo 1	0,02 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,08	0,49
Tempo 2	0,06 $\pm$ 0,14	0,02 $\pm$ 0,03	0,81
<i>P</i> - Intragrupo	0,6	0,97	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 23. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de OPG/RANKL no FCG (pg/ μ l).

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Tabela 10. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de TGF- β no FCG (pg/ μ l).

	GT	GC	P - Intergrupo
Tempo 0	45,59 $\pm$ 100,22	25,64 $\pm$ 50,35	1
Tempo 1	38,35 $\pm$ 71,56	5,92 $\pm$ 11,14	0,04*
Tempo 2	170,04 $\pm$ 534,38	18,51 $\pm$ 31,45	0,37
P - Intragrupo	0,81	0,3	

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

Comparações intragrupos: teste de Kruskal-Wallis. Comparações intergrupos: teste de Wilcoxon. *Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Figura 24. Comparações intragrupos e intergrupos das médias $\pm$ desvios padrões das concentrações de TGF- β no FCG (pg/ μ l).

Períodos de avaliação: baseline (tempo 0); 45 dias após a terapia inicial - previamente à realização das cirurgias a retalho (tempo 1); 21 dias após a realização das cirurgias (tempo 2).

*Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

4.2 RESULTADOS – REAL-TIME PCR

A análise dos dados revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC na expressão dos níveis de mRNAs para MMP-2 e OPG. O GT apresentou uma menor expressão do gene para MMP-2 ($GT = 3,26 \pm 0,89$; $GC = 4,23 \pm 0,97$; $p=0,01$), enquanto os níveis de mRNAs da OPG foram significativamente mais altos ($GT = 0,84 \pm 0,45$; $GC = 0,30 \pm 0,26$; $p=0,001$). Em relação aos níveis de mRNAs para TIMP-2 ($GT = 2,75 \pm 0,52$; $GC = 2,88 \pm 0,59$; $p=0,59$) e RANKL ($GT = 2,21 \pm 0,95$; $GC = 1,67 \pm 1,10$; $p=0,14$), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Entretanto, quando foram avaliadas as proporções entre as médias de TIMP-2 e MMP-2, bem como entre as de OPG e RANKL, a análise quantitativa revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, a favor do GT, para ambas as proporções: TIMP-2/MMP-2 ($GT = 0,91 \pm 0,34$; $GC = 0,73 \pm 0,32$; $p=0,04$); OPG/RANKL ($GT = 0,60 \pm 0,86$; $GC = 0,23 \pm 0,16$; $p=0,04$) (Figuras 25 e 26).

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na expressão dos níveis de mRNAs para os genes relacionados ao processo inflamatório, tais como, TNF- α ($GT = 3,63 \pm 1,23$; $GC = 4,29 \pm 1,33$; $p=0,18$), IL-1 β ($GT = 3,54 \pm 0,79$; $GC = 3,55 \pm 0,98$; $p=0,98$), IL-4 ($GT = 1,85 \pm 0,76$; $GC = 2,16 \pm 0,94$; $p=0,34$) e IL-10 ($GT = 1,42 \pm 0,55$; $GC = 1,21 \pm 0,25$; $p=0,21$) (Figura 27). As proporções entre as médias de IL-4 e TNF- α , IL-4 e IL-1 β , bem como entre as médias de IL-10 e TNF- α e IL-10 e IL-1 β foram também avaliadas e os resultados mostraram não haver diferenças significativas entre os grupos: IL-4/TNF- α ($GT = 0,57 \pm 0,30$; $GC = 0,58 \pm 0,38$; $p=0,87$), IL-4/IL-1 β ($GT = 0,55 \pm 0,31$; $GC = 0,67 \pm 0,34$; $p=0,36$), IL-10/TNF- α ($GT = 0,47 \pm 0,33$; $GC = 0,32 \pm 0,14$; $p=0,12$) e IL-10/ IL-1 β ($GT = 0,42 \pm 0,19$; $GC = 0,37 \pm 0,15$; $p=0,43$) (Figura 28).

A análise quantitativa da expressão do gene relacionado à formação de matriz, COL I, e dos genes relacionados ao processo de formação de osso e cimento, ALP, OPN, OCN e BSP, revelou também não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos: COL I (GT = $2,18 \pm 1,56$; GC = $1,55 \pm 0,54$; $p=0,27$), ALP (GT = $1,93 \pm 1,42$; GC = $1,13 \pm 1,18$; $p=0,11$), OPN (GT = $1,04 \pm 0,89$; GC = $1,30 \pm 0,86$; $p=0,36$), OCN (GT = $2,96 \pm 1,02$; GC = $3,08 \pm 0,96$; $p=0,66$) e BSP (GT = $3,98 \pm 1,04$; GC = $3,81 \pm 1,17$; $p=0,68$) (Figura 29).

Figura 25. Valores médios e desvios padrões dos níveis de mRNAs para metaloproteinase-2 (MMP-2), inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2) e proporção entre TIMP-2/MMP-2 no grupo teste (GT) e grupo controle (GC).

*Estatisticamente significante: $p < 0,05$.

Figura 26. Valores médios e desvios padrões dos níveis de mRNAs para osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor de ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL) e proporção entre OPG/RANKL no grupo teste (GT) e grupo controle (GC).

*Estatisticamente significante: $p < 0,05$.

Figura 27. Valores médios e desvios padrões dos níveis de mRNAs para fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) no grupo teste (GT) e grupo controle (GC).

Figura 28. Valores médios e desvios padrões dos níveis de mRNAs para as proporções entre IL-4/TNF- α , IL-4/IL-1 β , IL-10/TNF- α e IL-10/IL-1 β no grupo teste (GT) e grupo controle (GC).

Figura 29. Valores médios e desvios padrões dos níveis de mRNAs para colágeno tipo I (COL I), fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) e sialoproteína óssea (BSP) no grupo teste (GT) e grupo controle (GC).

5. DISCUSSÃO

A aPDT tem demonstrado um efeito bactericida contra periodontopatógenos, capacidade para redução de fatores de virulência, como LPS e proteases, e também potencial para inativar citocinas inflamatórias.⁴⁸⁻⁵⁷ Devido à ação bacteriana sobre o processo imunoinflamatório e regulação direta da expressão gênica de proteínas envolvidas na formação e destruição dos tecidos periodontais, este estudo teve como objetivo analisar o efeito adjunto da aPDT aos procedimentos de RAR durante o tratamento periodontal não cirúrgico e cirúrgico (cirurgias a retalho) através da avaliação dos níveis de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β em amostras de FCG coletadas no baseline, 45 dias após a terapia inicial básica (previamente à realização das cirurgias a retalho) e 21 dias após as cirurgias. Além disso, avaliou-se o efeito adjunto da aPDT à RAR sobre a modulação da expressão de diferentes genes envolvidos no processo de cicatrização dos tecidos periodontais 21 dias após a realização das cirurgias a retalho. Desta forma, dentes molares inferiores bilaterais, apresentando lesões de bifurcação classe III e indicados para extração, foram selecionados em 15 pacientes com Periodontite Crônica. Cada par de dentes foi dividido aleatoriamente em grupo controle (GC), no qual foi realizada a RAR, e em grupo teste (GT), no qual além da RAR, foi realizada a aPDT.

Os resultados deste estudo clínico, controlado e randomizado mostraram um efeito adicional para o protocolo de aPDT associado aos procedimentos de RAR (GT) somente em relação à concentração de TGF- β no FCG 45 dias após a terapia inicial básica e ao volume de FCG 21 dias após a realização das cirurgias a retalho. Quando o volume de FCG e a quantidade e concentração de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β no FCG foram comparados entre o baseline, 45 dias após a terapia inicial e 21 dias após a realização das

cirurgias a retalho, em cada grupo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Além disso, os resultados deste estudo mostraram um efeito adicional para o protocolo de aPDT associado aos procedimentos de RAR em relação à expressão gênica da MMP-2 e OPG, como também para as razões entre TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL.

As lesões de bifurcação classe III presentes em dentes molares inferiores foram selecionadas para este estudo com o propósito de representar os sítios periodontais com acesso difícil para a realização de uma descontaminação radicular efetiva através dos métodos mecânicos clássicos de RAR.⁶⁶⁻⁶⁸ Como os dentes eram indicados para extração, os tecidos de granulação neoformados puderam ser coletados imediatamente antes da realização das exodontias e avaliados quanto à expressão de inúmeros genes. Os tecidos neoformados foram removidos 21 dias após as cirurgias a retalho,^{69,70} e desta forma, este foi o último período para a coleta das amostras de FCG.

A anatomia das lesões de bifurcação classe III em molares mandibulares, devido à sua complexidade, é responsável pela falta de previsibilidade dos procedimentos de RAR durante o tratamento periodontal não cirúrgico ou cirúrgico, razão para a perda freqüente destes dentes.⁶⁶⁻⁶⁸ Fatores relacionados à anatomia da região de bifurcação, como presença de projeções cervicais e pérolas de esmalte, concavidades presentes nas raízes ou no tronco radicular, dimensão da entrada da furca e altura do tronco radicular, contribuem para o acúmulo de placa e/ou prejudicam o acesso para a realização de uma efetiva descontaminação pelas técnicas de instrumentação disponíveis.^{66,67,71-73} Já a morfologia do defeito ósseo e a quantidade de periodonto que permanece apical e lateral a este (as lesões de bifurcação classe III podem estar associadas a defeitos verticais ou circunferenciais, como observado no presente estudo) têm efeito na capacidade de cicatrização destes sítios.⁷⁴

Paralelamente a isto, a aPDT parece ser apropriada para alcançar sítios com acesso difícil à instrumentação mecânica em toda a sua extensão,⁵⁹ como nos casos das lesões de bifurcação, visto que é uma técnica de fácil manuseio, devido ao uso apenas de fotossensibilizador e laser, os quais são aplicados, respectivamente, através da utilização de uma seringa de ponta romba e de uma fibra óptica no fundo das bolsas periodontais.^{40,41}

Este é o primeiro estudo que analisou marcadores do FCG, bem como a expressão de inúmeros genes, após a realização de tratamento periodontal em lesões de bifurcação classe III e, portanto, comparações dos presentes resultados com dados da literatura foram muito difíceis. Além disso, vários protocolos de aPDT para tratamento da doença periodontal têm sido relatados na literatura (diferentes tipos, concentrações e tempo de aplicação dos fotossensibilizadores; diferentes tipos de laser, comprimentos de onda, densidades de energia e tempos de exposição a luz laser; frequência de aplicação da aPDT), o que dificulta também a comparação deste com estudos já publicados, bem como impede a obtenção de conclusões definitivas sobre o potencial e reais benefícios clínicos da aPDT.^{40,41,75-78} O protocolo da presente pesquisa é similar ao de estudos recentemente publicados, os quais compararam a aPDT aos procedimentos de RAR no tratamento de pacientes com Periodontite Agressiva. Os resultados clínicos e os efeitos sobre os níveis de TNF- α e RANKL no FCG foram equivalentes entre ambas as terapias, indicando, assim, um benefício clínico deste protocolo de aPDT.^{40,41} Além do mais, efeitos tóxicos relacionados ao uso do fotossensibilizador azul de toluidina na concentração de 10mg/ml, como utilizado neste estudo, durante 1 minuto ou mais, não têm sido relatados na literatura.^{40,41,75,76}

A avaliação de alterações nos níveis de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β no FCG após a realização de tratamentos periodontais constitui uma informação importante sobre o processo de cicatrização inicial e efeitos da terapia.^{22,38,63,79-81} Como o monitoramento individual dos níveis de RANKL e OPG não fornece informações adequadas sobre as

condições de saúde e doença,⁶³ no presente estudo, somente a quantidade e a concentração da relação entre OPG/RANKL foram avaliadas.

Hipotetizou-se que o uso adjunto da aPDT aos procedimentos de RAR poderia resultar em uma melhora adicional na redução da carga bacteriana das lesões de bifurcação classe III e, conseqüentemente, que alterações significativas no volume de FCG, bem como nos níveis de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β no FCG, pudessem ser detectadas após a realização do tratamento. Os resultados do GC corroboram estudos clínicos que têm relatado a inefetividade dos procedimentos de RAR no tratamento periodontal não cirúrgico e cirúrgico das lesões de bifurcação classe III.^{82,83} Contudo, no GT, também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, quando comparou-se o volume de FCG e a quantidade e concentração de IL-1 β , MMP-8, OPG/RANKL e TGF- β no FCG antes e após a realização da aPDT associada à RAR. Entretanto, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à concentração de TGF- β no FCG 45 dias após a terapia inicial básica e ao volume de FCG 21 dias após a realização das cirurgias a retalho, favorecendo o GT.

