**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ADJUNTO DA
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
AOS PROCEDIMENTOS DE RASPAGEM E
ALISAMENTO RADICULAR EM PACIENTES
FUMANTES. ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO**

ADRIANA CORRÊA DE QUEIROZ

RIBEIRÃO PRETO

2012

ADRIANA CORRÊA DE QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ADJUNTO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA AOS PROCEDIMENTOS DE RASPAGEM E ALISAMENTO
RADICULAR EM PACIENTES FUMANTES. ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO**

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

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central
do Campus USP - Ribeirão Preto

Queiroz, Adriana Corrêa de

Avaliação do efeito adjunto da terapia fotodinâmica antimicrobiana
aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular em
pacientes fumantes. Estudo clínico controlado e randomizado.
Ribeirão Preto, 2012.

107 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Souza, Sérgio Luís Scombatti.

Coorientador: Paulo Tambasco de Oliveira

1. Terapia fotodinâmica. 2. Fumo. 3. Periodontite crônica

Trabalho realizado na Clínica de Pós-graduação e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de CTBMF e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2009/15845-0.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Corrêa de Queiroz

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

Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais **Paulo e Célia**. Por personificarem o amor na minha vida. Por terem fornecido os meios para que eu chegasse até aqui e por serem a razão pela qual eu continuo meu caminho.

Às minhas irmãs **Ana Paula e Tatiana**. Por quem eu tenho o amor mais puro, genuíno e verdadeiro. E com quem eu quero dividir tudo até o fim.

Ao **Gustavo**. Por ter me deixado escolhê-lo, dentre todas as pessoas, para ser meu companheiro, minha melhor companhia, meu maior conselheiro, minha família, meu apoio mais presente, meu grande amor.

Agradecimientos

A **Deus**, força maior que me guiou e abençoou minhas escolhas.

À **minha família**, marido, pais, irmãs, primo-irmão Mauro, cunhados, sogros, primos e tios, pela torcida e apoio.

Em especial, ao meu orientador, **Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional e pelos conhecimentos adquiridos durante o desenvolvimento deste e de outros projetos. E, principalmente, por ter permitido que eu iniciasse minha carreira acadêmica antes do previsto e pela paciência em me orientar à distância em muitos momentos.

Ao coordenador do curso de Pós-graduação em Periodontia, **Arthur Belém Novaes Júnior**, pelo exemplo de pesquisador que representa pra mim, pelas oportunidades em diversos projetos e por ter permitido que eu pudesse conciliar minhas funções na UFAM com o término do curso.

Aos professores do curso de Periodontia **Márcio Grisi, Mário Taba Júnior e Daniela Bazan Palioto**, por tudo que aprendi durante os seis anos de convívio.

À minha amiga e dupla, **Flávia Adelino Suaid**, que participou todas as fases deste projeto, realizando etapas indispensáveis para que todos os dados necessários pudessem ser obtidos após o momento em que tive que retornar para Manaus. Sua competência e dedicação permitiram que eu concluísse essa fase da minha vida e serei sempre grata por isso.

À amiga **Patrícia Freitas de Andrade**, pela concepção inicial do projeto.

Aos **pacientes** participantes, que permitiram que seu tratamento fosse aplicado para o desenvolvimento científico.

À **Fabíola Singaretti Oliveira**, pela paciência e apoio na realização dos testes ELISA. E à **Izilvânia** e demais profissionais da UNG pela recepção e realização dos exames microbiológicos.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** da Universidade de São Paulo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro para a realização do estudo.

À **Faculdade de Odontologia** da Universidade Federal do Amazonas.

À diretora da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, **Maria Augusta Bessa Rebelo**, pela amizade e carinho desde os tempos de graduação e apoio incondicional para que eu cumprisse minhas obrigações no doutorado.

À ex-Coordenadora Acadêmica e atual diretora da FAO-UFAM, **Nikeila Chacon de Oliveira Conde**, que tornou possíveis minhas constantes idas a Ribeirão Preto, sempre me dando todo carinho e apoio de que precisei.

À professora de Periodontia da UFAM, **Miriam Raquel Ardigó Westphal**, que me apoiou durante minhas ausências para a conclusão do projeto. E às professoras **Suellen Lima** e **Cristiane Bochi**, pela contribuição nesse período.

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

Às amigas **Priscila Paganini**, **Flávia** e **Luciana**, minha turma querida de doutorado, companhias em todos os momentos, amigos que ficarão distantes, mas serão reais. E às amigas de mestrado, a quem não poderia deixar de agradecer por serem tão presentes na minha vida de pós-graduação e de quem sinto muitas saudades, **Priscila Nóbrega**, **Germana** e **Anne**.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, **Guilherme**, **Raquel**, **Patrícia Freitas**, **Luciana Maia** e **Patrícia Garani**, tão presentes em momentos de amizade e de desenvolvimento de pesquisas. E a todos os demais colegas de tantas turmas de mestrado e doutorado.

Aos meus queridos **alunos**. Ter iniciado minha carreira docente ainda durante o curso trouxe um novo sentido, muito mais completo e claro, para minha vida acadêmica. Minha dedicação e empenho não têm mais uma conotação individual. Crescemos juntos! Obrigada por tornarem meu exercício diário tão especial!

A todos os funcionários da FORP por todo carinho e disponibilidade, especialmente **Tatiana**, **Dulce**, **Adriana**, **Suely**, **Zilda**, **Isabel** e **Regiane**.

A **todos** que contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

QUEIROZ, AC. Avaliação do efeito adjunto da terapia fotodinâmica antimicrobiana aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular em pacientes fumantes. Estudo clínico controlado e randomizado. 2012. 107 p. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A periodontite é causada por bactérias patogênicas, podendo ser tratada com sucesso por meio de procedimentos que incluem instruções de higiene oral, eliminação de fatores retentivos de biofilme, raspagem e alisamento radicular (RAR), combinados ou não com cirurgias periodontais. A literatura tem relatado que os pacientes fumantes apresentam uma resposta inferior ao tratamento periodontal convencional, cirúrgico ou não, quando comparados aos pacientes não-fumantes. Assim, justifica-se a avaliação de terapias complementares aos procedimentos convencionais de raspagem e alisamento radicular (RAR) nesses pacientes. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) contra as bactérias periodontopatogênicas. Desta forma, o presente estudo visou analisar a ação complementar da TFDa à RAR em pacientes fumantes portadores de periodontite crônica. Foram selecionados 20 pacientes fumantes com periodontite crônica, apresentando um par de dentes contralaterais com sangramento à sondagem e profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm. Cada par de dentes foi aleatoriamente dividido em grupo controle (GC), no qual foi realizada a RAR e em grupo teste (GT), no qual além da RAR foi realizada a TFDa, em aplicação única. Parâmetros clínicos de índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção relativo (NCI), recessão gengival (RG) foram registrados no exame inicial, 4 e 12 semanas após o tratamento periodontal. Além disso, no exame inicial e 1, 4 e 12 semanas após o tratamento periodontal foram coletadas amostras de biofilme subgengival para a identificação e quantificação das espécies bacterianas através da técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e também de fluido crevicular gengival (FCG) para a quantificação da Interleucina-1 beta (IL-1 β) e Metaloproteinase 8 (MMP-8) por meio do teste ELISA. Houve uma redução estatisticamente significativa na PS (GT: 1,81 $\pm$ 0,52 mm / GC: 1,58 $\pm$ 1,28 mm; p<0,001) e um ganho estatisticamente significativo no NCI (GT: 1,60 $\pm$ 0,92 mm/GC: 1,41 $\pm$ 1,58 mm; p<0,001) para ambos os grupos. Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas nas comparações entre os grupos. A concentração de IL-1 β no FCG foi maior no GC no exame realizado 1 semana após o tratamento periodontal (GT: 24,65 $\pm$ 18,85 pg/ μ L / GC: 34,07 $\pm$ 24,81 pg/ μ L; p=0,048) e a concentração de MMP-8 foi maior também no GC 12 semanas após o tratamento periodontal (GT: 303,31 $\pm$ 331,62 pg/ μ L / GC: 534,23 $\pm$ 647,37 pg/ μ L; p=0,024). Não houve diferenças estatisticamente significativas na análise intragrupos. As 40 espécies bacterianas avaliadas foram detectadas em diferentes níveis no exame inicial, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Após o tratamento periodontal, o nível de algumas bactérias diminuiu enquanto outras espécies apresentaram um aumento. Apesar dessa variação, a análise estatística não foi capaz de identificar diferenças estatisticamente significativas nas comparações intra e intergrupos. Assim, este estudo não foi capaz de demonstrar que o efeito adjunto da TFDa (em aplicação única) associada à RAR melhora os parâmetros clínicos em pacientes fumantes. Contudo, a TFDa foi capaz de reduzir significativamente a concentração de IL-1 β (no exame de uma semana) e MMP-8 (no exame de 12 semanas), sugerindo uma possível vantagem na cicatrização periodontal. Isso não foi confirmado, no entanto, pela análise microbiológica, que mostrou que nenhum dos tratamentos reduziu significativamente os níveis bacterianos.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Periodontite crônica; Fumo

Abstract

QUEIROZ, AC. **The adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial.** 2012. 107 p. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012