A complexidade da anatomia das lesões de bifurcação classe III pode explicar o alto desvio padrão verificado nos resultados imunoenzimáticos. Embora, defeitos bilaterais (design de boca dividida) sejam mais adequados na comparação entre tratamentos controles e testes, neste estudo, na maioria dos casos, os defeitos eram consideravelmente diferentes no mesmo paciente. Além disso, é importante mencionar que como os defeitos eram bilaterais e alguns estudos têm relatado um possível efeito antimicrobiano apenas com a utilização do fotosensibilizador,^{55,60,84} cuidados foram tomados para evitar que o corante tivesse contato acidental com os tecidos e dente do grupo controle.

A alteração no volume de FCG é o indicador mais sensível e menos subjetivo para se verificar mudanças ocorridas em relação à inflamação dos tecidos periodontais.^{85,86} Baseando-se no volume de FCG observado 21 dias após a realização das cirurgias a retalho, os resultados desta pesquisa sugerem que o tratamento cirúrgico com aPDT associada à RAR, comparado ao tratamento apenas com RAR, proporcionou uma diminuição mais rápida do processo inflamatório. Isto corrobora resultados de um recente estudo que avaliou também o efeito adjunto da aPDT à RAR em pacientes com Periodontite Crônica. Após o tratamento de 20 pacientes, os autores observaram valores significativamente menores para o fluxo de FCG (avaliado em unidades de Periotron) no grupo teste (RAR + aPDT), comparado ao grupo controle (somente RAR).⁷⁷ Além disso, em estudos clínicos controlados em pacientes com Periodontite Crônica, o uso adjunto da aPDT à RAR, quando comparado à RAR apenas, resultou em uma melhora estatisticamente significativa dos scores de sangramento à sondagem, demonstrando também uma redução mais alta da inflamação neste grupo.⁷⁵⁻⁷⁸ Em um estudo recente em pacientes com Periodontite Agressiva, verificou-se no grupo em que apenas a aPDT foi realizada, uma significativa redução dos scores de sangramento à sondagem, qual foi similar ao grupo da RAR.⁴⁰

Baseando-se no resultado da presente pesquisa, pode-se concluir que houve um efeito adicional da aPDT à RAR com relação à redução da inflamação. Por outro lado, é importante considerar que o benefício sobre o processo inflamatório pode ser atribuído somente ao efeito bioestimulatório do laser de baixa intensidade utilizado na aPDT.^{87,88} Após o uso adjunto de um laser de baixa intensidade aos procedimentos de RAR, Quadri et al.⁸⁸ e Lai et al.⁸⁹ também observaram uma maior diminuição dos volumes de FCG, quando comparado ao grupo controle (RAR), demonstrando, portanto, que a aplicação apenas do laser de baixa intensidade é capaz de reduzir o processo inflamatório.

O TGF- β é um mediador chave na resolução da inflamação e a avaliação dos seus níveis no FCG pode ser útil para monitorar o processo de cicatrização periodontal.^{38,90} Este fator de crescimento tem efeitos importantes na regulação das MMPs: suprime a produção de collagenases por fibroblastos e macrófagos, enquanto aumenta a produção de TIMPs, o que resulta, consequentemente, na diminuição da destruição da matriz de tecido conjuntivo.⁹¹ Além disso, o TGF- β exerce efeito sobre a proliferação e diferenciação celular, aumenta a síntese de moléculas da matriz extracelular, sendo responsável também pela quimiotaxia de células ósseas.⁹¹ Desta forma, a concentração mais alta de TGF- β no FCG (maior quantidade de TGF- β para um menor volume de FCG) encontrada no GT 45 dias após a realização da terapia inicial básica pode sugerir uma melhor resolução da inflamação e do processo de reparo neste grupo. Após 21 dias da realização dos tratamentos cirúrgicos, uma maior quantidade (2,5 vezes superior à do GC) e concentração de TGF- β no FCG (aproximadamente 10 vezes à do GC) foram também encontradas no GT, quando comparado ao GC, contudo, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Entretanto, estes resultados podem ser atribuídos também ao efeito bioestimulatório do laser de baixa intensidade utilizado na aPDT, desde que este é um instrumento efetivo para promover a redução da inflamação e o reparo periodontal.⁸⁷ Os achados de um estudo *in vivo* sugeriram que a irradiação com laser de baixa intensidade pode diminuir a inflamação e acelerar o processo de cicatrização, através da inibição da expressão de genes responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias e aumento da expressão gênica de TGF- β .⁹² Em outro estudo, maiores níveis de TGF- β foram encontrados em amostras de tecido conjuntivo irradiadas com laser de baixa intensidade, sendo sugerido que o aumento da síntese de TGF- β pode ser um importante mecanismo pelo qual o laser reduz a reação inflamatória durante o processo de cicatrização.⁹³

Embora limitado a apenas um único período de tempo (21 dias após a realização das cirurgias a retalho), os resultados deste estudo mostraram um efeito adicional para o protocolo de aPDT associado aos procedimentos de RAR em relação a expressão gênica da MMP-2 e OPG, como também para as razões entre TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL.

A MMP-2, uma das principais enzimas envolvidas no processo de degradação dos tecidos gengivais, tem um importante efeito na patogênese da periodontite, sendo ativada por bactérias periodontopatogênicas.⁹⁴⁻⁹⁶ A MMP-2 degrada colágeno tipo IV, principal proteína encontrada na membrana basal, e colágeno tipo I desnaturado, principal proteína dos tecidos periodontais.¹⁵⁻¹⁷ As MMPs são reguladas pelos TIMPs e o balanço entre estes está associado ao turnover fisiológico dos tecidos conjuntivos periodontais (remodelamento da matriz extracelular).^{1,9} Contudo, em muitos processos de doença, os níveis das MMPs se elevam sem que haja um aumento proporcional nos níveis dos TIMPs, o que resulta em destruição de tecido conjuntivo.^{1,14} Estudos têm relatado uma maior expressão da MMP-2 nos tecidos gengivais de pacientes com Periodontite, quando comparada aos sítios saudáveis.^{2,18,97} Além disso, maiores níveis de mRNA da MMP-2 têm sido associados a uma fase da doença periodontal caracterizada por uma intensa reação inflamatória e perda de osso alveolar, enquanto uma menor expressão gênica da MMP-2 e maior expressão de TIMP-2 (maior razão entre TIMP-2/MMP-2) têm sido correlacionadas com reduzidas taxas de infiltração celular e de perda óssea alveolar.¹ Portanto, o desequilíbrio entre as expressões de MMPs e TIMPs pode explicar os diferentes graus de progressão da doença periodontal.^{1,2} No presente estudo, os níveis de mRNA para MMP-2 foram menores no GT, quando comparado ao GC (GT = $3,26 \pm 0,89$; GC = $4,23 \pm 0,97$; $p=0,01$), e de forma mais importante, a razão entre TIMP-2/MMP-2 foi significativamente aumentada no GT (GT = $0,91 \pm 0,34$; GC = $0,73 \pm 0,32$; $p=0,04$), o que sugere que a associação da aPDT à RAR pode modular a expressão gênica da

MMP-2 e de TIMP-2/MMP-2, contribuindo para um melhor remodelamento da matriz e menor progressão da doença periodontal.

RANKL, seu receptor celular RANK e a OPG têm sido identificados como o sistema de regulação molecular chave para o remodelamento ósseo.^{1,25} RANKL é o principal fator estimulatório para a diferenciação e ativação de osteoclastos e seus efeitos são neutralizados pela OPG, que é produzida por osteoblastos, sendo capaz de inibir a reabsorção óssea por impedir a ligação entre RANKL-RANK.^{1,25} Sob condições fisiológicas normais, há um equilíbrio entre a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e a formação óssea mediada por osteoblastos e a razão entre OPG/RANKL é que determina se a reabsorção ou formação óssea ocorrerá.²⁵ O aumento da razão entre OPG/RANKL está associado a formação óssea, enquanto a sua diminuição está associada à reabsorção.²⁵ No presente estudo, os níveis de mRNA da OPG e de RANKL foram avaliados, contudo, somente houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação a OPG, que exibiu maiores níveis de mRNA no GT (GT = $0,84 \pm 0,45$; GC = $0,30 \pm 0,26$; $p=0,001$). De forma mais importante, a razão entre OPG/RANKL foi também significativamente aumentada no GT, indicando maior formação óssea nos sítios em que a aPDT foi associada à RAR (GT = $0,60 \pm 0,86$; GC = $0,23 \pm 0,16$; $p=0,04$). Interessantemente, estudos *in vivo*, recentemente publicados, relataram que a aPDT foi uma alternativa efetiva para controle da perda óssea em áreas de bifurcação presentes em ratos com Periodontite induzida experimentalmente, embora os agentes etiológicos locais tenham sido mantidos pela presença de ligadura ao longo de todo o período experimental.^{84,98}

Diante destes resultados, poderíamos pressupor que a aPDT exerceu um efeito adicional sobre a placa bacteriana periodontopatogênica e seus fatores de virulência. Contudo, é importante considerar que estes resultados podem ser atribuídos exclusivamente aos efeitos bioestimulatórios do laser de baixa intensidade, visto que este pode reduzir a inflamação

periodontal e promover o reparo da ferida através de fatores, como aceleração do processo metabólico, proliferação de fibroblastos, aumento da síntese de colágeno e efeito bioestimulatório sobre a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas com aumento na produção de matriz óssea.^{87,99-101} Embora, os mecanismos biológicos dos efeitos do laser de baixa intensidade não sejam ainda completamente compreendidos, já foi relatado que esta terapia tem importantes efeitos no remodelamento da matriz extracelular através do aumento da expressão gênica de TIMP-2 e concomitante diminuição da expressão da MMP-2 (maior razão entre TIMP-2/MMP-2)¹⁰² e também na regulação do sistema de remodelamento ósseo através da modulação da expressão gênica de OPG/RANKL.¹⁰³

No presente estudo, genes relacionados ao processo inflamatório, tais como, TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10, foram também avaliados. As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β estão envolvidas na resposta Th1 e induzem, principalmente, a imunidade mediada por células, sendo descritas como reguladoras da osteoclastogênese e da expressão de MMPs, enquanto um efeito reverso é exercido pelas citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10.¹ Estas estão envolvidas na resposta imune Th2, promovem imunidade humoral e suprimem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-1 β , pelas células Th1.^{104,105} Desta forma, nas lesões periodontais, o balanço entre a expressão dos mediadores Th1 e Th2 é considerado um fator relevante para a determinação da severidade da doença e do resultado do tratamento através da regulação dos balanços entre TIMPs/MMPs e OPG/RANKL.^{2,106,107} Contudo, embora os resultados do presente estudo tenham mostrado um efeito adicional do protocolo de aPDT aos procedimentos de RAR em relação às expressões gênicas de TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o GT e GC para as expressões de IL-4/TNF- α , IL-4/IL-1 β , IL-10/TNF- α e IL-10/IL-1 β . Isto poderia ser explicado pelo fato que os resultados deste estudo são representativos de um único período de tempo (21 dias após a realização das cirurgias a retalho). Assim, se os

tecidos de granulação neoformados sob o retalho tivessem sido coletados antes de 21 dias, talvez, diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao balanço entre os mediadores Th1 e Th2 pudessem ter sido encontradas.

Neste estudo, foram também investigados os níveis de mRNA para COL I, que está relacionado à formação de matriz, e para os fatores associados à formação de osso e cimento, como ALP, OPN, OCN e SLP. COL I é a principal proteína encontrada nos tecidos periodontais; a ALP é um excelente indicador de atividade de formação óssea, sendo um marcador fenotípico de células osteoblásticas;¹⁰⁸ a OPN é considerada como um marcador de diferenciação para osteoblastos e cementoblastos;¹⁰⁹ já a OCN e a SLP são proteínas específicas de tecidos mineralizados que parecem atuar na fase inicial de mineralização óssea.^{110,111} Embora os resultados do presente estudo tenham sugerido um potencial para melhor remodelamento da matriz extracelular e maior formação óssea nos sítios do GT, os níveis de mRNA para COL I, ALP, OPN, OCN e SLP foram expressos de forma similar em ambos os grupos. Novamente, é importante considerarmos que o presente estudo coletou amostras apenas em um dado período de tempo, sendo por este motivo, impossível determinar a cinética dos eventos durante todo o curso do processo de reparo. Desta forma, não é possível saber se em um período maior de cicatrização (superior a 21 dias de pós-operatório), diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação aos níveis de mRNA para COL I, ALP, OPN, OCN e SLP poderiam ser detectadas. Todavia, estudos adicionais são necessários para investigar cineticamente, e não somente de maneira pontual, os efeitos da aPDT (ou apenas do uso do laser de baixa intensidade) sobre o reparo periodontal.

Outro ponto importante a ser mencionado nesta pesquisa é que a aPDT foi aplicada em uma única sessão, apesar do fabricante recomendar repetidas aplicações durante as primeiras semanas de cicatrização (aplicações semanais por 4 a 6 semanas), de forma a potencializar o efeito antimicrobiano. Neste estudo, apenas uma aplicação de aPDT foi feita, de forma a não

adicionar variáveis na análise, o que poderia influenciar os resultados. Além disso, condições locais, como volume de fluido gengival ou sangue podem ter interferido no protocolo de aPDT.^{112,113}

Embora, uma meta-análise recentemente publicada tenha concluído que a terapia combinada (RAR + aPDT) resulte em melhoras clínicas superiores, quando comparada ao tratamento isolado (RAR apenas),¹¹⁴ futuros estudos são necessários para determinar qual é o protocolo ideal de aPDT para potencialização do efeito antimicrobiano (se, por exemplo, múltiplas aplicações melhoram os resultados da terapia) e também elucidar os efeitos bioestimulatórios do laser de baixa intensidade no tratamento periodontal. Além disso, futuros estudos clínicos, controlados e randomizados deverão ser conduzidos, a fim de comparar a RAR com RAR + aPDT, aPDT apenas, RAR + laser de baixa intensidade, laser de baixa intensidade, RAR + fotossensibilizador e fotossensibilizador apenas, de forma a esclarecer os efeitos de cada terapia e a associação delas no tratamento da doença periodontal.

6. CONCLUSÃO

- O protocolo de aPDT utilizado neste estudo e associado aos procedimentos de RAR foi capaz de modular as respostas inflamatória, imunológica e cicatricial dos tecidos periodontais, através do aumento da concentração de TGF- β no FCG 45 dias após a terapia inicial básica e da diminuição do volume de FCG e aumento dos níveis de mRNAs de TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL 21 dias após a realização das cirurgias a retalho.
- Não é possível concluir se estes resultados se devem aos efeitos bioestimulatórios do laser de baixa intensidade utilizado no protocolo de aPDT e/ou à ação antimicrobiana deste.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:12-20.

2-Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004;31:671-9.

3-Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005;76:2033-41. Review.

4-Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 1998;69:1419-25.

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

6-Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003;30:1046-52.

7-Cesar-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking modulates interleukin-6: interleukin-10 and RANKL: osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontol Res*. 2007;42:184-91.

8-Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4:197-250. Review.

9-Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002;19:3719-27. Review.

10-Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993;64:474-84. Review.

- 11-Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G, Sipos T, Baron HJ. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28:146-56.
- 12-Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res.* 1994;8:312-9. Review.
- 13-van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol.* 1997;24:297-305. Review.
- 14-Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis.* 1996;2:70-6. Review.
- 15-Kerkvliet EH, Docherty AJ, Beertsen W, Everts V. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. *Matrix Biol.* 1999;18:373-80.
- 16-Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995;270:5872-6.
- 17-Konttinen YT, Ceponis A, Takagi M, Ainola M, Sorsa T, Sutinen M, Salo T, Ma J, Santavirta S, Seiki M. New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: destruction from above. *Matrix Biol.* 1998;17:585-601.
- 18-César Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H Jr, Sallum EA, Nociti FH Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol.* 2004;75:995-1000.
- 19-Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol.* 2003;74:188-95.
- 20-Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res.* 1988;23:386-93.
- 21-Ingman T, Sorsa T, Konttinen YT, Liede K, Saari H, Lindy O, Suomalainen K. Salivary collagenase, elastase- and trypsin-like proteases as biochemical markers of periodontal tissue

destruction in adult and localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8:298-305.

22-Said S, Mohd H, Sander L, Rönkä H, Sorsa T, Kinane DF. GCF levels of MMP-3 and MMP-8 following placement of bioresorbable membranes. *J Clin Periodontol.* 1999;26:757-63.

23-Tonetti MS, Freiburghaus K, Lang NP, Bickel M. Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontal Res.* 1993;28:511-3.

24-Okuda K, Miyazaki A, Momose M, Murata M, Nomura T, Kubota T, Wolff LF, Yoshie H. Levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and matrix metalloproteinases-1 and -8 in gingival crevicular fluid following treatment with enamel matrix derivative (EMDOGAIN). *J Periodontal Res.* 2001;36:309-16.

25-Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79:1569-76. Review.

26-Nociti FH Jr, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/MD-2. *J Dent Res.* 2004;83:602-7.

27-Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontal Res.* 2008;43:127-35.

28-Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int.* 1994;18:617-28.

29-Nakashima K, Roehrich N, Cimasoni G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol.* 1994;21:327-33.

30-Sharma CG, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease. *J Periodontol.* 2006;77:1674-80.

31-Chapple IL, Garner I, Saxby MS, Moscrop H, Matthews JB. Prediction and diagnosis of attachment loss by enhanced chemiluminescent assay of crevicular fluid alkaline phosphatase levels. *J Clin Periodontol.* 1999;26:190-8.

- 32-Daltaban O, Saygun I, Bal B, Balos K, Serdar M. Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase levels in postmenopausal women: effects of phase I periodontal treatment. *J Periodontol*. 2006;77:67-72.
- 33-Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem*. 1997;30:573-93.
- 34-Hill SJ, Ebersole JL. The effect of lipopolysaccharide on growth factor-induced mitogenesis in human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 1996;67:1274-80.
- 35-Hahn CL, Schenkein HA, Tew JG. Polyclonal B cell activators and in vitro induction of auto-antibody reactive with collagen. *J Periodontal Res*. 1997;32:608-13.
- 36-Anusaksathien O, Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002;3:129-39. Review.
- 37-Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8:193-204. Review.
- 38-Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol*. 2004;31:527-33.
- 39-Dörfer CE. Antimicrobials for the treatment of aggressive periodontitis. *Oral Dis*. 2003;9:51-3. Review.
- 40-de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol*. 2007;78:965-73.
- 41-de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Scombatti de Souza SL, Ribeiro FJ. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol*. 2009;80:98-105.
- 42-Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol*. 2004;75:196-209.
- 43-Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontol*. 2006;33:241-53.

- 44-Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006;77:1289-303. Review.
- 45-Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* 2004;36:98-120.
- 46-Guentsch A, Jentsch H, Pfister W, Hoffmann T, Eick S. Moxifloxacin as an adjunctive antibiotic in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2008;79:1894-903.
- 47-Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 2001;28:499-507.
- 48-Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 1993;28:204-10.
- 49-Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8:182-7.
- 50-Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol*. 2004;75:1343-9.
- 51-Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*. 2005;76:1100-5.
- 52-Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Jr, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17:273-81.
- 53-Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2003;18:51-5.
- 54-Shibli JA, Martins MC, Nociti FH Jr, Garcia VG, Marcantonio E Jr. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol*. 2003;74:338-45.
- 55-Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:104-8.

- 56-Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000;72:676-80.
- 57-Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009;80:1790-8.
- 58-Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86:694-707. Review.
- 59-Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005;79:159-70.
- 60-Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29:165-73.
- 61-Stein E, Koehn J, Sutter W, Schmidl C, Lezaic V, Wendtlandt G, Watzinger F, Turhani D. Phenothiazine Chloride and Soft Laser Light Have a Biostimulatory Effect on Human Osteoblastic Cells. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:71-7.
- 62-Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:412-8.
- 63-Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol.* 2007;34:370-6.
- 64-Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res.* 2006;41:354-60.
- 65-Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol.* 2009;80:234-43.
- 66-Bower RC. Furcation morphology relative to periodontal treatment: Furcation entrance architecture. *J Periodontol.* 1979;50:23-7.
- 67-Bower RC. Furcation morphology relative to periodontal treatment: Furcation root surface anatomy. *J Periodontol.* 1979;50:366-74.

68-Goldman MJ, Ross IF, Goteiner D. Effect of periodontal therapy on patients maintained for 15 years or longer. A retrospective study. *J Periodontol.* 1986;57:347-53.

69-Gonçalves PF, Lima LL, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Root cementum may modulate gene expression during periodontal regeneration: a preliminary study in humans. *J Periodontol.* 2008;79:323-31.

70-Lima LL, Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *J Periodontal Res.* 2008;43:459-64.

71-Mardam-Bey W, Majzoub Z, Kon S. Anatomic considerations in the etiology and management of maxillary and mandibular molars with furcation involvement. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1991;11:398-409.

72-Dunlap RM, Gher ME. Root surface measurement of the mandibular first molars. *J Periodontol.* 1985;56:234-8.

73-Matia JI, Bissada NF, Maybury JE, Ricchetti P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1986;6:24-35.

74-Palioto DB, Joly JC, de Lima AF, Mota LF, Caffesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GTR with and without inorganic bone matrix. *J Clin Periodontol.* 2003;30:1-8.

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

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

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

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

- 79-Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M Jr, Teofilo JM, Jacob-Ferreira AL, Tanus-Santos JE, Novaes AB Jr, Gerlach RF. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2009 (in press).
- 80-Yoshinari N, Kawase H, Mitani A, Ito M, Sugiishi S, Matsuoka M, Shirozu N, Ishihara Y, Bito B, Hiraga M, Arakawa K, Noguchi T. Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid and gingival tissues. *J Periodontol Res*. 2004;39:158-67.
- 81-Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004;83:166-9.
- 82-Matia JI, Bissada NF, Maybury JE, Ricchetti P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1986;6:24-35.
- 83-Parashis AO, Anagnou-Vareltzides A, Demetriou N. Calculus removal from multirooted teeth with and without surgical access. (I). Efficacy on external and furcation surfaces in relation to probing depth. *J Clin Periodontol*. 1993;20:63-8.
- 84-de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol*. 2008;79:1081-8.
- 85-Tersin J. Studies of gingival conditions in relation to orthodontic treatment. I. The relationship between amounts of gingival exudate and gingival scores, plaque scores and gingival pocket depths in children undergoing orthodontic treatment. *Swed Dent J*. 1973;66:165-75.
- 86-Griffiths GS, Sterne JAC, Wilton JMA, Eaton KA, Johnson NW. Associations between volume and flow rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. *J Clin Periodontol*. 1992;19:464-70.
- 87-Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, Enwemeka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*. 2004;22:241-7.
- 88-Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. 2005;32:714-9.

- 89-Lai SM, Zee KY, Lai MK, Corbet EF. Clinical and radiographic investigation of the adjunctive effects of a low-power He-Ne laser in the treatment of moderate to advanced periodontal disease: a pilot study. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:287-93.
- 90-Sodek J, Overall CM. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix Suppl.* 1992;1:352-62. Review.
- 91-Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors* 2006;24:260-7. Review.
- 92-Safavi SM, Kazemi B, Esmaeili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med Sci.* 2008;23:331-5.
- 93-Rocha Júnior AM, Vieira BJ, de Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:303-7.
- 94-Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:602-8.
- 95-Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res.* 2003;38:115-21.
- 96-Grayson R, Douglas CWI, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase-2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol.* 2003;30:542-50.
- 97-Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini JP, Karimbux NY. Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Periodontol.* 2003;74:494-500.
- 98-de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007;78:566-75.
- 99-Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2005;76:187-93.

- 100-Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:540-5.
- 101-Stein E, Koehn J, Sutter W, Schmidl C, Lezaic V, Wendtlandt G, Watzinger F, Turhani D. Phenothiazine Chloride and Soft Laser Light Have a Biostimulatory Effect on Human Osteoblastic Cells. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:71-7.
- 102-Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med.* 2006;38:779-86.
- 103-Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, Zhang X, Liu S. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:309-15.
- 104-Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17:138-46.
- 105-Essner R, Rhoades K, McBride WH, Morton DL, Economou JS. IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol.* 1989;142:3857-61.
- 106-Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003;38:210-7.
- 107-Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004;35:21-41.
- 108-Schmidt-Gayk H, Roth HJ, Becker S, Reichel H, Boneth HG, Knuth UA. Noninvasive parameters of bone metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1995;4:334-8.
- 109-Strayhorn CL, Garrett JS, Dunn RL, Benedict JJ, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes. *J Periodontol.* 1999;70:1345-54.
- 110-Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996;317:59-64.
- 111-Nakayama Y, Mezawa M, Araki S, Sasaki Y, Wang S, Han J, Li X, Takai H, Ogata Y. Nicotine suppresses bone sialoprotein gene expression. *J Periodontal Res.* 2009;44:657-63.

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

113-Wilson M, Sarkar S, Bulman JS. Effect of blood on the lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *Lasers Med Sci.* 1994;8:297–303.

114-Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2009;25:605-13.