Periodontitis is caused by pathogenic bacteria and it can be successfully treated by procedures that include oral hygiene instructions, elimination of plaque retentive factors and scaling and root planing (SRP) alone or in combination with periodontal surgery. The literature has reported that smokers present a poorer response to conventional periodontal treatment when compared with nonsmoking patients. Thus, it is appropriate to evaluate adjunctive therapies to conventional treatment of scaling and root planing (SRP) in these patients. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the potential of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) against periodontopathic bacteria. Thus, this study aimed to analyze the adjunctive action of aPDT to SRP in smokers with chronic periodontitis. We selected 20 smokers with chronic periodontitis, presenting a pair of contralateral teeth with bleeding on probing and probing depth greater than or equal to 5 mm. Each pair of teeth was randomly allocated on control group (CG), in which SRP was performed, and on test group (TG), in which PDT was performed in addition to SRP. Clinical parameters of plaque index (PI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD), relative clinical attachment level (CAL), gingival recession (GR) were recorded at the baseline and 4 and 12 weeks after periodontal treatment. Moreover, at baseline and 1, 4 and 12 weeks after periodontal treatment, subgingival plaque samples were collected for identification and quantification of periodontopathic bacteria using Checkerboard DNA-DNA hybridization technique, as well as gingival crevicular fluid (GCF) samples for quantification of Interleukin-1 beta (IL-1 β) and metalloproteinase 8 (MMP-8) using ELISA. There was a statistically significant reduction in PD (GT-1.81 $\pm$ 0.52 mm / GC-1.58 $\pm$ 1.28 mm, $p < 0.001$) and a statistically significant gain in CAL (GT-1.60 $\pm$ 0.92 mm / GC-1.41 $\pm$ 1.58 mm, $p < 0.001$) for both groups. Statistically significant differences were not observed in comparisons between groups. The concentration of IL-1 β in GCF was higher in GC in the examinations performed 1 week after periodontal treatment (GT-24, 65 $\pm$ 18.85 pg / μ L / GC-34, 07 $\pm$ 24.81 pg / μ L, $p = 0.048$) and MMP-8 was also higher in GC 12 weeks after periodontal treatment (GT-303, 31 $\pm$ 331.62 pg / μ L / CG-534, 23 $\pm$ 647.37 pg / μ L, $p = 0.024$). There was no statistically significant differences in the intra-groups analyses. The 40 bacterial species tested were detected at different levels at baseline, with no statistically significant differences between groups. After periodontal treatment, the level of some bacterial species had decreased while others presented an increasing. Despite this variation, statistical analysis was not able to identify statistically significant differences in comparisons within and between groups. Thus, the present study failed to demonstrate that the adjunctive effect of a single episode of aPDT to SRP improves clinical parameters in smokers. However, it resulted in a significantly suppression of IL-1 β and of MMP-8, suggesting an advantage on periodontal healing. This has not been confirmed, on the other hand, by the microbiological analysis, which showed that none of the treatments was able to significantly reduce the bacteria levels.

Sumário

SUMÁRIO

1	Introdução	17
2	Proposição	23
3	Material e Métodos	24
3.1	Seleção de pacientes.....	25
3.2	Exame clínico periodontal.....	26
3.3	Desenho do estudo.....	27
3.4	Terapia periodontal.....	28
3.5	Coleta de fluido gengival.....	30
3.6	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	31
3.7	Coleta de biofilme	32
3.8	Técnica de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	33
3.8.1	Cepas bacterianas e condições de crescimento	33
3.8.2	Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	35
3.8.3	Checkerboard DNA-DNA Hybridization.....	35
3.9	Análise estatística.....	39
4	Resultados	41
5	Discussão.....	47
6	Conclusão	58
	Referências Bibliográficas	60
	Artigo I em Inglês	66
	Artigo II em Inglês	88
	Anexos	106

1 Introdução

1 Introdução

A periodontite crônica é uma doença infecciosa que leva à inflamação nos tecidos de suporte dos dentes e à perda de inserção e reabsorção óssea progressivas. O processo é iniciado e mantido pelas bactérias presentes no biofilme dental, mas os mecanismos de defesa do hospedeiro desempenham um papel importante na sua patogênese (Flemmig, 1999). O tratamento padrão da periodontite ainda é inespecífico e consiste no debridamento mecânico das superfícies radiculares afetadas, com o objetivo de reduzir a carga bacteriana total e alterar as condições ambientais dos nichos microbianos (Angaji *et al.*, 2010). Apesar dos resultados satisfatórios, a técnica de raspagem e alisamento radicular (RAR) tem algumas limitações e alguns pacientes não respondem adequadamente à terapia. O resultado depende de diversas variáveis, como a cooperação e higiene oral do paciente; alguns fatores locais, como a presença de bolsa profundas, o envolvimento de furca e a anatomia da raiz; e a história médica do paciente, especialmente a presença de situações como diabetes ou tabagismo (Darby *et al.*, 2005; Drisko *et al.*, 2001).

O tabagismo é atualmente reconhecido como um importante fator de risco para o desenvolvimento da periodontite (Van der Velden *et al.*, 2003). O hábito de fumar causa efeitos sistêmicos generalizados, sendo que muitos deles podem levar a mecanismos que favorecem o aumento da susceptibilidade à periodontite e uma resposta mais pobre ao tratamento (Palmer *et al.*, 2005). Alguns dos mecanismos propostos para justificar esses efeitos negativos do fumo são: diminuição do fluxo sanguíneo, alteração na função dos neutrófilos, diminuição da produção de IgG e da proliferação de linfócitos, aumento da prevalência de periodontopatógenos, alteração

na função e inserção de fibroblastos, dificuldade de eliminação dos patógenos através de terapia mecânica, bem como efeitos locais negativos relacionados à produção de citocinas e fatores de crescimento (Johnson e Hill, 2004).

Muitos estudos sobre o efeito do tabagismo na saúde periodontal têm sido relatados, demonstrando que pacientes fumantes apresentam resultados inferiores após tratamento periodontal convencional quando comparados aos pacientes não-fumantes, tanto para o tratamento periodontal não-cirúrgico quanto cirúrgico, em função de alterações na microbiota e na resposta de defesa do hospedeiro (Johnson e Hill, 2004; Kinane e Chestnutt, 2000). Alguns estudos sugerem que os fumantes apresentam uma tendência para abrigar um número maior de patógenos periodontais do que os não-fumantes, sem aumentar a quantidade de biofilme bacteriano. Isso suportaria a hipótese de que um ambiente subgingival alterado em fumantes, associado a uma resposta imune alterada, pode resultar em uma microbiota diferente nesses pacientes (Palmer *et al.*, 2005). A prevalência (% de sítios colonizados) de várias espécies bacterianas pertencentes aos complexos bacterianos laranja e vermelho é significativamente maior em fumantes quando comparados com ex-fumantes ou com aqueles que nunca fumaram (Haffajee e Socransky, 2001). Estudos mostram que a redução da profundidade de sondagem e ganho no nível clínico de inserção em fumantes representam 50% a 75% das respostas obtidas em pacientes não-fumantes após terapia periodontal cirúrgica ou não-cirúrgica (Johnson e Hill, 2004). Já foi demonstrado que a prevalência de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* diminuiu significativamente após raspagem e alisamento radicular (RAR) em não-fumantes ou ex-fumantes, mas aumentou em fumantes (Haffajee *et al.*, 1997); e que após o tratamento periodontal de pacientes

fumantes com periodontite crônica, a porcentagem de sítios positivos para *T. forsythia* foi significativamente maior que em pacientes não-fumantes (Darby, 2009).

Portanto, métodos adjuvantes associados à remoção mecânica do biofilme, podem ser propostos para o tratamento de fumantes com periodontite. O fumo está entre os fatores podem fazer de alguns pacientes candidatos ao uso sistêmico de antibióticos (van Winkelhoff e Winkel, 2009). Apesar de bons resultados, a antibioticoterapia sistêmica apresenta algumas desvantagens, incluindo mecanismos de resistência bacteriana, dificuldade de drogas sistêmicas em atingir altas concentrações no fluido gengival, um risco aumentado de reações adversas, aumento da seleção microorganismos resistentes a antibióticos e a dificuldade de controlar a adesão do paciente ao tratamento (Slots, 2004; Soukos e Goodson, 2011).

Uma abordagem não-invasiva para controle de infecções, chamada de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), que combina a aplicação de um agente químico não-tóxico (fotossensibilizador) com uma fonte de luz de baixa intensidade, tem recebido destaque no tratamento das doenças orais (Takasaki *et al.*, 2009). O efeito bactericida da TFDa é baseado na ligação preferencial do fotossensibilizador com a superfície celular bacteriana. A molécula de fotossensibilizador absorve a luz em sua potência máxima no comprimento de onda de 600-700 nm e gera espécies altamente reativas de oxigênio, como íons superóxidos, hidroxilas, outros radicais livres e, em particular, o oxigênio singlete, que podem danificar uma grande variedade de proteínas, lípidios e carboidratos. O oxigênio singlete tem uma meia-vida muito curta e, portanto, o seu raio de ação é pequeno, resultando em efeitos fotorreativos apenas em locais muito próximos de onde o fotossensibilizador está localizado. Esta reação localizada e o fato de que as células bacterianas não

apresentam a mesma capacidade para eliminar os compostos de oxigênio reativos que as células eucarióticas fazem com que a TFDa seja altamente bactericida com poucos danos aos tecidos adjacentes (Braham *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* demonstraram que a TFDa aumenta a morte bacteriana (Braham *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2009; Goulart *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2008). Estudos clínicos avaliaram o efeito da TFDa no tratamento da periodontite. Em alguns estudos, a associação da TFDa à RAR levou a maior redução na profundidade de sondagem e ganho no nível clínico de inserção (Andersen *et al.*, 2007; Braun *et al.*, 2008; Lui *et al.*, 2011; Lulic *et al.*, 2009). A TFDa reduziu significativamente a porcentagem de sítios positivos para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* 180 dias após o tratamento quando comparado à RAR isoladamente (Theodoro *et al.*, 2011). Em outro estudo, foram observadas reduções estatisticamente significantes de *F. nucleatum* e *E. nodatum* 3 meses e *E. corrodens* e espécies de *Capnocytophaga* 6 meses após o tratamento com TFDa (Chondros *et al.*, 2009). Da mesma forma, também foi observada uma diferença significativa na presença de *F. nucleatum* entre os sítios tratados com TFDa e os sítios tratados apenas com RAR, 12 semanas após o tratamento (Sigusch *et al.*, 2010).

Os efeitos da TFDa nos mediadores inflamatórios que participam da patogenia da doença periodontal ainda não estão bem esclarecidos e, atualmente, poucos estudos controlados avaliaram esses aspectos (Giannopoulou *et al.*, 2011). O fluido crevicular gengival (FCG) contém células inflamatórias, proteínas séricas, bactérias, produtos de degradação tecidual, enzimas, anticorpos, proteínas do complemento e inúmeros mediadores inflamatórios. A coleta de amostras de FGC é relativamente não-invasiva, sendo uma importante ferramenta para a análise de marcadores inflamatórios de inflamação periodontal, que pode ser determinada pela

quantificação de citocinas próinflamatórias, imunorregulatórias e quimiocinas (Tymkiw *et al.*, 2011). Dentre os possíveis marcadores, a Interleucina-1 (IL-1) tem sido a citocina mais estudada e a IL-1 beta (IL-1 β) apresenta um papel importante na patogênese da doença periodontal, já que pode ser consistentemente encontrada em níveis aumentados em pacientes com periodontite (Preshaw e Taylor, 2011). Outras moléculas frequentemente encontradas no FCG são as metaloproteinases (MMPs), que são uma família de enzimas que degradam a matriz extracelular e componentes da membrana basal, exercendo papel nos processos de degeneração tecidual. A MMP-8 é uma das principais collagenases da periodontite (Sorsa *et al.*, 2004). Assim, essas moléculas podem atuar como possíveis marcadores para complementar a avaliação periodontal.