ANEXOS

ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/347/FORP

Ribeirão Preto, 18 de outubro de 2007.

Prezado (a) Pesquisador (a),

Ref.: Processo nº 2007.1.1084.58.3
Caae n. 0048.0.138.000-07

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 82ª Sessão, realizada no dia 18 de outubro de 2007, **aprovou** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Avaliação da terapia fotodinâmica na descontaminação radicular e na modulação das respostas imuno-inflamatória e cicatricial de tecidos periodontais. Estudo clínico controlado e randomizado em humanos"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, esclarecemos que o **Relatório Parcial** deverá ser encaminhado à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa até o dia **30 de outubro de 2008**, e o **Relatório Final** até o dia **30 de outubro de 2009**, acompanhados do Formulário que se encontra no *site* da FORP/USP (*link*: Colegiados e Comissões - Comitê de Ética em Pesquisa - Formulários do Pesquisador para entrega dos Relatórios Parcial ou Final).

Atenciosamente,

Glaucete Della Rosa

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. SÉRGIO LUÍS SCOMBATTI DE SOUZA

Professor Associado do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia – FORP/USP

GDR/bgcp

ANEXO 2

Title: Effects of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal repair: a randomized clinical trial.

Sérgio L. S. Souza¹, Patrícia F. Andrade¹, João S. Silva², Fabrine S. M. Tristão², Fernanda A. Rocha², Daniela B. Palioto¹, Marcio F. M. Grisi¹, Mário Taba Jr¹, Arthur B. Novaes Jr¹.

¹Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²Department of Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Send correspondence to:

Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Av. do Café, S/N, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil

e-mail: scombatti@forp.usp.br

Short running title: Antimicrobial PDT in periodontal repair.

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interests.

This study was supported financially by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP: protocol number 07/04916-9) and CAPES (Coordination for the Development of Personnel in Higher Education).

Abstract

Background and Objective: Adjunctive therapy to scaling and root planning (SRP), as the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), has been proposed. The transforming growth factor- β 1 (TGF- β) levels in the gingival crevicular fluid (GCF) can monitor the periodontal repair. This study evaluated the adjunct effect of aPDT to SRP through of the TGF- β levels in GCF after non-surgical and surgical therapy in chronic periodontitis patients.

Methods: Fifteen patients, presenting bilaterally lower molars with class III furcation lesions, were selected. Each par of teeth was randomly assigned to control group (CG) or test group (TG). In initial therapy, SRP was performed in the CG, while SRP + aPDT were performed in the TG. At 45 days post-initial therapy, flap surgery plus SRP, and flap surgery plus SRP + aPDT were performed in the CG and TG, respectively. GCF was collected and ELISA was performed to determine the amount and concentration of TGF- β in the GCF at baseline, 45 days post-initial therapy and 21 days after the surgeries.

Results: Statistically significant differences between the groups were found in relation to GCF volume 21 days after the surgical procedures ($p=0.03$) and TGF- β concentration in GCF 45 days post-initial therapy ($p=0.04$), favouring the TG. Similar amounts and concentrations of TGF- β were found at different periods in each group, with no statistically significant differences.

Conclusion: There was an additional effect of the aPDT protocol to SRP for the TGF- β concentration in GCF 45 days after non-surgical therapy, and for the GCF volume 21 days after surgical therapy.

Key words: antimicrobial photodynamic therapy; scaling and root planning; gingival crevicular fluid; ELISA.

Introduction

Current concepts for periodontal treatment are based on mechanical scaling and root planing (SRP) to remove bacterial plaque, calculus, and cementum contaminated by bacteria and endotoxins, however, this removal can be impaired in sites with difficult access for adequate instrumentation (e.g., furcation lesions, severe periodontal pockets, and concavities). Multirrooted teeth, for example, have special anatomical characteristics that make access difficult for adequate instrumentation in the furcation area, reason for the more frequent loss of these teeth (1-3). Thus, the assessment of adjunctive therapy to conventional procedures of SRP, such as the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), has been proposed (4).

The biological principle of aPDT is based on inactivation of target cells, microorganisms or molecules by the use of a photosensitizer (or photoactive dye) and a laser light source (low-power visible light with a suitable wavelength). In aPDT, the laser light source activates the photosensitizer that is linked to a target cell (bacteria, for example) and that is capable of absorbing light of a specific wavelength and transforming it into useful energy. The transfer of energy from the activated photosensitizer to the target cell's available oxygen molecules results in the formation of toxic oxygen species, such as singlet oxygen and free radicals. These chemical substances can damage proteins, lipids, nucleic acids, and other cellular components, such as mitochondria, lysosomes, and nuclei and cell membranes (4,5). Studies have demonstrated the bactericidal effect of aPDT against periodontal pathogens, and in addition, the potential of some key virulence factors (lipopolysaccharide and proteases) were shown to be reduced by photosensitization (6-11). Recently, an *in vitro* study demonstrated that the aPDT has also the potential to inactivate host inflammatory cytokines, such as, interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), through independent

mechanism of the bacterial lysis (6). As an adjunctive therapy, studies has demonstrated that the aPDT can improve the clinical outcomes compared to SRP therapy alone in non-surgical periodontal treatment (12-16). Furthermore, similar clinical results and effects on crevicular TNF- α and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) levels were found in patients with aggressive periodontitis after non-surgical treatment with aPDT or SRP (17,18).

Hence, the aPDT may be used as an adjunct to conventional surgical or non-surgical periodontal therapy, especially for the cases where these procedures have shown limited results (12-16). Therefore, it is possible to assume that the aPDT may contribute to restore the periodontal homeostasis and to promote a faster repair after the treatment.

The transforming growth factor- β 1 (TGF- β) is a key mediator in the limitation and resolution of inflammation, and its levels in gingival crevicular fluid (GCF) can be useful to monitor the progress of periodontal repair (19,20). Thus, to further understand the effect of the aPDT on periodontal repair, the present randomized, controlled, clinical study aimed to assess the TGF- β levels in GCF samples collected from the furcation lesions in patients with chronic periodontitis during the non-surgical and surgical periodontal therapy, using aPDT associated to SRP or SRP alone.

Material and Methods

Study Population

Fifteen subjects (6 males and 9 females, aged 36 to 65), presenting bilaterally lower molars with class III furcation lesions and scheduled for extraction, were included in this study. Subjects were selected from the pool of patients of the Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, from March 2007 to September 2008. The inclusion criteria for the study were: adult subjects with chronic periodontitis, presenting bilaterally lower molars with class III furcation lesions, scheduled for extraction, without endodontic treatment or presence of periapical or pulpal alterations, and caries or restorations close to the gingival margin. The exclusion criteria were: pregnant or lactating women; anti-inflammatory, antibiotic, or hormone use during the 6 months before the study; evidence of systemic modifiers of periodontal disease, such as osteoporosis, smoking, diabetes, or the use of drugs that influence periodontal tissues; compromised heart condition or any other systemic disorder that require antibiotic prophylaxis; and periodontal treatment within the last 6 months.

Subjects were instructed as to the character and purpose of the study, and all signed an informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the Institution's Human Research Committee (number: 2007.1.1084.58.3).

Study Design

The study was performed using the split-mouth design and all patients were treated by the same experienced operator (P.F.A.). Each pair of teeth with class III furcation lesions was randomly assigned, through a coin toss, to control and test groups (CG and TG, respectively).

The randomization was performed by a blinded investigator immediately following the end of the SRP. In the initial therapy, only SRP was performed in the CG, while in the TG, the SRP was associated to aPDT, using a phenothiazine photosensitizer and a laser source with wavelength of 660nm. At 45 days post-initial therapy, flap surgery plus SRP and flap surgery plus SRP + aPDT were performed in the CG and TG, respectively. At 21 days post-surgery, the newly formed granulation tissues in the class III furcation defects were collected carefully for assessing gene expression by the quantitative polymerase chain reaction (PCRq) technique (data not yet reported), and the teeth were extracted. All patients were recalled for control and prophylaxis once a week during all the period of the study.

Oral Hygiene Program

Fourteen days before treatment, all patients were instructed about the cause and consequences of periodontal disease, and received oral hygiene instructions, according to individual needs. Supragingival plaque retention factors were removed, cavities were filled, and supragingival professional tooth cleaning was performed 7 days before clinical examination.

Initial Therapy

After the clinical examination, radiographs, diagnosis, and treatment planning, the sites, which were not included in the study, received subgingival scaling and root planning, and extractions were performed, if indicated. Furthermore, occlusal adjustment was performed when necessary.

In sequence, the teeth selected for the study were treated. The mechanical subgingival instrumentation was performed in both groups, under local anesthesia, using ultra-sonic device with a scaler tip (Swivel Ultrasonic Inserts - AF Swivel Direct Flow Straight 25K - Hu-Friedy Co., Chicago, ILL, U.S.A) and hand instruments (Gracey curettes nº 7/8, 11/12 and 13/14, and mini five Gracey curettes nº 7/8, 11/12 and 13/14 - Hu-Friedy Co., Chicago, ILL, U.S.A), with subsequent rinsing with sterile saline. Following, in the TG, a diode laser (Helbo Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria) with a wavelength of 660nm and power density of 60mW/cm^2 was employed together with a phenothiazine chloride photosensitizer (main component is toluidine-blue - Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria) in a concentration of 10mg/ml. The photosensitizer was applied placing the applicator (blunt canula) at the bottom of the periodontal pockets (in 6 sites of tooth: furcation area and proximal sites) and was continuously deposited in a coronal direction in order to achieve complete filling of the pockets and coating of the root surfaces. After 1 minute, the pockets were irrigated with sterile saline to remove the excess photosensitizer. In sequence, the pockets were exposed to the laser light, using the fiber optic applicator (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria) of 0.6mm diameter, during 10 seconds per site. The treatment was done in 6 sites per tooth, totaling 1 minute of treatment per tooth (or totaling 20 seconds of laser light application in the furcation area).

Surgical Procedures

At 45 days post-initial therapy, the class III furcation lesions were accessed surgically in the same session. Thus, flap surgery plus SRP and flap surgery plus SRP + aPDT were performed in the CG and TG, respectively. Following local anesthesia, intrasulcular incisions

were made, and buccal and lingual mucoperiosteal flaps were raised. The granulation tissue was removed from the defect, and then, treatment was performed according to the group assignment, as in the initial therapy. In both groups, the flaps were positioned coronally to cover the furcation entrance and sutured. Analgesic medication was prescribed for 3 days, and chlorhexidine rinses (0.12%), used twice daily, were prescribed throughout the experimental period (21 days). Patients were instructed for the standard concerns in the postoperative period, such as no physical exercise, feeding advice, and plaque-control techniques. Sutures were removed after 7 days. At 21 days post-surgery, the newly formed granulation tissue in the class III furcation defects was collected, and the teeth were extracted.

Collection of Gingival Crevicular Fluid (GCF) Samples

GCF samples were collected by one blinded investigator from the furcation area of the experimental teeth at baseline, 45 days post-initial therapy (immediately before the flap surgery), and 21 days after the surgical procedures. Prior to GCF sampling, the supragingival plaque was removed from the selected sites, and these were dried gently by an air syringe and isolated by cotton rolls to avoid saliva contamination. Sterile periopaper strips (PerioPaper, Oraflow, Amityville, NY) were carefully inserted into the periodontal pocket of furcation area (buccal surface) until mild resistance was felt and were left in place for 30 seconds. This procedure was repeated in the same site with 3-minute intervals between sampling (21). Care was taken to avoid mechanical injury and strips contaminated with blood, saliva or debris were discarded. Samples were always taken from the same sites at the three visits. The absorbed GCF volume for each strip was determined by an electronic gingival fluid measuring device (Periotron 6000, Oraflow, Amityville, NY), which had been calibrated with known serial volumes of human serum, and, subsequently, the strips were placed into sterile

microtubes and kept at -70°C until laboratory analysis (the strips from each site were placed in the same microtube). The readings from the electronic instrument were converted to an actual volume (microliters) by reference to the standard curve.

For elution of the GCF components from the strips, 250 μl of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) were added to each microtube containing the strips. Subsequently, the microtubes were vortexed for 1 minute and then centrifuged at 2000g for 15 minutes at 4°C . The strips were then discarded and the supernatant was aliquoted into sterile tubes, which were stored at -70°C until enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis was conducted to determine the amount and concentration of TGF- β in the GCF (primary outcome measure) at baseline, 45 days post-initial therapy (immediately before the flap surgeries) and 21 days after the surgeries.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)

The amount of transforming growth factor- β 1 (TGF- β) in the GCF samples was determined by ELISA using aliquots of each sample and commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) in accordance with the manufacturer's instructions, from duplicate measurements. The GCF samples were assayed at the following dilution: 1:6, according to standardization performed in our laboratory. These results were expressed in pg/ml and converted to pg/ μl , then being multiplied by the initial sample volume (250 μl buffer + total GCF volume) to obtain results as pg/sample (22). The calculation of the TGF- β concentration in each GCF sample was performed by dividing the total amount of TGF- β (pg/sample) by the total GCF volume of the sample. Thus, the results were also expressed as picograms of TGF- β per microliter of GCF.

Statistical analysis

The GCF volume and the total amount and concentration of TGF- β in GCF were recorded as mean and standard deviations (SD). In order to verify the normality of the data, the method of Kolmogorov and Smirnov was used. For the intergroup comparisons (control group X test group), the non-parametric test (Wilcoxon) was applied, since the data of one of the groups failed the normality test. For the intragroup comparisons (baseline X 45 days post-initial therapy X 21 days after the surgical procedures – in each group), the non-parametric test (Kruskal-Wallis) or parametric test (one-way analysis of variance -ANOVA) was applied. The level of significance of 0.05 was employed in all statistical comparisons.

Results

Initially, fifteen patients (n=15 patients; 30 sites analysed; TG: 15 sites; CG: 15 sites) were selected for the study to determine the amount and concentration of TGF- β in the GCF at baseline, 45 days post-initial therapy (immediately before the flap surgeries) and 21 days after the surgeries, however, one patient used anti-inflammatory and antibiotics after the surgeries and, thus, was excluded from the statistical analysis related to the 21-day postoperative period. At the end of the experimental period, i.e., 21 days after the surgical procedures, the soft tissues were healed completely and didn't have clinical signs of inflammation.

There was a statistically significant difference between the TG and CG for the GCF volume at 21 days after the surgical procedures, favouring the TG. At baseline, the GCF volume was $2.75 \pm 2.22\mu\text{l}$ in the TG, and was $3.11 \pm 2.37\mu\text{l}$ in the CG ($p=0.35$); at 45 days post-initial therapy, the GCF volume was $2.74 \pm 2.64\mu\text{l}$ in the TG, and was $2.85 \pm 3.02\mu\text{l}$ in the CG ($p=0.35$); however, at 21 days after the surgical procedures, the GCF volume in the TG was significantly lower than in the CG (TG = $2.34 \pm 1.81\mu\text{l}$; CG = $3.04 \pm 2.00\mu\text{l}$; $p=0.03$). The intragroup analysis demonstrated no statistically significant differences for the GCF volume between the three periods of evaluation of the study (Table 1 and Figure 1).

In relation to amount of the TGF- β , there was no statistically significant difference between the TG and CG at baseline, 45 days post-initial therapy, and 21 days after the surgical procedures. Furthermore, similar amounts of TGF- β were found at the different time points in each group, with no statistically significant differences (Table 2).

There was a statistically significant difference between the TG and CG in relation to concentration of TGF- β in GCF at 45 days post-initial therapy, favouring the TG. At baseline,

the TGF- β concentration in GCF was $45.59 \pm 100.22\text{pg}/\mu\text{l}$ in the TG, while in the CG it was $25.64 \pm 50.35\text{pg}/\mu\text{l}$ ($p=1$); at 45 days post-initial therapy, the TGF- β concentration in GCF was significantly higher in the TG (TG = $38.35 \pm 71.56\text{pg}/\mu\text{l}$; CG = $5.92 \pm 11.14\text{pg}/\mu\text{l}$; $p=0.04$); in relation to 21-day postoperative period, there was no statistically significant difference between the TG and CG in the TGF- β concentration in GCF (TG = $170.04 \pm 534.38\text{pg}/\mu\text{l}$; CG = $18.51 \pm 31.45\text{pg}/\mu\text{l}$; $p=0.37$). However, the concentrations of TGF- β in GCF showed no statistically significant changes over time in both groups ($p=0.81$ for TG; $p=0.3$ for CG) (Figure 2).

Discussion

The evaluation of changes of TGF- β levels in GCF after periodontal treatment provides an important information relative to the early wound healing process (19). Thus, the present randomized, controlled, clinical study evaluated the adjunct effect of the aPDT to SRP during the non-surgical and surgical periodontal therapy through the evaluation of the TGF- β levels in GCF samples, using class III furcation lesions in patients with chronic periodontitis. The class III furcation lesions were selected for this study only in order to represent the periodontal sites with difficult access for an effective decontamination by classic mechanical methods, such as SRP (1-3). Since the teeth with class III furcation lesions were scheduled for extraction, the newly formed tissues under the flap could be collected 21 days after the surgeries and assessed for the expression of a number of genes (23,24) (data not yet reported). The results of this study showed an additional effect of the aPDT protocol to SRP for the TGF- β concentration in GCF 45 days post-initial therapy ($p=0.04$) and for the GCF volume 21 days after the surgical procedures ($p=0.03$). However, no statistically significant differences were found before and after non-surgical and surgical periodontal therapy for the GCF volume and total amount and concentration of the TGF- β in GCF in each group.

To the authors' knowledge, this is the first study that analyses TGF- β levels in the GCF and its volume in class III furcation lesions before and after periodontal treatment, and thus, comparisons with earlier studies are very difficult. Furthermore, studies about the application of aPDT in the treatment of periodontal disease have used different protocols (different types of photosensitizer, its concentration and duration of application, types of light sources with different wavelengths, power density and energy, duration of light application, and frequency of the aPDT application), impairing also comparisons between this study and others (13-18). The choice of an aPDT protocol was based on recent controlled clinical

studies that showed similar clinical results and effects on crevicular TNF- α and RANKL levels between the SRP and an aPDT protocol alone, using the same protocol of the present study, in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis (17,18).

It is important to mention that the complexity of anatomy of the class III furcation defects may explain the high standard deviation present in the results of this study. Furthermore, although, bilateral defects are more reliable in discriminating between test and control treatments, due to less variability in environmental factors, in the present study, in most of the cases, within the same patients, the defects were considerably different. As a split-mouth design was used and some studies has reported an antimicrobial effect even using photosensitizer alone, care was taken to avoid that the dye had accidentally contacted with the tissues and tooth of the control group (25-27).

The anatomy of the class III furcation defects in mandibular molars, due to its complexity, is responsible for the lack of predictability of the SRP procedures (non-surgical or surgical periodontal therapy), reason for the more frequent loss of these teeth (1-3). The furcal anatomy-related factors, such as, presence of cervical enamel projection, enamel pearls, root or root trunk concavities, bifurcation ridge, furcation entrance dimension and length of root trunk contribute to plaque accumulation and/or impair the access for an effective decontamination by currently available instrumentation techniques (sonic, ultrasonic and manual instrumentation), while the morphology of the bony defect and amount of periodontium that remains apical and lateral to the defect play a role in the healing capabilities of these sites (1,2,28-31). The aPDT is an easy-handling technique, due to use of a photosensitizer and a laser, which are applied at the bottom of the periodontal pocket and furcation area with a blunt needle and an optic fiber, respectively, and therefore, the aPDT seems to be appropriate to achieve sites with difficult access for instrumentation in all its extension. Thus, in the current study, we tested the hypothesis that the adjunct use of aPDT to

SRP may result in an additional improvement for reducing the bacterial load in class III furcation lesions and, consequently, that significant changes in GCF volume and TGF- β levels in GCF may be detected after periodontal treatment.

The results of the SRP group corroborate clinical trials that have reported the ineffectiveness of SRP procedures in the non-surgical or surgical periodontal treatment of class III furcation defects (30,32). However, in the SRP + aPDT group, there were also no statistically significant differences after non-surgical and surgical periodontal therapy for the GCF volume and total amount and concentration of the TGF- β in GCF. On the other hand, there was a statistically significant difference between the SRP group and SRP + aPDT group in relation to TGF- β concentration in GCF 45 days post-initial therapy and for the GCF volume 21 days after the surgical procedures, favouring the TG.

Investigators have reported that the change in GCF volume is the most sensitive and least subjective indicator of alterations in periodontal inflammation (33,34). Based on GCF volume, our data suggest that the surgical treatment with SRP + aPDT, when compared to the surgical treatment, using only SRP, contributed to decrease in inflammation after 21 days. This result is in accordance with those of a recent study, also evaluating the effects of adjunctive aPDT in chronic periodontitis (15). Assessing 20 patients, the authors found significantly lower values for the sulcus fluid flow rate (relative Periotron-units) in the test group (SRP + aPDT) than in the control group (SRP) 3 months after treatment (15). Besides, in controlled clinical studies in patients with chronic periodontitis, the adjunct use of aPDT to SRP, when compared to SRP alone, resulted in a statistically significant improvement of bleeding on probing scores (BOP scores), indicating also a higher reduction of periodontal inflammation (13-16). Another study, but in patients with aggressive periodontitis, there was also a significant reduction in BOP scores after application of aPDT alone, which was similar to SRP group (17). Thus, based on results of these studies, it may be concluded that the aPDT

is able to contribute to the reduction of inflammation. On the other hand, it is important to consider that the beneficial effect on inflammation may be attributed to additional treatment with low-level laser, which has been used in aPDT (35,36). After the adjunctive use of low-level laser therapy to SRP, studies found also a greater decrease in GCF volume than in the control groups (SRP alone), demonstrating that the additional treatment with low-level lasers is able to reduce periodontal inflammation (36,37).

The TGF- β is a key mediator in the limitation and resolution of inflammation, and its levels in GCF can be useful to monitor the progress of periodontal repair (19-20). This growth factor has important effects on regulation of MMPs: suppresses collagenase production by fibroblasts and macrophages, while enhances the expression of tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), resulting, consequently, in a decrease of connective tissue matrix destruction (38). Furthermore, TGF- β has effects on cell proliferation and differentiation process, increases the synthesis of extracellular matrix molecules, and is considered as a chemotactic agent for bone cells (38). Thus, the higher TGF- β concentration in GCF (greater amount of TGF- β in the smallest GCF volume) may suggest a better resolution of inflammation and repair processes at 45 days after the non-surgical periodontal treatment associated to aPDT, when compared to SRP alone. After surgical treatment, greater amount (2.5 times higher than the control group) and concentration of TGF- β in GCF (approximately ten times higher than the control group) were also found for aPDT associated to SRP, however there were no statistically significant differences between the groups. As mentioned above, these results may also be attributed only to additional application of low-level laser, since it is an effective tool to reduce inflammation and promote wound repair (35). The findings in an *in vivo* study suggested that low-level laser irradiation may decrease the amount of inflammation and accelerate the wound healing process by inhibiting the expression of genes responsible for the production of pro-inflammatory cytokines, while increasing the gene expression of TGF- β (39). In another

recent study in rats, higher levels of TGF- β were found in connective tissue samples after low-level laser therapy, suggesting that the enhancement of TGF- β synthesis may be an important mechanism by which low-level laser reduces the inflammatory reaction during the healing process (40).

Thus, the results of this study suggest the adjunct use of the aPDT to SRP may contribute to a higher reduction of inflammation and enhance the periodontal repair. However, it is not possible to conclude if these effects may be attributed to antimicrobial action of aPDT and/or to biostimulatory effect of low-level laser. Furthermore, it is important to consider that the aPDT was applied in a single session, but according to the manufacturer's recommendation, repeated aPDT applications should be performed during the first weeks of healing in order to enhance the antimicrobial effect and to optimize the periodontal repair. Although, a recently published meta-analysis has concluded that the combined approach (SRP with aPDT) provides potential clinical improvements (12), further studies are necessary to determine which is the best aPDT protocol to enhance antimicrobial action (if multiple aPDT applications may improve the therapy outcomes) and biostimulatory effect of low-level laser in the treatment of periodontal disease. Also, future randomized, controlled, clinical studies should be conducted to compare SRP alone with SRP + aPDT, aPDT alone, SRP + low-intensity laser, low-intensity laser alone, SRP + photosensitizer, and photosensitizer alone in order to clarify the effects of each therapy and their association on periodontal disease.

Acknowledgments

The authors thank the State of São Paulo Research Foundation, São Paulo, SP, Brazil (FAPESP, grant 07/04916-9 to Dr Scombatti) and CAPES (Coordination for the Development of Personnel in Higher Education - Brasília, DF, Brazil).

References

1. Bower RC. Furcation morphology relative to periodontal treatment: Furcation entrance architecture. *J Periodontol* 1979; 50: 23-27.
2. Bower RC. Furcation morphology relative to periodontal treatment: Furcation root surface anatomy. *J Periodontol* 1979; 50: 366-374.
3. Goldman M, Ross I, Goteiner D. Effect of periodontal therapy on patients maintained for 15 years or longer. *J Periodontol* 1986; 57: 347-353.
4. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005; 79: 159-170.
5. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007; 86: 694-707. Review.
6. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol* 2009; 80: 1790-1798.
7. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 51-55.
8. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000; 72: 676-680.
9. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004; 75: 1343-1349.

10. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 1993; 28: 204-210.
11. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005; 76: 1100-1105.
12. Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2009; 25: 605-613.
13. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008; 79: 1638-1644.
14. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 681-688.
15. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 877-884.
16. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007; 18: 34-38.
17. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007; 78: 965-973.

18. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* 2009; 80: 98-105.
19. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 527-533.
20. Sodek J, Overall CM. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix Suppl* 1992; 1: 352-362. Review.
21. Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol* 2009; 80: 234-243.
22. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* (in press) 2009.
23. Gonçalves PF, Lima LL, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Root cementum may modulate gene expression during periodontal regeneration: a preliminary study in humans. *J Periodontol* 2008; 79: 323-331.
24. Lima LL, Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *J Periodontal Res* 2008; 43: 459-464.
25. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001; 29: 165-173.

-
26. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008; 79: 1081-1088.
 27. Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12: 104-108.
 28. Dunlap RM, Gher ME. Root surface measurement of the mandibular first molars. *J Periodontol* 1985; 56: 234-238.
 29. Mardam-Bey W, Majzoub Z, Kon S. Anatomic considerations in the etiology and management of maxillary and mandibular molars with furcation involvement. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1991; 11: 398-409.
 30. Matia JI, Bissada NF, Maybury JE, Ricchetti P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1986; 6: 24-35.
 31. Palioto DB, Joly JC, de Lima AF, Mota LF, Caffesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GTR with and without inorganic bone matrix. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 1-8.
 32. Parashis AO, Anagnou-Vareltzides A, Demetriou N. Calculus removal from multicroot teeth with and without surgical access. (I). Efficacy on external and furcation surfaces in relation to probing depth. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 63-68.
 33. Tersin J. Studies of gingival conditions in relation to orthodontic treatment. I. The relationship between amounts of gingival exudate and gingival scores, plaque scores and gingival pocket depths in children undergoing orthodontic treatment. *Swed Dent J* 1973; 66: 165-175.

-
34. Griffiths GS, Sterne JAC, Wilton JMA, Eaton KA, Johnson NW. Associations between volume and flow rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 464-470.
 35. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg* 2004; 22: 241-247.
 36. Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 714-719.
 37. Lai SM, Zee KY, Lai MK, Corbet EF. Clinical and radiographic investigation of the adjunctive effects of a low-power He-Ne laser in the treatment of moderate to advanced periodontal disease: a pilot study. *Photomed Laser Surg* 2009; 27: 287-293.
 38. Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors* 2006; 24: 260-267. Review.
 39. Safavi SM, Kazemi B, Esmaeili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med Sci* 2008; 23: 331-335.
 40. Rocha Júnior AM, Vieira BJ, de Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg* 2009; 27: 303-307.

Tables

Table 1. Intragroup and intergroup comparisons of the mean values $\pm$ SD for the GCF volume (μ l).

	TG	CG	<i>P</i> - Intergroup
Baseline	2.75 $\pm$ 2.22	3.11 $\pm$ 2.37	0.35
T1	2.74 $\pm$ 2.64	2.85 $\pm$ 3.02	0.35
T2	2.34 $\pm$ 1.81	3.04 $\pm$ 2.00	0.03*
<i>P</i> - Intragroup	0.85	0.45	

Periods of evaluation: baseline; 45 days post-initial therapy (immediately before the flap surgery – T1); 21 days after the surgical procedures (T2). Intragroup comparisons: ANOVA test for the TG and Kruskal-Wallis test for the CG. Intergroup comparisons: Wilcoxon test.

*Statistically significant difference at $p < 0.05$.

Table 2. Intragroup and intergroup comparisons of the mean values $\pm$ SD for the TGF- β levels (pg) in GCF.

	TG	CG	<i>P</i> - Intergroup
Baseline	84.26 $\pm$ 175.43	64.76 $\pm$ 91.17	0.83
T1	49.34 $\pm$ 58.89	39.75 $\pm$ 104.59	0.16
T2	147.74 $\pm$ 358.87	58.66 $\pm$ 113.86	0.43
<i>P</i> - Intragroup	0.98	0.37	

Periods of evaluation: baseline; 45 days post-initial therapy (immediately before the flap surgery – T1); 21 days after the surgical procedures (T2). Intragroup comparisons: Kruskal-Wallis test. Intergroup comparisons: Wilcoxon test. *Statistically significant difference at $p < 0.05$.

Figures Legends

Figure 1. Intragroup and intergroup comparisons of the mean values $\pm$ SD for the GCF volume (μ l). Periods of evaluation: baseline; 45 days post-initial therapy (immediately before the flap surgery – T1); 21 days after the surgical procedures (T2). *Statistically significant difference at $p<0.05$. No statistically significant changes over time in both groups ($p=0.85$ for TG; $p=0.45$ for CG).

Figure 2. Intragroup and intergroup comparisons of the mean values $\pm$ SD for the TGF- β levels in GCF (pg/ μ l). Periods of evaluation: baseline; 45 days post-initial therapy (immediately before the flap surgery – T1); 21 days after the surgical procedures (T2). *Statistically significant difference at $p<0.05$. No statistically significant changes over time in both groups ($p=0.81$ for TG; $p=0.3$ for CG).

ANEXO 3

Title: Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to scaling and root planning in modulation of gene expression. A randomized controlled clinical study.

Patrícia F. Andrade*, Sérgio L. S. Souza*, Gustavo P. Garlet†, João S. Silva‡, Cristiane Milanezi‡, Daniela B. Palioto*, Marcio F. M. Grisi*, Mário Taba Jr*, Arthur B. Novaes Jr*

*Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

†Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

‡Department of Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Send correspondence to:

Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP)

Av. do Café, S/N, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Fax: +55-16-3633-0999. e-mail: scombati@forp.usp.br

Support: State of São Paulo Research Foundation, São Paulo, SP, Brazil (grant FAPESP: protocol number 07/04916-9 to Dr. Scombatti). The authors report no financial relationships related to any products involved in this study.

Word count: 3982.

Number of figures and tables: 6.

Short running title: Photodynamic therapy may modulate gene expression.

Summary: The use adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to scaling and root planning may modulate the extracellular matrix and bone remodeling by upregulating the gene expression of TIMP-2/MMP-2 and OPG/RANKL ratio during periodontal therapy.

ABSTRACT

Background: This study evaluated whether the adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) to scaling and root planning (SRP) may modulate gene expression during periodontal therapy.

Methods: Fifteen patients with chronic periodontitis, presenting bilaterally lower molars with class III furcation lesions and scheduled for extraction, were selected. Each pair of teeth was randomly assigned to control group (CG) or test group (TG). In initial therapy, SRP was performed in the CG, while SRP + aPDT were performed in the TG. At 45 days post-initial therapy, flap surgery plus SRP, and flap surgery plus SRP + aPDT were performed in the CG and TG, respectively. At 21 days post-surgery, the newly formed granulation tissue was collected, and Real-time PCR evaluated the expression of the genes: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-4, interleukin-10, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2), osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), type I collagen, alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and bone sialoprotein.

Results: There were statistically significant differences between the groups in relation to mRNA levels for MMP-2 (TG = 3.26 ± 0.89 ; CG = 4.23 ± 0.97 ; $p=0.01$), TIMP-2/MMP-2 ratio (TG = 0.91 ± 0.34 ; CG = 0.73 ± 0.32 ; $p=0.04$), OPG (TG = 0.84 ± 0.45 ; CG = 0.30 ± 0.26 ; $p=0.001$), and OPG/RANKL ratio (TG = 0.60 ± 0.86 ; CG = 0.23 ± 0.16 ; $p=0.04$), favoring the TG.

Conclusion: The aPDT associated to SRP may modulate the extracellular matrix and bone remodeling by upregulating the TIMP-2/MMP-2 and OPG/RANKL mRNA ratio, respectively.

Key words: photodynamic therapy; scaling and root planning; gene expression; quantitative polymerase chain reaction.

INTRODUCTION

Periodontitis occurs when there is an imbalance between periodontopathogenic bacterial species and the host's defense, which is characterized by the exacerbation of inflammatory and immunological reactions against the bacterial biofilm. The Gram-negative periodontopathogenic bacteria, through of potential virulence factors, specially the lipopolysaccharide (LPS), enzymes and residual products, stimulate the periodontal tissue cells to synthesize inflammatory and immunoregulatory cytokines.^{1,2} Studies have suggested that the differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines on the periodontal tissues is a relevant factor to determinate the disease outcome, probably regulating the balance between the metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), as well as between the receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) and osteoprotegerin (OPG).^{1,2,3} The imbalance between the MMPs and TIMPs production is related to connective tissue destruction, while the disparity between RANKL and OPG levels is related to alveolar bone resorption.^{1,3} Furthermore, LPS has demonstrated a direct action over the regulation of specific genes, modifying mRNA levels, and consequently, the production of proteins related to destruction and formation of periodontal tissues.⁴ Besides that, the periodontal infection avoids the healing process downregulating growth factors and protein formation essential to the periodontal health, such as type I collagen (Col I), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), and bone sialoprotein (BSP).⁵ Due to bacterial action over the inflammatory-immunological process and direct regulation of gene expression of proteins involved on the formation, destruction and repair of periodontal tissues, it is very important that effective procedures are used for decontamination of root surfaces to optimize the periodontal healing process.

In the majority of cases, periodontitis can be successfully treated by oral hygiene improvements, plaque retention factors elimination, and SRP combined or not with periodontal surgery. However, these procedures have shown limited results in the treatment of aggressive periodontitis, and also in smokers and diabetic patients with chronic periodontitis.⁶⁻⁹ Furthermore, a removal of bacterial deposits, calculus, and cementum contaminated by bacteria and endotoxins can be impaired in sites with difficult access for an effective mechanical instrumentation of the root surface, such as in severe periodontal pockets and teeth with furcation lesions.^{10,11} Based on these statements, the assessment of adjunctive therapy to conventional procedures of SRP is important.

The antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been used as a new non-invasive therapeutic approach for the treatment of bacterial, fungal, and viral infections of oral cavity. The biological principle of aPDT is based on inactivation of target cells, microorganisms or molecules by the use of a photosensitizer (or photoactive dye) and a laser light source (low-power visible light with a suitable wavelength).^{12,13}

In aPDT, the laser light source activates the photosensitizer that has been linked to a target cell (bacteria, for example) and that is capable of absorbing light of a specific wavelength and transforming it into useful energy. The energy transfer from the activated photosensitizer to available oxygen molecules of target cell results in toxic oxygen species formation, such as singlet oxygen and free radicals.^{12,13} These chemical substances can damage proteins, lipids, nucleic acids, and other cellular components, such as mitochondria, lysosomes, and nuclei and cell membranes.^{12,13} Studies demonstrate that bactericidal effect of aPDT against periodontal pathogens, and furthermore, some virulence factors, as LPS and proteases, can be reduced by photosensitization.¹⁴⁻²⁰ Recently, an in vitro study demonstrated that the aPDT has also the potential to inactivate host inflammatory cytokines, such as, interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).²⁰ Since the balance between

pro- and anti-inflammatory cytokines (such as IL-4 and IL-10) is supposed to impact periodontitis outcome, interferences in this system by aPDT may underlie its clinical effects.

Hence, the aPDT may represent an alternative to the application of local or systemic antibiotics and antiseptics, and, furthermore, the aPDT may be used as an adjunct to conventional surgical or non-surgical periodontal therapy, especially for the cases where these procedures have shown limited results.²¹⁻²⁶ Therefore, it is possible to assume that the aPDT may contribute to restore the periodontal homeostasis and to promote a faster healing after the treatment.

Thus, to further understand the effect of the aPDT on periodontal healing in sites previously affected by chronic periodontal disease, the present randomized, controlled, clinical study aimed to assess whether the adjunct effect of the aPDT on SRP may modulate gene expression of factors associated to the inflammatory process, matrix degradation, resorption of alveolar bone, cementum and alveolar bone formation during periodontal therapy.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

Fifteen subjects, presenting bilaterally lower molars with class III furcation lesions and scheduled for extraction, were selected from the pool of patients of the Dental School at Ribeirão Preto, University of São Paulo. The inclusion criteria for the study were: adult subjects with chronic periodontitis, presenting bilaterally lower molars with class III furcation lesions and scheduled for extraction, without endodontic treatment or presence of periapical or pulpal alterations, and caries or restorations close to the gingival margin of these teeth. The exclusion criteria were: pregnant or lactating women; anti-inflammatory, antibiotic, or hormone use during the 6 months before the study; evidence of systemic modifiers of periodontal disease, such as osteoporosis, smoking, diabetes, or the use of drugs that influence periodontal tissues; compromised heart condition or any other systemic disorder that require antibiotic prophylaxis; and periodontal treatment within the last 6 months.