Diante do exposto, justifica-se a avaliação dos parâmetros clínicos, microbiológicos e de marcadores moleculares dos resultados da associação da TFDa aos procedimentos convencionais de raspagem e alisamento radicular em pacientes fumantes portadores de periodontite crônica.

2 Proposição

2 Proposição

Objetivo geral:

O objetivo deste estudo controlado e randomizado é verificar a ação complementar da terapia fotodinâmica antimicrobiana aos procedimentos convencionais de raspagem e alisamento radicular em pacientes fumantes portadores de periodontite crônica por meio de análises clínicas, microbiológicas e imunoenzimáticas.

Objetivos específicos:

- (i) verificar o índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção relativo (NCI) e recessão gengival (RG), avaliando a situação periodontal dos dentes selecionados antes e após os tratamentos (RAR + TFDa *versus* RAR), nos seguintes tempos: exame inicial, 4 semanas e 12 semanas após o tratamento periodontal;
- (ii) por meio da técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, identificar e quantificar as espécies periodontopatogênicas antes e após os tratamentos (RAR + TFDa *versus* RAR), nos seguintes tempos: exame inicial, 1 semana, 4 semanas e 12 semanas após o tratamento periodontal;
- (iii) por meio do teste imunoenzimático ELISA, quantificar Interleucina 1 beta (IL-1 β) e Metaloproteinase 8 (MMP-8) presentes nas amostras de FCG antes e após a realização dos tratamentos (RAR + TFDa *versus* RAR), nos seguintes tempos: exame inicial, 1 semana, 4 semanas e 12 semanas após o tratamento periodontal.

3 Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Seleção de pacientes

Este estudo foi realizado no Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, nº 2009.1.588.58.0 (Anexo A) e todos os pacientes incluídos concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

Os critérios de inclusão foram: (i) diagnóstico de periodontite crônica, com presença de dois sítios bilaterais em dentes que não fossem molares ou pré-molares birradiculares e sem restaurações ou próteses subgengivais com profundidade de sondagem de 5 mm ou mais; (ii) presença de pelo menos 20 dentes na boca; (iii) fumantes que tenham fumado 10 ou mais cigarros por dia durante os últimos cinco anos, pelo menos; (iv) bom estado geral de saúde. Os critérios de exclusão foram: (i) diagnóstico de outras formas de doença periodontal que não a periodontite crônica (ii) gestantes ou lactantes; (iii) presença de alterações sistêmicas; (iv) uso de antibióticos ou tratamento periodontal nos últimos 6 meses; (v) uso crônico de antiinflamatórios.

A determinação do tamanho da amostra foi realizada através de teste estatístico específico, com base na variável referente à diminuição da profundidade de sondagem esperada. Para isso, foi necessária a determinação do desvio-padrão médio e da menor diferença necessária para detecção de diferença significativa entre os grupos. Chondros *et al.* (2009), em estudo clínico randomizado, considerou

a diferença de 1 mm e um desvio-padrão de 0,8 mm, alcançando um valor de 12 pacientes por grupo, totalizando 24 pacientes. Em uma meta-análise realizada com estudos que testaram a TFDa em pacientes com periodontite, Azarpazhooh *et al.* (2010) encontraram um desvio-padrão médio de 0,47 mm na profundidade de sondagem em pacientes com periodontite crônica. Da mesma forma, outros estudos também verificaram desvios-padrão que variaram de 0,3 a 0,8 mm em pacientes tratados com terapia fotodinâmica em fumantes (Chondros *et al.*, 2009; Christodoulides *et al.*, 2008; Machuca *et al.*, 2000). Assim, para o cálculo amostral foi adotada a diferença mínima para a detecção de diferenças entre os tratamentos de 1 mm na profundidade de sondagem e um desvio-padrão médio de 1 mm. Dessa maneira, o teste indicou que para um poder de 0,8, a amostra deveria ser de 17 pacientes. Considerando a possível desistência de algum paciente, a amostra determinada foi de no mínimo 20 pacientes.

3.2 Exame clínico periodontal

Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados no exame inicial e 4 e 12 semanas após o tratamento periodontal pelo mesmo examinador, cego em relação aos tratamentos a serem realizados: Índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS), recessão gengival (RG), profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção relativo (NCI). Foram utilizadas uma sonda periodontal eletrônica (Florida Probe¹) e uma placa de acrílico com os pontos de referência que permitissem a sondagem sempre nos mesmos sítios. Foram avaliados seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual). A profundidade de sondagem foi medida a partir da margem gengival até o fundo da

¹ Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA.

bolsa com a ponta tipo *pocket*, e o nível clínico de inserção relativo foi medido da marca feita na placa de acrílico até o fundo da bolsa com o auxílio da ponta *stent*.

Cinco pacientes, cada um com dois pares de dentes contralaterais com $PS \geq 5$ mm em pelo menos um sítio foram usados para calibrar o examinador, que avaliou os pacientes em dois momentos diferentes separados por 48 horas. A calibração foi considerada satisfatória quando um nível de 90% de concordância foi atingido (Oliveira *et al.*, 2007).

3.3 Desenho do estudo

O seguinte desenho experimental foi proposto neste estudo:

O estudo foi realizado utilizando o modelo de boca dividida. Vinte pares de dentes contralaterais foram incluídos (18 incisivos, 12 caninos, e 10 pré-molares); cada sujeito tinha apenas um par de dentes analisados e cada dente deveria apresentar $PS \geq 5$ mm em pelo menos dois sítios. Cada dente dos pares de dentes contralaterais foi aleatoriamente tratado com raspagem subgengival (RAR) – grupo controle (GC) – ou com RAR associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) – grupo teste (GT). Essa aleatorização foi determinada por uma tabela gerada em programa de computador. O mesmo periodontista realizou todos os procedimentos.

3.4 Terapia periodontal

A raspagem e alisamento radicular (RAR) foi realizada nos grupos teste e controle com auxílio de aparelho de ultrassônico² e com curetas tipo Gracey³, com aplicação de anestesia local, quando necessário. As superfícies radiculares foram tratadas até a obtenção de superfície dura e lisa, verificada com o uso de sonda periodontal. Se necessário, sessões adicionais de raspagem dos quadrantes não correspondentes aos dentes selecionados foram programadas anteriormente à sessão de raspagem dos quadrantes que incluíam os dentes a serem analisados. Isso foi organizado de modo que a última sessão incluísse os dentes escolhidos e que o intervalo entre as sessões não fosse maior que 7 dias. Imediatamente após os procedimentos de raspagem e alisamento radicular dos quadrantes com os dentes selecionados, na mesma sessão clínica, os dentes do grupo teste foram irrigados com soro fisiológico e, em seguida, foi aplicado um fotossensibilizador da família das fenotiazinas^{||} (10mg/mL) sobre as superfícies radiculares dos seis sítios do dente em questão, partindo da porção mais apical da bolsa periodontal até a porção mais coronária, durante 1 minuto. Posteriormente, as bolsas periodontais foram novamente irrigadas com soro fisiológico para a remoção dos excessos do fotossensibilizador e as superfícies radiculares coradas foram irradiadas com um laser de diodo[§] com comprimento de onda de 660nm, associado a uma fibra óptica[¶], com 0,6 mm de diâmetro, durante 10 segundos por sítio, totalizando 1 minuto por dente (Oliveira *et al.*, 2009). Em todas as consultas de retorno dos pacientes (1 semana após a TFDa e, a partir daí, uma vez por mês até que se completassem 3 meses de

² Cavitron, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA.

³ Hu-Friedy instruments, Chigago, IL, USA.

^{||} Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria.

[§] Minilaser 2075F, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria.

[¶] Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria.

acompanhamento), profilaxias de toda a cavidade bucal e novas instruções de higiene oral foram realizadas. Quando havia a presença de cálculo supragengival, raspagens supragengivais foram realizadas, mas instrumentações subgengivais não foram repetidas nessas consultas. Os pacientes receberam terapia periodontal básica em todos os dentes. Somente os sítios experimentais selecionados foram considerados para a análise clínica dos parâmetros avaliados, bem como para a realização das coletas de biofilme e de fluido crevicular gengival. Além disso, todos os pacientes receberam instruções de higiene oral para o controle adequado do biofilme supragengival.

Figura 1. A. Procedimentos de raspagem subgengival, realizados em ambos os grupos; B. Aplicação do fotossensibilizador (Helbo Blue) subgengivalmente, permanecendo por 1 minuto, realizada apenas no grupo teste; C. Introdução da ponta do laser subgengivalmente; D. Ativação do laser diodo; E. Caneta do laser sem fio (Minilaser 2075F); F. Caneta com a ponta de aplicação em posição.

3.5 Coleta de fluido gengival

Foram colhidas amostras do fluido gengival dos sítios experimentais dos dentes selecionados para a pesquisa no exame inicial e 1 semana, 4 semanas e 12

semanas meses após a realização dos tratamentos propostos. A coleta relativa ao exame inicial foi realizada imediatamente antes dos procedimentos de raspagem. Resumidamente, após a remoção cuidadosa do biofilme supragengival com auxílio de gaze estéril, foi realizado um isolamento relativo do campo com rolos de algodão estéreis para não haver interferência da saliva e filtros de papel específicos[#] para a coleta do fluido gengival foram introduzidos no sulco gengival (bolsa periodontal) até que houvesse resistência, permanecendo por 30 segundos nos sítios. Foram coletados 4 filtros de papel de cada sítio. Aqueles contaminados com sangue ou saliva foram descartados. Após a coleta, os filtros de papel foram imediatamente colocados em tubos *ependorf* esterilizados, e armazenados a -80°C. A análise do volume de fluido foi feita com auxílio do aparelho Periotron 8000^{**}. Uma curva padrão correlacionando volumes conhecidos com valores obtidos pelo aparelho foi obtida e, a partir de um programa para análises estatísticas, uma regressão polinomial de quarta ordem foi aplicada ponto-a-ponto para determinação do volume de FGC colhido de cada sítio.

3.6 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os filtros de papel obtidos em cada sítio foram eluídos em 600 µl de solução tampão (PBS - *phosphate buffered saline*) contendo 0,1% de solução Tween 20^{††} e 1 µl de coquetel de inibidores de protease^{‡‡}. Os tubos foram agitados por 30 minutos e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. A amostra foi dividida em alíquotas para a quantificação das citocinas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA - *enzymelinked immunosorbent assay*). A concentração dos biomarcadores avaliados

[#] Periopaper, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA.