Subjects were instructed as to the character and purpose of the study, and all signed an informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the Institution's Human Research Committee (Protocol Number 2007.1.1084.58.3).

Study Design

The study was performed using the split-mouth design and all patients were treated by the same experienced operator. Each par of teeth with class III furcation lesions was randomly assigned by a blinded investigator, through a coin toss, to control and test groups (CG and TG, respectively) immediately following the end of conventional procedures of the scaling and

root planning (SRP). In the initial therapy, only the SRP was performed in the CG, while in the TG, the SRP was associated to aPDT, using a phenothiazine photosensitizer and a laser source with wavelength of 660nm. At 45 days post-initial therapy, flap surgery plus SRP and flap surgery plus SRP + aPDT were performed in the CG and TG, respectively. At 21 days post-surgery, the newly formed granulation tissue was collected, and the teeth were extracted.

Oral Hygiene Program

Fourteen days before treatment, all patients were instructed about the cause and consequences of periodontal disease, and received oral hygiene instructions, according to individual needs. Supragingival plaque retention factors were removed, cavities were filled, and supragingival professional tooth cleaning was performed 7 days before clinical examination.

Initial Therapy

After clinical examination, radiographs, diagnosis, and treatment planning, the sites, which were not included in the study, received subgingival scaling and root planning, and extractions were performed, if indicated. Furthermore, occlusal adjustment was performed, when it was necessary.

Following, the teeth included in the study were treated. The mechanical subgingival instrumentation was performed in both groups, under local anesthesia, using ultra-sonic device with a scaler tip¹ and hand instruments² (Gracey curettes N° 7/8, 11/12 and 13/14, and

¹ Swivel Ultrasonic Inserts - AF Swivel Direct Flow Straight 25K - Hu-Friedy Co., Chicago, ILL, U.S.A

² Hu-Friedy Co., Chicago, ILL, U.S.A

mini five Gracey curettes N°. 7/8, 11/12 and 13/14), with subsequent copious rinsing with sterile saline. Following that, in the test group, a diode laser³ with a wavelength of 660nm and power density of 60mW/cm² was employed together with a phenothiazine chloride photosensitizer⁴ (which main component is toluidine-blue) in a concentration of 10mg/ml.^{6,7} The photosensitizer was applied placing the applicator (blunt canula) at the bottom of the periodontal pockets (in 6 sites per tooth: furcation area and proximal sites) and was continuously deposited in a coronal direction in order to achieve a complete filling of the pockets and coating of the root surfaces. After 1 minute, the pockets were irrigated with sterile saline to remove excess photosensitizer.^{6,7} In sequence, the pockets were exposed to the laser light, using the fiber optic applicator⁵ of 0.6mm diameter, during 10 seconds per site.^{6,7} The treatment was done in 6 sites per tooth, totaling 1 minute of treatment per tooth^{6,7} (in a total of 20 seconds of laser light application in the furcation area).

Surgical Procedures

At 45 days post-initial therapy, the class III furcation lesions were accessed surgically. Thus, flap surgery plus SRP and flap surgery plus SRP + aPDT were performed in the CG and TG, respectively. Both groups were treated in the same surgical session by the same operator. Following local anesthesia, intrasulcular incisions were made, and buccal and lingual mucoperiosteal flaps were raised. The granulation tissue was removed from the defect, and then, treatment was performed according to the group assignment, as such as in the initial therapy. In both groups, the flaps were positioned coronally to cover the furcation entrance and sutured. Analgesic medication for 2 days, and chlorhexidine rinses (0.12%), used twice

³ Helbo Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria

⁴ Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria

⁵ Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria

daily, were prescribed throughout the experimental period (21 days). At 21 days post-surgery, the newly formed granulation tissues in the class III furcation defects were collected carefully by a blinded investigator in order to avoid the inclusion of any gingival-related soft tissue and stored in a tube, containing Trizol (750µl) (Fig. 1), at -80°C for assessing gene expression by the quantitative polymerase chain reaction (PCRq) technique, and the teeth were extracted. Patients were instructed for the standard concerns in the postoperative period, such as no physical exercise, feeding advice, and plaque-control techniques, and sutures were removed after 7 to 10 days.

Gene Expression Analysis

Total RNA was extracted using the Trizol reagent, initially, and after 200µl of chloroform ⁶were added and centrifuged at 12.000g for 15 min at 4°C, and the aqueous phase was transferred to a new tube, in which 200µl of 95% ethanol had been added. Following, all process was continued, following the protocol recommended by the manufacturer⁷. Finally, the RNA samples were suspended in nuclease-free water and stored at -20°C, while an aliquot of 2µl was used to obtain the concentration of RNA/µl in the samples, which was determined by a spectrophotometer. For cDNA synthesis, 1µg of RNA, oligo(dT)⁸, nuclease-free water, and a kit, containing reverse transcriptase ⁹were used.

The quantitative polymerase chain reaction (Real-Time PCR) used the SYBR-green fluorescence quantification system ¹⁰to evaluate the expression of the following genes: TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10, MMP-2, TIMP-2, OPG, RANKL, Col I, ALP, OPN, OCN, and BSP.

⁶ Sigma Co., St. Louis, MO

⁷ SV Total RNA Isolation System - Promega

⁸ Oligo(dT) 15 Primer - Promega

⁹ ImProm-IITM Reverse Transcriptase - Promega

¹⁰ Applied Biosystems, Warrington, UK

The primers were designed using the Primer Express software¹¹ (Table 1). For each run, water was used as a negative control, and beta-actin as the reference gene. The standard PCR conditions were 95°C (10 minutes), and then 40 cycles of 94°C (1 minute), 56°C (1 minute), and 72°C (2 minutes), followed by the standard denaturation curve. PCR conditions for each target were conscientiously optimized with regard to primer concentration, absence of primer-dimer formation, and efficiency of amplification of target genes and housekeeping gene control. SYBR Green PCR Master Mix¹², 400nM specific primers, and 2.5ng of cDNA were used in each reaction. Negative controls without cDNA and without the primer sets were also performed. Calculations for determining the relative levels of gene expression were made from duplicate measurements of the target gene, with normalization to β -actin in the sample, using the cycle threshold (Ct) method and the $2\Delta\Delta Ct$ equation, as previously described.³

Statistical Analyses

Quantitative data were recorded as mean and standard deviations. In order to verify the normality of the data, the method of Kolmogorov and Smirnov was used. For the intergroup comparisons (control group X test group), the paired t test was employed since the data were considered normal for the parameter analysed or a non-parametric test (Wilcoxon) was applied, when the data of one of the groups failed the normality test. The level of significance of 0.05 was employed in all statistical comparisons.

¹¹ Applied Biosystems, Warrington, UK

¹² Applied Biosystems, Warrington, UK

RESULTS

Initially, fifteen patients were selected for the study, however, one patient used anti-inflammatory and antibiotic after the surgeries and was excluded of the statistical analysis (n=14). At the end of the experimental period, i.e., 21 days after the surgical procedures, the soft tissues were completely healed and didn't have clinical signs of inflammation.

The data analysis demonstrated that the genes for MMP-2 and OPG were differentially expressed with the aPDT treatment, and that the statistically significant differences found between the TG and CG with regard to mRNA levels for these factors favoured the TG. The mRNA levels for MMP-2 were lower in the test group (TG = 3.26 ± 0.89 ; CG = 4.23 ± 0.97 ; $p=0.01$), while the mRNA levels for OPG were higher (TG = 0.84 ± 0.45 ; CG = 0.30 ± 0.26 ; $p=0.001$). No statistically significant differences were found between the TG and CG for TIMP-2 mRNA levels (TG = 2.75 ± 0.52 ; CG = 2.88 ± 0.59 ; $p=0.59$), and RANKL mRNA levels (TG = 2.21 ± 0.95 ; CG = 1.67 ± 1.10 ; $p=0.14$). However, the mRNA levels for TIMP-2/MMP-2 ratio (TG = 0.91 ± 0.34 ; CG = 0.73 ± 0.32 ; $p=0.04$) and OPG/RANKL ratio (TG = 0.60 ± 0.86 ; CG = 0.23 ± 0.16 ; $p=0.04$) were higher in the TG ($p<0.05$) (Fig. 2 and 3).

There were no statistically significant differences between the TG and CG for the genes related to the inflammatory process, such as TNF- α (TG = 3.63 ± 1.23 ; CG = 4.29 ± 1.33 ; $p=0.18$), IL-1 β (TG = 3.54 ± 0.79 ; CG = 3.55 ± 0.98 ; $p=0.98$), IL-4 (TG = 1.85 ± 0.76 ; CG = 2.16 ± 0.94 ; $p=0.34$), and IL-10 (TG = 1.42 ± 0.55 ; CG = 1.21 ± 0.25 ; $p=0.21$) (Fig. 4). Furthermore, no statistically significant differences were found between the TG and CG for IL-4/TNF- α (TG = 0.57 ± 0.30 ; CG = 0.58 ± 0.38 ; $p=0.87$), IL-4/IL-1 β (TG = 0.55 ± 0.31 ; CG = 0.67 ± 0.34 ; $p=0.36$), IL-10/TNF- α (TG = 0.47 ± 0.33 ; CG = 0.32 ± 0.14 ; $p=0.12$) and IL-10/ IL-1 β (TG = 0.42 ± 0.19 ; CG = 0.37 ± 0.15 ; $p=0.43$) expression after the flap surgeries.

Finally, the comparison between the TG and CG for the mRNA levels for COL I, which is related to matrix formation, and for bone/cementum-associated factors, including ALP, OPN, OCN, BSP demonstrated no statistically significant differences COL I (TG = 2.18 ± 1.56 ; CG = 1.55 ± 0.54 ; $p=0.27$), ALP (TG = 1.93 ± 1.42 ; CG = 1.13 ± 1.18 ; $p=0.11$), OPN (TG = 1.04 ± 0.89 ; CG = 1.30 ± 0.86 ; $p=0.36$), OCN (TG = 2.96 ± 1.02 ; CG = 3.08 ± 0.96 ; $p=0.66$), and BSP (TG = 3.98 ± 1.04 ; CG = 3.81 ± 1.17 ; $p=0.68$) (Fig. 5).

DISCUSSION

Studies have demonstrated the bactericidal effect of aPDT against periodontopathogenic pathogens and also the reduction of some virulence factors, such as lipopolysaccharide and proteases, by photosensitization.¹⁴⁻²⁰ Furthermore, a recent study demonstrated that the aPDT treatment may benefit periodontal therapy by inactivating host cytokines that impair periodontal repair.²⁰ Due to bacterial action over the inflammatory-immunological processes and direct regulation of gene expression of proteins involved in the formation and destruction of periodontal tissues, the purpose of this study was to evaluate the adjunct effect of the aPDT to SRP during the surgical periodontal therapy on the modulation of expression of different genes involved in the periodontal healing process.

The class III furcation lesions were selected for this study to represent periodontal sites with difficult access for an effective decontamination by classic mechanical methods, such as SRP. Since the teeth with class III furcation lesions were scheduled for extraction, the newly formed tissues under the flap could be collected 21 days after the surgeries and assessed for the expression of a number of genes.^{27,28}

Several protocols of aPDT have been reported in the literature (different types of photosensitizers, its concentration and duration of application, types of light sources with different wavelengths, power density, energy and also duration of light application), which make direct comparisons between the studies very difficult and prevent definitive conclusions about the potential and actual clinical benefits of aPDT.^{6,7,18,22-25} Oliveira, et al. compared an aPDT protocol similar to the present study to SRP procedures in a controlled clinical study in patients with aggressive periodontitis and reported similar clinical results and effects on

crevicular TNF- α and RANKL levels between the two treatments, thus indicating a beneficial effect of this particular aPDT protocol.^{6,7}

The results of the present study showed an additional effect of the aPDT protocol to SRP only for the gene expression of MMP-2, TIMP-2/MMP-2 ratio, OPG, and OPG/RANKL ratio.

MMP-2, one of the major enzymes involved in the degradation process of gingival tissues, plays a significant role in the pathogenesis of periodontitis, and is activated by periodontopathogenic bacteria.^{29,30} It is able to degrade type IV collagen, the major protein found in the basement membrane, and denature type I collagen, the major protein in periodontal tissues.³¹⁻³³ The MMPs are regulated by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and a balance between MMPs and TIMPs is associated to a physiological turnover of the periodontal connective tissue (extracellular matrix remodeling).^{1,34} However, in many disease processes, the levels of MMPs are elevated without a proportional increase in TIMPs, resulting in connective tissue destruction.^{1,35} Studies have reported higher expression of MMP-2 in the gingival tissues in periodontitis, when compared to healthy sites.^{3,36} Furthermore, higher mRNA expression of MMP-2 has been associated to a phase of periodontal disease characterized by an intense inflammatory reaction and alveolar bone loss, while a lower expression of MMP-2 and higher expression of TIMP-2 (i.e. higher TIMPs/MMPs ratio) have been correlated with reduced rates of cellular infiltration in periodontal tissues and alveolar bone loss.¹ Hence, in agreement with this, the imbalance between MMPs and TIMPs expression could account for the different degrees of disease progression.^{1,3} In the present study, the mRNA levels for MMP-2 were lower in the test group, when compared to the control group (TG = 3.26 ± 0.89 ; CG = 4.23 ± 0.97 ; $p=0.01$), and more importantly, the TIMP-2/MMP-2 ratio was significantly increased in the test group (TG = 0.91 ± 0.34 ; CG = 0.73 ± 0.32 ; $p=0.04$), suggesting that the association of the aPDT to

SRP may modulate the gene expression of MMP-2 and the TIMP-2/MMP-2 ratio, contributing to a better extracellular matrix remodeling and lower periodontal disease progression.

RANKL, its cellular receptor (RANK), and the decoy receptor, the OPG have been identified as the key molecular regulation system for bone remodeling.^{1,37} RANKL is the main stimulatory factor for the differentiation and activation of osteoclasts and these effects are counteracted by OPG, which is produced by osteoblasts and able to inhibit bone resorption by preventing RANKL-RANK engagement.^{1,37} Under normal physiologic conditions, there is a balance between bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts and the OPG/RANKL ratio determines if bone resorption or bone formation will occur.³⁷ An increase in the OPG/RANKL ratio is associated to bone formation, while a decrease is associated to bone resorption.³⁷ In the present study, the mRNA levels for OPG and RANKL were assessed, however, only there was a statistically significant difference only between the groups in relation to OPG, favoring the test group, which exhibited higher mRNA levels. More importantly, the OPG/RANKL ratio was also significantly increased in the test group, indicating a tendency for greater bone formation in the sites, where the aPDT was associated to scaling and root planning. Recently published *in vivo* studies reported that the aPDT may be an effective alternative for control of bone loss in furcation areas of rats submitted to experimentally induced periodontitis, although the local etiologic agents have been maintained by the presence of a ligature throughout the experimental period.³⁸

Based on the statements above, the aPDT protocol used in this study may have exerted an additional effect on periodontopathogenic bacterial plaque and the reduction of its virulence factors. However, it is important to consider that the results of the present study may also be attributed only to the additional application of the low-level laser, which was used in the aPDT. Literature has reported that the low-level laser therapy could reduce

periodontal inflammation and promote wound repair through of several factors, such as cellular metabolic processes acceleration, fibroblast proliferation, augmentation of collagen synthesis, and biostimulating effect on the growth and differentiation of osteoblastic cells with increase in bone matrix production.³⁹⁻⁴¹ Although, the exact biological mechanisms of biostimulatory effect of low-level laser therapy are not yet fully understood, the low-level laser therapy may play an important role in the extracellular matrix remodeling through MMP-2 gene expression down-regulation, and TIMP-2 gene expression up-regulation (higher TIMP-2/MMP-2 ratio),⁴² as may also modulate the key molecular regulation system for bone remodeling by upregulating the OPG/RANKL mRNA ratio.⁴³

In the present study, genes related to the inflammatory process, such as TNF- α , IL-1 β , IL-4 and IL-10, were also assessed. Both TNF- α and IL-1 β , which are involved in Th1 immune responses and induce mainly cell-mediated immunity, have been described as positive regulators of osteoclastogenesis and MMPs expression, while a reverse effect is exerted by anti-inflammatory cytokines, such as IL-4 and IL-10.¹ These cytokines are involved in Th2 immune responses, promote humoral immunity due to the production of B cell growth and differentiation factors, and suppress the synthesis of proinflammatory cytokines, including IL-1 β and TNF- α , by Th1 cells.⁴⁴ Thus, in periodontal lesions, the balance between the expression of Th1 and Th2-type mediators is thought to be a relevant factor in the disease severity and treatment outcome, possibly regulating the balance of TIMPs/MMPs and OPG/RANKL.^{1,3} However, although, the results of the present study have shown an additional effect of the aPDT protocol to SRP for the gene expression of TIMP-2/MMP-2, and OPG/RANKL, there were no statistically significant differences between the TG and CG for the IL-4/TNF- α , IL-4/IL-1 β , IL-10/TNF- α and IL-10/ IL-1 β mRNA levels. These results may be explained by the fact that the data presented were obtained once, 21 days after surgeries. Perhaps, if the newly formed tissue under the flap had been collected

before 21 days, statistically significant differences between the groups in relation to the balance between the expression of Th1 and Th2-type mediators may have been found.

Finally, the mRNA levels for type I collagen, which is related to matrix formation, and bone/cementum-associated factors, including alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, were also investigated. Type I collagen is the major protein found in periodontal tissues; the alkaline phosphatase is an excellent indicator of bone-formation activity, being a phenotypic marker of osteoblasts;⁴⁶ osteopontin is considered a differentiation marker for the osteoblastic and cementoblastic cell phenotype;⁴⁷ osteocalcin and bone sialoprotein are mineralized tissue-specific proteins that appear to function in the initial mineralization of bone.^{48,49} Although, the results of the present study have suggested a potential for better extracellular matrix remodeling and greater bone formation for the TG, the levels of mRNA for type I collagen, alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin and bone sialoprotein were expressed at similar levels in both groups. These results may also be explained by the fact that data of the present study represented one period of healing (21 days after surgeries). Possibly, in a longer healing periods (greater than 21 days), differences between the groups in relation to levels of mRNA for type I collagen and alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin and bone sialoprotein may have been found. Therefore, future studies should investigate further the role of aPDT in periodontal repair after flap surgery, regarding the mechanisms involved in a time-sequence manner.

It is also important to consider that in the present study, the aPDT was applied in a single session (for one time); perhaps, repeated aPDT applications could increase its performance and should also be studied in the future. This factor may explain the limited effects of the adjunctive use of this aPDT protocol to SRP on the modulation of expression of different genes involved in the healing process of periodontal tissues evaluated in the present study. Although, a recently published meta-analysis has concluded that the combined

approach (SRP with aPDT) provides potential clinical improvements,²¹ further studies are necessary to determine which is the best aPDT protocol to enhance antimicrobial action (if multiple aPDT applications may improve the therapy outcomes) and the biostimulatory effect of low-level laser in the periodontal disease treatment.

REFERENCES

- 1-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 Microbiol Immunol* 2006;21:12-20.
- 2-Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005;76:2033-2041. Review.
- 3-Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31:671-679.
- 4-Nociti FH Jr, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide partially via tolllike receptor-4/MD-2. *J Dent Res* 2004;83:602-607.
- 5-Hill SJ, Ebersole JL. The effect of lipopolysaccharide on growth factor-induced mitogenesis in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1996;67:1274-1280.
- 6-de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965-973.
- 7-de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* 2009;80:98-105.

-
- 8-Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontol* 2006;33:241-253.
- 9-Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303. Review.
- 10-Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* 2004;36:98-120.
- 11-Guentsch A, Jentsch H, Pfister W, Hoffmann T, Eick S. Moxifloxacin as an adjunctive antibiotic in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:1894-1903.
- 12-Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007;86:694-707. Review.
- 13-Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005;79:159-170.
- 14-Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 1993;28:204-210.
- 15-Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343-1349.
- 16-Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76:1100-1105.
- 17-Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-55.

- 18-Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:104-108.
- 19-Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72:676-680.
- 20-Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol* 2009;80:1790-1798.
- 21-Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2010;25:605-613.
- 22-Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008;79:1638-1644.
- 23-Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009;24:681-688.
- 24-Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008;35:877-884.
- 25-Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007;18:34-38.

- 26-de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008;79:2156-2165.
- 27-Gonçalves PF, Lima LL, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Root cementum may modulate gene expression during periodontal regeneration: a preliminary study in humans. *J Periodontol* 2008;79:323-331.
- 28-Lima LL, Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *J Periodontal Res* 2008;43:459-464.
- 29-Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:602-608.
- 30-Grayson R, Douglas CWI, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase-2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 2003;30:542-550.
- 31-Kerkvliet EHM, Docherty AJP, Beertsen W, Everts V. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. *Matrix Biol* 1999;18:373-380.
- 32-Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1995;270:5872-5876.
- 33-Konttinen YT, Ceponis A, Takagi M, et al. New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: Destruction from above. *Matrix Biol* 1998;17:585-601.

- 34-Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;19:3719-3727.
- 35-Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 1996;2:70-76.
- 36-César Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H Jr, Sallum EA, Nociti FH Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol* 2004;75:995-1000.
- 37-Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79:1569-1576. Review.
- 38-de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008;79:1081-1088.
- 39-Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2005;76:187-193.
- 40-Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg* 2004;22:241-247.
- 41-Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:540-545.
- 42-Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med* 2006;38:779-786.

- 43-Xu M, Deng T, Mo F, et al. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg* 2009;27:309-315.
- 44-Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-146.
- 45-Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2003;38:210-217.
- 46-Schmidt-Gayk H, Roth HJ, Becker S, Reichel H, Boneth HG, Knuth UA. Noninvasive parameters of bone metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4:334-338.
- 47-Strayhorn CL, Garrett JS, Dunn RL, Benedict JJ, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes. *J Periodontol* 1999;70:1345-1354.
- 48-Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996;317:59-64.
- 49-Nakayama Y, Mezawa M, Araki S, et al. Nicotine suppresses bone sialoprotein gene expression. *J Periodontal Res* 2009;44:657-663.

TABLE**Table 1.**

Primer Sequences, Annealing Temperature, and GenBank Number for Each Gene.

Gene	Primer Sequence (5' - 3')	Annealing Temp. (°C)	GenBank Number
TNF- α	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATACC	56	197692684
IL-1 β	CTTCTTCGACACATGGGATAAC TTTGGGATCTACACTCTCCAGC	59	27894305
IL-4	GTTGACCGTAACAGACATCTTTG CGAGCCGTTTCAGGAATC	58	58736974
IL-10	AGATCTCCGAGATGCCTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	24430216
MMP-2	CGACCGCGACAAGAAGTA GCACACCACATCTTCCGTCA	60	33876889
TIMP-2	CAAGTTCTTCGCCTGCATCAA TCGAAACCTTGGAGGCTT	61	73858577
OPG	CAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGA GAAGGTGAGGTTAGCATGTCC	57	3107916
RANKL	CGACATCCCATCTGGTTCC GCTGGTTTTAGTGACGTACACC	65	6863047
COL I	CCCTGGTGCTACTGGTT ACCACGCTGTCCAGCAATA	61	62088773
ALP	CGGGCACCATGAAGGAAA GGCCAGACCAAAGATAGAGTT	61	116734716
OPN	AAAGCCAATGATGAGAGCAA ATTCAGGTGTTTATCTTCTCCTTAC	58	91598938
OCN	AGCTCAATCCGGACTGT GGAAGAGGAAAGAAGGGTGC	62	109731032
BSP	AGTGTCAGTGGAGCCAATGCA TGTTGTCTTCGAGGTGCCCTT	58	13251325
β -actin	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	61	168480144

FIGURES (LEGENDS)

Figure 1. **A)** The newly formed tissue was harvested in the CG. **B)** The newly formed tissue was harvested in the TG. **C)** Tissues were stored in a tube, containing Trizol.

Figure 2. Bar charts showing the mean values and standard deviation for the mRNA levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and the TIMP-2/MMP-2 ratio for the test and control groups, relative to the levels of β -actin.

*Indicates that there is a statistically significant difference between groups ($p < 0.05$).

Figure 3. Bar charts showing the mean values and standard deviation for the mRNA levels of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and the OPG/RANKL ratio for the test and control groups, relative to the levels of β -actin. *Indicates that there is a statistically significant difference between groups ($p < 0.05$).

Figure 4. Bar charts showing the mean values and standard deviation for the mRNA levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) for the test and control groups, relative to the levels of β -actin.

Figure 5. Bar charts showing the mean values and standard deviation for the mRNA levels of type I collagen (Col I), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN) and bone sialoprotein (BSP) for the test and control groups, relative to the levels of β -actin.