^{**} Oraflow Inc., Plainview, NY, USA.

^{††} USB Corpo., Cleveland, OH, USA.

^{‡‡} Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA.

(IL-1 β e MMP-8) foi determinada por meio da utilização de kits laboratoriais específicos^{§§}, de acordo com as orientações dos fabricantes. Todos os reagentes foram levados a temperatura ambiente e a solução diluente foi adicionada em cada poço, que já apresentava o anticorpo monoclonal específico contra a citocina a ser quantificada previamente aderido. Os padrões e amostras foram adicionados aos poços, permitindo a ligação da citocina ao anticorpo imobilizado. Após um período de incubação, os poços foram lavados com solução tampão fornecida pelo fabricante e um segundo anticorpo policlonal específico contra a citocina e conjugado a uma enzima foi adicionado. A placa foi novamente incubada e lavada em seguida. Foi adicionado em todos os poços o substrato que inicia a reação colorimétrica catalisada pela enzima, seguido de incubação e adição de solução amplificadora da reação colorimétrica, que é proporcional à quantidade da citocina adicionada no primeiro passo. Após novo período de incubação, a solução de parada foi adicionada. O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA, com absorbância em 490 nm. A curva padrão feita com os padrões fornecidos no kit serviram como parâmetro para a determinação das concentrações das proteínas. A diluição ótima encontrada para a IL-1 β foi de 1:25 e para MMP-8 foi de 1:50.

3.7 Coleta de biofilme

Foram colhidas amostras de biofilme subgengival dos sítios experimentais dos dentes selecionados no exame inicial, 1 semana, 4 semanas e 12 semanas após a realização dos tratamentos propostos. As coletas foram realizadas após a remoção cuidadosa do biofilme supragengival e isolamento relativo (após a coleta de

^{§§} Human IL-1 beta Quantikine HS ELISA Kit (HSLB00C)/Human Total MMP-8 Quantikine ELISA Kit MMP-8 (DMP800), R&D Systems, Minneapolis, MN, USA.

amostras de FCG). A amostra de biofilme subgengival do interior da bolsa periodontal foi removida utilizando-se uma cureta Gracey mini-five 11/12 ou 13/14 estéril, por meio de um movimento único de raspagem no sentido ápico-coronal da bolsa periodontal. As amostras foram armazenadas em tubos Eppendorf estéreis contendo 150µl de TE (10nM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6), sendo acrescentados, em seguida, 150µl de 0,5M de NaOH. As amostras foram estocadas a -80°C.

Figura 2. A. *Periopaper* em posição por 30 segundos para coleta do fluido gengival; B. *Periotron 8000*, utilizado para determinar o volume do fluido gengival; C. Coleta de biofilme subgengival com curetas *mini-Gracey*.

3.8 Técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Todos os procedimentos referentes à técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram realizados no laboratório de pesquisa da Universidade de Garulhos. A metodologia aqui detalhada foi descrita anteriormente (Sampaio, 2009).

3.8.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. Todas as cepas foram adquiridas

lioofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais.

Tabela 1. Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA separados por complexos bacterianos

Espécie	CEPA	Espécie	CEPA
Complexo azul		Complexo laranja	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ss vincentii</i>	49256 ^a
Complexo roxo		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
Complexo amarelo		<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	Complexo vermelho	
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
Complexo verde		Outras espécies	
<i>Agregatibacter Actinomycetemcomitans a+b</i>	43718 ^a /29523 ^a	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
Complexo laranja		<i>Propionibacterium acnes I+II</i>	11827 ^a /11828 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	54146 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

^a ATCC (American Type Culture Collection)

^b Forsyth Institute

3.8.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5mL contendo 1mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C₁₂H₂₅NaO₄S - Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15mg/mL de lisozima (Sigma) e 5mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por (Smith *et al.*, 1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por (Feinberg e Vogelstein, 1983).

3.8.3 Checkerboard DNA-DNA Hybridization

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

foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 η g e 10 η g de DNA de cada espécie, respectivamente (Haffajee *et al.*, 1997). A membrana foi removida do Minislot 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México), pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 η g/mL, em 130 μ L de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de Na_2HPO_4 (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C. Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na_2HPO_4 , a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi,

então, lavada duas vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5. Para a detecção dos sinais a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a temperatura de 20°C. A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada duas vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas duas linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 a aproximadamente 10^6 células e 5 mais de 10^6 células. Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

Figura 3. A. Fervura em banho-maria das amostras de biofilme subgengival; B. Membrana de *nylon* posicionada no *Minislot* 30; C. Deposição das amostras de biofilme nas canaletas do *Minislot* 30; D e E. Pré-hibridização da membrana em solução por 1 hora a 42°C; F. Posicionamento da membrana no *Miniblotter* 45; G. Adição das sondas de DNA às canaletas do *Miniblotter* 45; H e I. Preparo do no *Miniblotter* 45 para hibridização por no mínimo 20 horas, a 42°C; J. Filme revelado para permitir leitura.

3.9 Análise estatística

Os dados foram registrados como média e seus respectivos desvios-padrão e a unidade experimental foi o indivíduo (n=20). Como foi adotado o modelo experimental boca dividida (*split mouth*), os dados foram considerados pareados. Após teste para verificação da normalidade dos dados (Kolmogorov Smirnov), determinou-se que a análise estatística fosse realizada através da aplicação de testes não-paramétricos. Para a comparação entre os resultados obtidos em GC e GT foi aplicado o teste Wilcoxon. Já nas análises em que mais de dois parâmetros foram comparados simultaneamente (comparação intragrupos nos diferentes períodos) foi aplicado o teste de Friedman. Quando detectada diferença estatisticamente significativa, o teste de Tukey foi aplicado para identificar entre quais variáveis encontrava-se a diferença estatística. Para todas as análises estatísticas foi adotado nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Foi utilizado um programa de computador específico^{||}.

^{||} SigmaStat for Windows, version 3.5, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA.

4 Resultados

4 Resultados

20 indivíduos (35 a 55 anos, com idade média de $46,05 \pm 6,38$ anos, sendo 9 homens e 11 mulheres) completaram o estudo (tabela 2). O IP (avaliado em quatro sítios por dente em todos os dentes) reduziu significativamente após a tratamento periodontal ($75 \pm 22\%$ no exame inicial para $25 \pm 8\%$ após 4 semanas e para $31 \pm 12\%$ após 12 semanas; $p < 0,001$). Quanto ao sangramento à sondagem (verificado somente nos sítios selecionados), 100% dos sítios apresentavam sangramento no exame inicial. Para o GT, a porcentagem de sítios com sangramento foi significativamente reduzida para $20 \pm 41\%$ após 4 semanas e para $22 \pm 43\%$ após 12 semanas ($p < 0,001$). Para o GC, a porcentagem foi significativamente reduzida para $30 \pm 47\%$ após 4 semanas e $28 \pm 46\%$ após 12 semanas ($p < 0,001$). Após o tratamento periodontal, foi observada melhora nos parâmetros clínicos (redução na PS e ganho no NCI) (tabela 3). Diferenças estatísticas entre os grupos não foram observadas. É importante destacar que os pacientes mantiveram o mesmo hábito de fumar durante todo o período de avaliação.

Tabela 2. Dados demográficos dos pacientes da amostra.

	Exame Inicial
N	20
Idade	$46,05 \pm 6,38$
Sexo (masculino/feminino)	9/11
Incisivos	18
Caninos	12
Pré-molares	10

Tabela 3. Parâmetros clínicos no Exame Inical e 4 e 12 semanas após a terapia (média $\pm$ dp)

	Exame Inical	4 semanas	12 semanas	Valor de P*	0-4 semanas	0-12 semanas
PS (mm)					Redução na PS	Redução na PS
Teste	5,39 $\pm$ 0,74 ^a	3,52 $\pm$ 0,82 ^b	3,58 $\pm$ 1,05 ^b	<0,001 [‡]	1,87 $\pm$ 0,69	1,81 $\pm$ 0,52
Controle	5,35 $\pm$ 0,70 ^a	3,37 $\pm$ 0,98 ^b	3,77 $\pm$ 1,06 ^b	<0,001 [‡]	1,98 $\pm$ 0,77	1,58 $\pm$ 1,28
Valor de P[†]	0,854	0,580	0,734		0,490	0,258
NCI (mm)					Ganho no NCI	Ganho no NCI
Teste	10,83 $\pm$ 1,45 ^a	9,01 $\pm$ 1,70 ^b	9,24 $\pm$ 1,91 ^b	<0,001 [‡]	1,82 $\pm$ 1,22	1,60 $\pm$ 0,92
Controle	11,12 $\pm$ 1,52 ^a	9,28 $\pm$ 1,60 ^b	9,72 $\pm$ 1,86 ^b	<0,001 [‡]	1,85 $\pm$ 1,37	1,41 $\pm$ 1,58
Valor de P[†]	0,284	0,275	0,083		0,729	0,709
RG (mm)					Aumento na RG	Aumento na RG
Teste	0,24 $\pm$ 0,50	0,43 $\pm$ 0,68	0,53 $\pm$ 0,83	0,073	0,19 $\pm$ 0,36	0,29 $\pm$ 0,65
Controle	0,26 $\pm$ 0,81	0,54 $\pm$ 1,03	0,48 $\pm$ 0,88	0,276	0,28 $\pm$ 0,79	0,20 $\pm$ 0,61
Valor de P[†]	0,813	0,734	0,688		0,688	0,547

* Teste de Friedman

† Teste de Wilcoxon

^{a, b} Teste de Tukey – letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes (p<0.05)[‡] Diferença estatisticamente significativa (p<0.05)

Quanto à concentração dos biomarcadores, diferenças estatisticamente significantes nas análises intragrupos não foram verificadas (tabela 4). Na comparação entre os grupos, a concentração de IL-1 β foi significativamente maior no GC que no GT após uma semana. Já a concentração de MMP-8 foi significativamente maior no GC após 12 semanas.

Tabela 4. Concentração de IL-1 β e MMP-8 no Exame Inicial e 1, 4 e 12 semanas após a terapia (média $\pm$ dp)

	Exame Inicial	1 semana	4 semanas	12 semanas	Valor de P*
IL-1β					
Teste	32,84 $\pm$ 29,72	24,65 $\pm$ 18,85	24,86 $\pm$ 25,29	28,16 $\pm$ 24,54	0,603
Controle	25,45 $\pm$ 17,82	34,07 $\pm$ 24,81	27,18 $\pm$ 20,82	27,69 $\pm$ 26,31	0,087
Valor de P[†]	0,784	0,048 [‡]	0,622	0,898	
MMP-8					
Teste	245,75 $\pm$ 207,52	284,39 $\pm$ 260,91	250,82 $\pm$ 215,92	303,31 $\pm$ 331,62	0,420
Controle	238,15 $\pm$ 274,59	307,90 $\pm$ 301,12	257,15 $\pm$ 273,40	534,23 $\pm$ 647,37	0,090
Valor de P[†]	0,409	0,729	0,869	0,024 [‡]	

* Teste de Friedman

† Teste de Wilcoxon

a, b Teste de Tukey – letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes (p<0.05)

‡ Diferença estatisticamente significativa (p<0.05)

Todas as 40 espécies bacterianas avaliadas foram detectados em diferentes níveis no exame inicial, sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Após o tratamento periodontal, os níveis de algumas espécies bacterianas diminuíram, enquanto que algumas outras espécies apresentaram um aumento. Apesar dessa variação, a análise estatística não foi capaz de identificar diferenças significativas em nenhuma das análises (comparações intragrupo e entre os grupos - figuras 4 e 5).

Figura 4. Variação da médias de contagem das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos grupos GT (RAR + TFDa) e GC (RAR) nos períodos analisados.

Figura 5. Variação das médias de contagem das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos grupos GT (RAR + TFDa) e GC (RAR) em cada período.

5 Discussão

5 Discussão

Neste estudo, os tratamentos propostos levaram a melhoras estatisticamente significantes dos parâmetros clínicos após a terapia periodontal. Esses resultados eram esperados, uma vez que a terapia periodontal não-cirúrgica tem se mostrado eficiente no longo prazo, ainda que o fumo apresente um efeito negativo na redução da profundidade de sondagem e ganho no nível clínico de inserção (Johnson e Hill, 2004). A resposta prejudicada dos fumantes à terapia periodontal é provavelmente o resultado do efeito sistêmico do tabagismo sobre o hospedeiro, associado aos efeitos locais dos componentes do cigarro, que comprometem os resultados obtidos após o tratamento (Darby, 2009; Johnson e Hill, 2004). Assim, os métodos adjuvantes para aumentar o efeito e melhorar os ganhos clínicos após o tratamento periodontal não-cirúrgico em fumantes podem ser vantajosos (Al-Zahrani and Austah, 2011). Este estudo não conseguiu demonstrar benefícios clínicos adicionais de uma aplicação única de TFDa quando associada à RAR em fumantes. A comparação entre os grupos não constatou diferença significativa entre os sítios tratados com RAR e aqueles tratados com RAR + TFDa.

Em relação aos efeitos da TFDa em pacientes fumantes, uma comparação com outros estudos é difícil de ser realizada já que muitos deles excluíram os fumantes dos experimentos (Lui *et al.*, 2011; Theodoro *et al.*, 2011; Sigusch *et al.*, 2010; Ruhling *et al.*, 2010) e em outros que incluíram os fumantes os resultados apresentados não foram divididos de acordo com o tabagismo (Andersen *et al.*, 2007; Chondros *et al.*, 2009; Christodoulides *et al.*, 2008; Polansky *et al.*, 2009). Um ensaio clínico avaliou a eficácia do efeito adjuvante da TFDa associada à RAR em fumantes (Al-Zahrani e Austah, 2011). Da mesma forma que neste estudo, em cada

paciente, pelo menos um dente recebeu RAR e TFDa (grupo teste) e um dente contra-lateral recebeu somente RAR (grupo controle). Três meses após o tratamento periodontal, houve uma melhora estatisticamente significativa na PS, NCI, SS e IP após o tratamento periodontal em ambos os grupos e uma redução estatisticamente significativa maior da PS e maior ganho no NCI no grupo teste quando comparado com o grupo controle. A metodologia aplicada foi semelhante à do presente estudo, com uma única aplicação de TFDa (embora os autores do estudo anterior não tenham especificado por quanto tempo os sítios foram irradiados) e uso de fotossensibilizador da família das fenotiazinas (embora de marca comercial distinta). Uma consideração importante em relação à metodologia do estudo é quanto à unidade experimental. Na pesquisa anterior, 17 pacientes foram incluídos, mas 7 pacientes contribuíram com 4 dentes cada e 10 pacientes contribuíram com 2 dentes cada, dando um total de 121 sítios periodontais, que eram a unidade experimental (n=64 para o grupo teste e n=57 para o grupo controle). Isto pode ter facilitado a detecção de diferenças estatísticas. Neste estudo, a análise de mais de um par de dentes de cada paciente foi evitada e o paciente foi a unidade experimental.

Apesar de alguns estudos terem observado um efeito positivo da TFDa como coadjuvante no tratamento de pacientes com doença periodontal (Andersen *et al.*, 2007; Braun *et al.*, 2008; Lui *et al.*, 2011; Lulic *et al.*, 2009; Sigusch *et al.*, 2010), outros ensaios clínicos (Theodoro *et al.*, 2011; Chondros *et al.*, 2009; Christodoulides *et al.*, 2008; Cappuyns *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2011; Yilmaz *et al.*, 2002) não conseguiram demonstrar diferenças clínicas entre a RAR e RAR + TFDa. Uma revisão sistemática mostrou que a TFDa como adjuvante à RAR não foi superior ao tratamento com RAR, embora isso não signifique que os resultados relatados indiquem que a TFDa não seja eficaz (Azarpazhooh *et al.*, 2010). Como a maioria

dos estudos anteriores (Lui *et al.*, 2011; Theodoro *et al.*, 2011; Chondros *et al.*, 2009; Christodoulides *et al.*, 2008; Polansky *et al.*, 2009; Cappuyns *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2011), neste estudo, apenas uma aplicação de TFDa foi realizada. Uma vez que a RAR é capaz de atingir bons resultados clínicos, é possível que os efeitos positivos de uma única aplicação de TFDa não sejam suficientes para proporcionar melhorias adicionais com relevância clínica.

No presente estudo, as concentrações de IL-1 β e MMP-8 no FCG de foram verificadas no início do estudo e 1, 4 e 12 semanas após o tratamento periodontal. Os produtos bacterianos estimulam as células a secretarem muitas moléculas, como citocinas pró-inflamatórias e imunorregulatórias, fatores de crescimento, quimiocinas, linfocinas e collagenases (Bostrom *et al.*, 1999; Buduneli e Kinane, 2011). A doença periodontal é associada com níveis aumentados no FCG de uma variedade de moléculas envolvidas na resposta inflamatória e imunológica, bem como marcadores que refletem a destruição dos tecidos (Holmlund *et al.*, 2004). Portanto, considera-se que o FCG é capaz de refletir a inflamação, remodelação de colágeno e a reabsorção do osso alveolar nos tecidos periodontais circunjacentes (Keles *et al.*, 2006). As análises intragrupos não mostraram diferenças estatisticamente significantes, enquanto o grupo controle apresentou uma concentração mais elevada de IL-1 β após 1 semana e de MMP-8 após 12 semanas quando comparado com o grupo teste. A falta de redução dos níveis dos biomarcadores após o tratamento poderia ser considerada contraditória, uma vez que estudos anteriores mostraram que a RAR é capaz de suprimir as concentrações de IL-1 β e MMP-8 (Buduneli e Kinane, 2011; Holmlund *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2000; Engebretson *et al.*, 2002; Gamonal *et al.*, 2000; Thunell *et al.*, 2010). Contudo, o fumo altera a resposta do hospedeiro, incluindo a função vascular, as atividades de neutrófilos/monócitos, a

expressão de moléculas de adesão, a produção de anticorpos e a liberação de citocinas e de mediadores inflamatórios (Tymkiw *et al.*, 2011). A expressão de 22 quimiocinas e citocinas no FCG de fumantes e não-fumantes com periodontite e de indivíduos periodontalmente saudáveis foram comparadas e foi demonstrado que os fumantes apresentaram maiores níveis de IL-1 β , mesmo quando sítios saudáveis de fumantes foram comparados com sítios saudáveis dos não-fumantes e que não-fumantes apresentam mais diferenças intragrupo entre os sítios saudáveis e doentes do que fumantes (Tymkiw *et al.*, 2011). Mantyla *et al.* (2003) observaram que a diminuição das concentrações de MMP-8 após o tratamento não foi estatisticamente significante para os fumantes, apenas para os não-fumantes. Portanto, a influência negativa do hábito de fumar, que dificulta as respostas do hospedeiro, pode ter tornado mais difícil a constatação de diferenças significativas na concentração de IL-1 β e MMP-8 antes e após o tratamento dentro dos grupos.

A capacidade da TFDa de inativar citocinas inflamatórias encontrados em sítios periodontalmente doentes foi testada *in vitro*. Uma completa inativação de IL-1 β foi obtida quando as citocinas foram expostas à TFDa por 60 segundos (Braham *et al.*, 2009), o que poderia explicar o nível significativamente maior de IL-1 β no GC do que no GT uma semana após o tratamento. Este achado também está de acordo com um estudo que avaliou o efeito adjuvante da TFDa em 24 adultos não-fumantes com periodontite crônica não-tratada (Lui *et al.*, 2011). Os autores também observaram nível significativamente menor de IL-1 β no grupo em que a TFDa foi associada à RAR, uma semana após o tratamento periodontal. Os níveis de IL-1 β e MMP-8 no FCG também foram quantificados pela técnica de ELISA em 58 pacientes com periodontite crônica, comparando-se os efeitos da RAR, RAR associada a uma sessão de TFDa e RAR associada a duas sessões de TFDa (Ge *et al.*, 2011). As

amostras de FCG foram obtidas antes do tratamento periodontal, 6 semanas e 12 semanas após o tratamento. Os resultados revelaram que 12 semanas após o tratamento houve supressão significativa dos níveis de IL-1 β e MMP-8 nos sítios tratados com TFDa.

A IL-1 é considerada o principal mediador da destruição tecidual na doença periodontal e a MMP-8 (colagenase-2) é reconhecida por ser a principal colagenase derivada de células do hospedeiro levando à destruição de tecido periodontal como resultado da degradação do colágeno gengival e do ligamento periodontal (Kraft-Neumarker *et al.*, 2012). Assim, como a MMP-8 e IL-1 β são potenciais candidatos a biomarcadores da doença periodontal (Miller *et al.*, 2006), as concentrações mais baixas dessas moléculas no FCG de sítios tratados com RAR + TFDa pode sugerir que a TFDa proporcionou um efeito adicional sobre a cicatrização periodontal. No que diz respeito à IL-1 β , os dados sugerem que a terapia fotodinâmica pode ter um efeito benéfico no controle da inflamação periodontal durante o período inicial de cicatrização, o que corrobora um estudo anterior (Lui *et al.*, 2011). Em relação à MMP-8, já foi descrito que níveis elevados de MMP-8 após a RAR e durante a fase de manutenção evidenciam um risco de perda de suporte periodontal (Hernandez *et al.*, 2010, Reinhardt *et al.*, 2010). Com base nos dados de MMP-8 do presente estudo, pode-se especular que a TFDa foi capaz de fornecer um resultado mais estável, uma vez que os sítios do grupo controle mostram uma maior concentração de MMP-8, após 12 semanas, sugerindo uma possível destruição tecidual ativa ou um risco para futura destruição.

O efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico (RAR) associado ou não à TFDa na redução de periodontopatógenos subgengivais específicos também foi analisado 1, 4 e 12 semanas após o tratamento periodontal. Muitos estudos têm

demonstrado que a RAR reduz significativamente a prevalência e os níveis de espécies patogênicas, tais como *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*, que estão relacionadas com redução na profundidade de sondagem (Darby *et al.*, 2005, Haffajee *et al.*, 1997). A capacidade que a TFDa tem de matar as bactérias foi demonstrada em estudos *in vitro*. A exposição de culturas bacterianas a laser de diodo na presença de azul de metileno como fotosensibilizador levou a uma taxa de morte celular de 95-99% em várias espécies testadas (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. Intermedia* e *S. sanguis*) (Chan e Lai, 2003). Da mesma forma, laser de He/Ne foi capaz de matar grandes proporções de bactérias presentes em amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica, sensibilizados por azul de toluidina (Sarkar and Wilson, 1993), o que também foi observado em biofilmes de *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* (Dobson e Wilson, 1992). Uma significativa redução no número de *P. gingivalis* também foi detectada nas cavidades orais de ratos, em que o azul de toluidina foi utilizado em conjunto com luz laser (Komerik *et al.*, 2003). Esse efeito da TFDa também tem sido observado em estudos clínicos. Em amostras de biofilme subgengival de 33 pacientes com periodontite crônica, uma redução significativa na proporção de sítios positivos para periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *P. nigrescens*) foi observada 180 dias após o tratamento periodontal no grupo em que a TFDa foi associada à RAR quando comparado com o grupo que recebeu somente RAR (Theodoro *et al.*, 2011). Além disso, a TFDa foi capaz de suprimir a concentração de *F. nucleatum* em 24 pacientes com periodontite crônica localizada, e um estudo realizado em pacientes sob terapia periodontal de suporte mostrou uma redução

estatisticamente significativa de *F. nucleatum* e *E. nodatum* no grupo onde foi realizada a TFDa (Chondros *et al.*, 2009)

Contudo, neste estudo não foram observadas alterações significativas nos parâmetros microbiológicos após os tratamentos propostos, demonstrando que nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir significativamente as espécies bacterianas analisadas. O fumo provavelmente influenciou negativamente as respostas dos hospedeiros, conforme já demonstrado em ensaios clínicos anteriores. A frequência de detecção de *T. forsythia*, *P. micros* e *C. rectus* foi menor em não-fumantes do que em fumantes após o tratamento periodontal e a possibilidade de detectar níveis maiores que 20% de *P. micros* e/ou *F. nucleatum* foi 13,8 vezes superior nos pacientes fumantes (van Winkelhoff and Winkel, 2009). Em um estudo no qual fumantes receberam RAR ou RAR + aplicação local de doxiciclina, a RAR não foi capaz de reduzir os parâmetros microbiológicos, apesar de uma redução significativa na frequência de *T. forsythia* e *P. gingivalis* ter sido encontrada no grupo em que a doxiciclina foi aplicada (Machion *et al.*, 2004). Van der Velden *et al.* (2003) relataram que fumantes não mostraram uma diminuição significativa na frequência de periodontopatógenos (*A. Actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* e *P. micros*) após o tratamento periodontal. De acordo com Kinane e Chestnutt (2000), embora os fumantes também possam se beneficiar do tratamento, ainda que em menor grau, as falhas de tratamento tendem a predominar entre pacientes que possuem o hábito de fumar. Fumantes podem ter maiores profundidades de sondagem após a terapia periodontal do que os não-fumantes, e continuarão a abrigar mais bactérias patogênicas, tanto quantitativamente quanto qualitativamente. Em associação, as funções celulares dos fibroblastos, PMN e células epiteliais estão prejudicadas, além

de haver resposta de defesa do hospedeiro e vascularização reduzidas. Essas alterações nos tecidos de fumantes podem justificar as diferenças na resposta ao tratamento.

Embora um efeito adicional da TFDa pudesse ser esperado mesmo em situações clínicas mais desafiadoras, como em fumantes, alguns estudos não foram capazes de mostrar melhoras nos parâmetros microbiológicos quando TFDa foi aplicada. Em um estudo com 58 indivíduos com periodontite crônica, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* foram avaliados por análise de DNA após o tratamento periodontal. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle (somente raspagem ultrasônica subgengival) e o grupo teste (adicionalmente tratado com TFDa) (Polansky *et al.*, 2009). Da mesma forma, em outro estudo que avaliou 24 pacientes com periodontite crônica, não houve diferenças significativas entre RAR somente e RAR + TFDa em relação às alterações microbiológicas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micra*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens* e *Capnocytophaga*) (Christodoulides *et al.*, 2008). Ruhling *et al.* (2010) concluíram que a TFDa não foi superior ao tratamento mecânico convencional em sítios que não responderam bem ao tratamento inicial, depois de analisar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, e *P. Intermedia* por meio de PCR. Além disso, uma publicação recente da Academia Americana de Periodontologia concluiu que as evidências atuais mostram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), quer como monoterapia ou adjuvante à RAR, parece ser imprevisível e inconsistente em sua capacidade de reduzir as cargas microbianas subgengivais além do que já é alcançado com a RAR ou, na melhor das hipóteses, que as evidências são insuficientes ou conflitantes (AAP, 2011).

Muitos fatores podem alterar os resultados esperados do tratamento periodontal com TFDa. Várias condições tais como a concentração da droga, o período de retenção do fármaco no interior do tecido, o tempo de resposta biológica, o pH tecidual, a presença de exsudatos e fluido gengival e o modo de aplicação de drogas podem influenciar a resposta biológica para TFDa (Ruhling *et al.*, 2010). Verificou-se que apenas fotossensibilizadores catiônicos ou não-catiônicos associados a estratégias capazes tornar a barreira de bactérias Gram-negativas permeável podem levar à morte de espécies Gram-negativas. Corantes à base de fenotiazina, como o aplicado no presente estudo, são naturalmente catiônicos e têm sido largamente utilizados em TFDa para inativar uma grande variedade de microrganismos Gram-positivos, bactérias Gram-negativas e também células fúngicas (Dai *et al.*, 2009; Jori *et al.*, 2006). O comprimento de onda do laser pode ser relacionado com o dano teciduais colaterais: em geral, os lasers de comprimento de onda mais curtos, tais como laser de diodo com um comprimento de onda de 660 nm (utilizado neste estudo) penetram mais profundamente na tecidos moles. A extensão da penetração no tecido por comprimentos de onda mais curtos está relacionada com a sua afinidade com tecidos pigmentados e um coeficiente de absorção baixo em água. Assim, as características do laser e do fotossensibilizador estavam de acordo com evidências observadas na literatura e com as instruções dos fabricantes. Mesmo que não tenha sido demonstrado neste estudo, o conceito da TFDa é plausível e pode promover novos protocolos terapêuticos no tratamento de doenças periodontais. O conhecimento disponível até o momento justifica o investimento em novas pesquisas para estudar seus efeitos (Ruhling *et al.*, 2010). Pode-se sugerir que modificações no protocolo clínico aplicado possam conduzir a mudanças microbiológicas estatisticamente significantes. Neste estudo, uma única

aplicação de TFDa foi realizada e estudos futuros são necessários para elucidar definitivamente se múltiplas aplicações de TFDa podem melhorar o resultado da terapia.

6 Conclusão

6 Conclusão

- Neste estudo, o efeito adjuvante da TFDa em aplicação única não levou a melhores resultados clínicos (redução de profundidade de sondagem e ganho no nível clínico de inserção) em pacientes fumantes portadores de doença periodontal crônica, 4 e 12 semanas após a terapia periodontal básica, quando comparado com a RAR somente.
- A TFDa em aplicação única associada à terapia periodontal não-cirúrgica foi capaz de reduzir a concentração de IL-1 β no fluido crevicular gengival uma semana após o tratamento e de MMP-8 doze semanas após o tratamento, sugerindo um possível efeito positivo da TFDa na cicatrização periodontal.
- O efeito da TFDa em aplicação única associada à terapia periodontal não-cirúrgica também não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de bactérias presentes em amostras do biofilme subgengival analisadas 1, 4 e 12 semanas após o tratamento.

Referências Bibliográficas

Al-Zahrani MS, Austah ON. Photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing in treatment of chronic periodontitis in smokers. *Saudi Medical Journal*. 2011;32(11):1183-8.

American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2011;82(4):513-4.

Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *The Journal of Clinical Dentistry*. 2007;18(2):34-8.

Angaji M, Gelskey S, Nogueira-Filho G, Brothwell D. A systematic review of clinical efficacy of adjunctive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2010;81(11):1518-28.

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

Bostrom L, Linder LE, Bergstrom J. Smoking and cervicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999;26(6):352-7.

Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *Journal of Periodontology*. 2009;80(11):1790-8.

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(10):877-84.

Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38 Suppl 11:85-105.

Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou C, Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science*. 2011.

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

Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*. 2000;27(5):366-9.

Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rossler 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 in Medical Science*. 2009;24(5):681-8.

- Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rossler R, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*. 2008;79(9):1638-44.
- Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2009;6(3-4):170-88.
- Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005;32(2):200-6.
- Drisko, CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology 2000*. 2001; 25: 77-88
- Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Archives of Oral Biology*. 1992;37(11):883-7.
- Engelbreton SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2002;29(1):48-53.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*. 1983;132(1):6-13.
- Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1999;4(1):32-8.
- Fontana CR, Abernethy AD, Som S, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of Periodontal Research* 2009;44:751-759.
- Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of Periodontology*. 2000;71(10):1535-45.
- Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, et al. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2011;29(1):33-7.
- Giannopoulou C, Cappuyns I, Cancela J, Cionca N, Mombelli A. Effect of Photodynamic Therapy, Diode Laser and Deep Scaling on Cytokine and Acute-Phase Protein Levels in Gingival Crevicular Fluid of Residual Periodontal Pockets. *Journal of Periodontology*. 2011.
- Goulart RC, Bolean M, Paulino TP, Thedei G, Jr., Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010;28 Suppl 1:S53-60.
- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*. 1997;24(10):767-76.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *Journal of clinical periodontology*. 2001;28(5):377-88.

Hernandez M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mantyla P, Rivera O, Dezerega A, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *Journal of Periodontology*. 2010;81(11):1644-52.

Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2004;31(6):475-82.

Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *Journal of Periodontology*. 2004;75(2):196-209.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2006;38(5):468-81.

Keles GC, Cetinkaya BO, Isildak I, Koprulu H, Acikgoz G. Levels of platelet activating factor in gingival crevice fluid following periodontal surgical therapy. *Journal of Periodontal Research*. 2006;41(6):513-8.

Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists. 2000;11(3):356-65.

Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(3):932-40.

Kraft-Neumarker M, Lorenz K, Koch R, Hoffmann T, Mantyla P, Sorsa T, et al. Full-mouth profile of active MMP-8 in periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*. 2012;47(1):121-8.

Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 2011;46(1):89-96.

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

Machion L, Andia DC, Saito D, Klein MI, Goncalves RB, Casati MZ, et al. Microbiological changes with the use of locally delivered doxycycline in the periodontal treatment of smokers. *Journal of Periodontology*. 2004;75(12):1600-4.

Machuca G, Rosales I, Lacalle JR, Machuca C, Bullon P. Effect of cigarette smoking on periodontal status of healthy young adults. *Journal of Periodontology*. 2000;71(1):73-8.

Mantyla P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 2003;38(4):436-9.

Miller CS, King CP, Jr., Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *Journal of the American Dental Association*. 2006;137(3):322-9.

Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *Journal of Periodontology*. 2009;80(1):98-105.

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

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005;32 Suppl 6:180-95.

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

Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38 Suppl 11:60-84.

Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2008;43(2):162-7.

Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikoski PV, Sorsa T, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2010;81(2):251-9.

Ruhling A, Fanghanel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, et al. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. *Clinical Oral Investigations*. 2010;14(6):637-44.

Sampaio E. Azitromicina no tratamento da periodontite crônica - acompanhamento clínico e microbiológico em 06 meses. 2009. Dissertação de Mestrado - Universidade de Garulhos, Garulhos. 2009.

Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 1993;28(3):204-10.

- Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A, Holletschke A, Pfister W, Schutze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *Journal of Periodontology*. 2010;81(7):975-81.
- Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. *Journal of Periodontology*. 2004;75(11):1553-65.
- Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*. 1989;4(1):41-6.
- Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*. 2004;10(6):311-8.
- Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):143-66.
- Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology 2000*. 2009;51:109-40.
- Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers in Medical Science*. 2011.
- Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *Journal of Periodontal Research*. 2010;45(1):148-52.
- Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38(3):219-28.
- Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, et al. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of Clinical Periodontology*. 2003;30(7):603-10.
- van Winkelhoff AJ, Winkel EG. Antibiotics in periodontics: right or wrong? *Journal of Periodontology*. 2009;80(10):1555-8.
- Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2002;30(1):60-6.

Artigo I em Inglês

Artigo I em Inglês

TITLE PAGE

Adjunctive effect of photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial

Adriana C. Queiroz, MsC, Professor of Periodontology*, PhD student of Periodontology[†]

Flávia Adelino Suaid, MsC, PhD[†]

Fabíola S. Oliveira, PhD, Laboratory Technician[†]

Arthur B. Novaes Jr., PhD, Chairman of Periodontology[†]

Mário Taba Jr., PhD, Professor of Periodontology^{†h}

Daniela B. Palioto, PhD, Professor Periodontology[†]

Márcio F.M. Grisi, PhD, Professor of Periodontology[†]

Sérgio L.S. Souza, PhD, Professor of Periodontology[†]

*School of Dentistry, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

[†]Department of Buco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Address for correspondence and reprints:

Sérgio Luís Scombatti de Souza

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP)

Departamento de CTBMF e Periodontia, Av. do Café, s/n, 14040-904. Ribeirão

Preto, SP, Brazil.

Fax number:

E-mail: scombati@forp.usp.br

The fax number and e-mail can be published

Sources of support: This study was supported by grants from São Paulo State Research Foundation (FAPESP Grant 2009/15845-0), Brazilian Foundation for the Improvement of Higher Education (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Grant 302888/2010-1).

Word count and number of figures and tables in the manuscript: 3,180 words and 3 tables.

Running title: Adjunctive effect of photodynamic therapy in smokers.

Key finding: The present study failed to demonstrate that the adjunctive effect of a single episode of PDT to SRP in smokers was able to improve PD reduction and CAL gain 4 and 12 weeks after periodontal treatment. However, it resulted in a significantly suppression of IL-1 β 1 week after periodontal treatment and of MMP-8 12 weeks after periodontal treatment.

ABSTRACT

Background: Smoking is an important risk factor for the severity of chronic periodontitis (CP). Therefore, the adjunctive effect of photodynamic therapy (PDT) to scaling and root planning (SRP) could be advantageous in smokers. The aim of this study was to investigate the effects of adjunctive PDT on nonsurgical periodontal treatment in smokers with CP.

Methods: Twenty smokers with CP had two contralateral teeth randomly assigned in a split-mouth design to receive SRP (CG) or SRP + a single episode of PDT (TG), with a diode laser and a phenothiazine photosensitizer. Plaque Index (PI), bleeding on probing (BoP), probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and gingival recession (GR) were recorded at baseline, 4 and 12 weeks after the treatment. Gingival crevicular fluid was collected for assay of IL-1 β and MMP-8 levels at baseline, 1, 4 and 12 weeks after treatment.

Results: There was a significant probing pocket depth reduction (TG=1.81 $\pm$ 0.52 mm /CG=1.58 $\pm$ 1.28 mm; p <0.001) and a significant clinical attachment level gain (TG=1.60 $\pm$ 0.92 mm/CG=1.41 $\pm$ 1.58 mm; p <0.001) for both groups. Significant differences were not observed in between-group comparisons. IL-1 β level in GCF was higher in CG after 1 week (TG-24.65 $\pm$ 18.85 pg/ μ L/CG-34.07 $\pm$ 24.81 pg/ μ L; p =0.048) and MMP-8 level was higher in CG after 12 weeks (TG-303.31 $\pm$ 331.62 pg/ μ L/CG-534.23 $\pm$ 647.37 pg/ μ L; p =0.024). There were no statistically significant differences in intra-group comparisons.

Conclusion: The present study failed to demonstrate that the adjunctive effect of a single episode of PDT to SRP improves clinical parameters in smokers. However, it resulted in a significantly suppression of IL-1 β and of MMP-8, suggesting a possible advantage on periodontal healing.

Keywords: Chronic Periodontitis, Smoking, Periodontal Debridement, Photodynamic Therapy

Introduction

Chronic Periodontitis is an infectious disease resulted from the inflammation of supporting tissues of the teeth, as well as progressive attachment and bone loss. It is initiated and sustained by bacterial plaque and host defense mechanisms play an integral role in its pathogenesis.¹ The standard treatment for periodontitis remains highly unspecific and consists of mechanical debridement of affected root surfaces with the objective of reducing the total bacterial load and changing the environmental conditions of microbial niches.² Despite of good results, scaling and root planning (SRP) have limitations and some patients do not properly respond to this therapy. The outcome may depend on the patient's oral hygiene, furcation involvement, root anatomy and medical history, such as diabetes or smoking.³

Smoking is a highly significant risk factor for periodontitis. Smokers have a decreased immune response and exhibit compromised healing following both surgical and nonsurgical therapy, when compared to non-smokers or former smokers.⁴ Therefore, clinicians may recommend adjunctive antimicrobial therapy for smokers. Oral antibiotics are the most common approach for treating bacterial infections, although local infections can also be treated with topically administered antimicrobials.⁵ The development of bacterial resistance and the protection that an organized biofilm gives to periodontal pathogens, limiting the antibiotic action, have led to an effort to find alternative antibacterial therapeutic strategies, which could be important in the evolution of methods to control microbial growth in the oral cavity.^{6, 7}

Photodynamic therapy (PDT) combines low-level laser light with a nontoxic photo-activated dye (photosensitizer) binding to target cells. When photo-activated, photosensitizer is excited to its reactive triplet state and generates reactive oxygen species, which are toxic to the target cells.⁸ In vitro studies demonstrated that PDT treatment may improve periodontal treatment by increasing bacterial killing and, therefore, may provide a more favorable healing environment.⁹⁻¹² Clinical trials evaluated the effect of PDT in the treatment of periodontitis. The outcomes are controversial: in some of them, the addition of PDT to SRP have resulted in a statistically significant improvement in CAL and PD,¹³⁻¹⁶ while in other studies there were no statistically significant differences between test and control groups for clinical parameters at follow-up examination.¹⁷⁻¹⁹

It has been speculated that some lasers may have beneficial biological effects and, so far, few controlled clinical trial has extensively evaluated local effects on inflammatory mediators in humans with periodontal disease.²⁰ Gingival crevicular fluid (GCF) in periodontitis subjects contains inflammatory cells, serum proteins, bacteria, tissue breakdown products, enzymes, antibodies, complement, and numerous inflammatory mediators. Collection of GCF is relatively non-invasive, making it a convenient tool to evaluate markers of periodontal inflammation. The magnitude of inflammation can be determined by measuring proinflammatory and immuno-regulatory cytokines and chemokines in the GCF.²¹ Interleukin-1 (IL-1) has been the most studied cytokine, and IL-1 β has a major role in the pathogenesis of periodontal disease, on account of being consistently detected at increased levels in gingiva biopsy samples and GCF in periodontitis patients.²²

Other molecules frequently present on GCF are MMPs, which are a family of structurally related but genetically distinct enzymes that can degrade extracellular matrix and basement membrane components, involved in physiological processes such as tissue development, remodeling and wound healing and with evident roles in tissue degenerative diseases. MMP-8 is one of the major collagenases in periodontitis.²³ Therefore, these molecules could act as diagnostic markers to complement the evaluation after periodontal treatment.

Since cigarette smoking is the strongest behavioral risk factor for the incidence and progression of periodontitis and periodontal treatment of smokers is more challenging, the aim of this study was to evaluate the adjunctive effect of PDT in smokers with chronic periodontitis, analyzing clinical parameters and biomarkers gingival crevicular fluid (GCF) concentrations.

Material and Methods

Study Population

23 smokers with chronic periodontitis, who were referred for periodontal treatment to the Department of Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo were included in the study after having signed an informed consent. The entry criteria for patients were as follows: (i) Chronic periodontitis

(according to the criteria of 1999 International Workshop for the Classification of Periodontal Diseases and Conditions), presenting bilaterally at least two sites with probing depth (PD) of 5 mm or more; (ii) at least 20 teeth; (iii) smokers (who smoked ten or more cigarettes a day during at least five years); (iv) and good general health. Subjects were excluded if they: (i) were considered to have a diagnosis of aggressive periodontitis; (ii) were pregnant or lactating females; (iii) suffered from any other systemic diseases; (iv) were taking long-term anti-inflammatory drugs; (v) had received periodontal treatment within the last 6 months. The study was approved by the Institution's Human Research Committee (protocol number 2009.1.588.58.0, approved on June 25, 2009).

The calculation of sample size was performed considering PD reduction as the primary outcome variable and assuming the minimum variation to detect differences between treatments of 1 mm in PD and a standard deviation of 1 mm (based on previously reported data.^{17, 18, 24} The test indicated that, for a power of 0.8, the sample size should be of 17 subjects.

Clinical Parameters

The following clinical parameters were assessed at baseline and at 4 and 12 weeks after periodontal treatment by the same blind calibrated examiner: Plaque index (PI); Bleeding on probe (BOP); gingival recession (GR); probing depth (PD); and relative clinical attachment level (CAL). An automated periodontal probe* and an acrylic stent with reference marks to determine the exact site of measurement were used. Five patients, each showing two pairs of contralateral single-rooted teeth with PDs > 5 mm on at least one aspect of each tooth, were examined to calibrate the examiner. The examiner evaluated the patients on two separate occasions 48 hours apart. Calibration was accepted when measurements at baseline and after 48 hours were similar to the millimeter at 90% level.²⁵

* Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA.

Study Design

The study had a split-mouth design. 20 pairs of contralateral teeth were included (18 incisors, 12 canines, and 10 premolars); each subject had just one pair of teeth analyzed and each tooth exhibited probing depth of 5 mm on at least two sites. One tooth in each contralateral pair was randomly treated with sub gingival SRP using hand and ultrasonic instruments (control group-CG); the other was treated with SRP associated with PDT (test group-TG). The same experienced periodontist treated all patients. A computer-generated random number table was used as randomization method.

Oral Hygiene Program

Fourteen days before treatment, all patients were enrolled in a hygiene program according to individual needs and received oral hygiene instructions. Supragingival plaque retention factors were removed and supragingival professional tooth cleaning was performed 7 days before baseline.

Periodontal treatment

Mechanical supra and subgingival instrumentation were conducted under local anesthesia using Gracey curets[†] and ultrasonic instrument[‡]. For the PDT group, a diode laser[§] with a wavelength of 660 nm and a maximum power of 60 mW/cm² was used with a phenothiazine photosensitizer^{||} in a concentration of 10 mg/ml. The photosensitizer was applied at the bottom of the periodontal pocket: it was deposited continuously in a coronal direction for 1 minute, followed by copious irrigation with distilled water to remove any excess. The pocket was exposed to the laser light using the fiber optic applicator[¶], with a diameter of 0.6 mm, for 10 seconds. The treatment was done in six sites per tooth (Oliveira et al. 2009).²⁶

[†] Hu-Friedy instruments, Chicago, IL, USA.

[‡] Cavitron Select, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA.

[§] Minilaser 2075F, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria.

^{||} Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria.

[¶] Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria.

GCF Sampling Method

In order to evaluate biomarkers concentrations throughout the study, gingival crevicular fluid (GCF) was sampled from the selected sites at baseline and 7, 30 and 90 days after periodontal treatment. Briefly, teeth were air-dried and isolated with cotton rolls, supragingival biofilm was removed and paper strips[#] were placed in the sulcus for 30 seconds. Eight paper strips were collected per site and strips contaminated by blood and/or saliva were discarded. Periotron 8000^{**} was used to determine the amount of GCF by converting periotron units to an actual volume (µl) by reference to a standard curve applying a forth-order polynomial regression. The paper strips were placed on sterile Eppendorf tubes and stored at -80°C until the assays.

Biomarkers quantification

On the day of the analysis, the strips of each site were eluted in 500 µl phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20^{††} and 1 µl of protease inhibitor cocktail^{‡‡}. The tubes were shaken for 30 min and centrifuged at 10000 rpm for 5 min. The supernatant was divided into aliquots for the determination of each biochemical compound. The presence of biomarkers (IL-1β and MMP-8) in the gingival crevicular fluid samples was determined using commercial enzymelinked immunosorbent assay kits^{§§}, in accordance to the manufacturer's instructions. Concentrations of the biomarkers in each sample were determined by generation of a standard curve for comparison. Concentrations were corrected for GCF volume and were defined as pg/µL.

Statistical analysis

Data were recorded as mean ± standard deviation for clinical parameters and biomarkers quantification. The experimental unit was the subject (n=20). Data were

[#] Periopaper, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA.

^{**} Oraflow Inc., Plainview, NY, USA.

^{††} USB Corpo., Cleveland, OH, USA.

^{‡‡} Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA.

^{§§} Human IL-1 beta Quantikine HS ELISA Kit (HSLB00C)/Human Total MMP-8 Quantikine ELISA Kit MMP-8 (DMP800), R&D Systems, Minneapolis, MN, USA.

tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test), and non-parametric paired tests were used. Friedman test was applied for intra-group analysis, and if this test showed a high significance, the paired comparisons were made using Tukey test. Intergroup comparison was accomplished using Wilcoxon test. The statistical significance was determined at the 0.05 level and specific software was used^{||}.

Results

20 subjects (age range 35 to 55 years; mean age 46.05 ± 6.38 years; 9 male and 11 female) out of 23 completed the study (Table 1). Two subjects had to take antibiotics for medical reasons and one had to move town. PI was significantly reduced from $75 \pm 22\%$ at baseline to $25 \pm 8\%$ after 4 weeks and $31 \pm 12\%$ after 12 weeks ($p < 0.001$). BoP of evaluated sites was recorded. 100% of the sites presented bleeding on probing at baseline. For TG, BoP was significantly reduced to $20 \pm 41\%$ after 4 weeks and to $22 \pm 43\%$ after 12 weeks ($p < 0.001$). For CG, it was significantly reduced to $30 \pm 47\%$ after 4 weeks and to $22 \pm 43\%$ after 12 weeks ($p < 0.001$). Periodontal treatment was able to improve clinical parameters for both groups after 1 month. There was a significant PD reduction and CAL gain for CG and TG (Table 2). Statistical differences between groups were not observed. These outcomes were maintained after 3 months. The quantification of biomarkers is described on Table 3. In the intragroup analysis, statistically significant differences were not observed at any time point for both groups. The intergroup analysis reveals that CG presented a significantly higher IL-1 β concentration at 1-week examination and a significantly higher MMP-8 concentration at 12-weeks examination.

Discussion

In this study, statistically significant improvements of all the clinical parameters evaluated were observed in both treatments 12 weeks after periodontal therapy. These results were expected, since mechanical therapy has proven to be efficient, even though smoking presents a negative effect on probing depth reduction and

^{||} SigmaStat for Windows, version 3.5, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA.

clinical attachment level improvements.⁵ The poorer response of smokers to therapy is probably the result of the general effect of smoking on the host, which compromises the response to periodontal treatment.³ Thus, adjunctive methods to augment the effect and enhance the outcome of non-surgical periodontal treatment in smokers could be advantageous.²⁷ In this study, PDT failed in demonstrating additional clinical benefits when associated with SRP in smokers. Intergroup comparison showed no significant clinical differences between sites treated with SRP alone and those treated with SRP+PDT. Regarding the effect of PDT in smokers, a comparison with other studies is difficult to be made, since many of them included both smokers and non-smokers in groups and the results reported were not stratified according to smoking status,^{13, 17-19} and in others, smokers were excluded from the experiments.^{15, 28-30}

One clinical trial that evaluated the efficacy of the adjunctive effect of PDT associated with SRP in smokers: Al-Zahrani and Austah²⁷ conducted a split-mouth, single-masked randomized controlled clinical trial in moderate to severe smokers. In each patient, at least one tooth was randomly assigned to SRP plus PDT (test group) and the contra-lateral tooth was assigned to SRP only (control group). 3 months after the periodontal treatment, there was a statistically significant improvement in PD, CAL, BOP, and PI in both groups and a statistically significant greater reduction in PD and CAL in the test when compared to control group. Similar methods were used in the present study, with a single diode laser application, even though the authors of the previous study did not specify for how long the sites were irradiated. In the previous study, a methylene blue photosensitizer (Ondine's Periowave) was applied instead of the phenothiazine photosensitizer used in our protocol. According to a recent systematic review, it is difficult to state whether different photosensitizers could influence clinical outcomes, since no comparative data are available to define the most effective photosensitizer.³¹ Another consideration is about the observational unit: in the earlier research, 17 patients were enrolled, but 7 patients contributed with 4 teeth each and 10 patients contributed with 2 teeth each, resulting in a total number of 121 periodontal sites, which were the experimental unit (n=64 sites for SRP group and n=57 sites for PDT group). Using the site as experimental unit made it easier to detect statistical differences; in our study, it was avoided to analyze more than a pair

of teeth of each patient, since they could be considered dependent, and the patient was the experimental unit.

Despite some other reports observed a positive adjunctive effect to SRP in treatment of patients with periodontal disease,^{13-16, 29} other clinical studies^{8, 17-19, 30, 32, 33} could not demonstrate clinical differences between SRP alone and SRP+PDT. A systematic review showed that PDT as an adjunct to SRP was not superior to control treatment of SRP even though it does not mean that the findings reported indicate that PDT is not efficacious.²⁴ As the majority of previous reports,^{8, 15, 17-19, 30, 32} in the current research, only one application of PDT was used. Since SRP alone can achieve good clinical results, it is possible that the positive effects of a single-episode of PDT are not sufficient to provide additional improvements with clinical relevance.

It is known that bacterial products stimulate cells to secrete many molecules, such as proinflammatory and immune-regulatory cytokines growth factors, chemokines, lymphokines and collagenases.^{34, 35} Periodontal disease is associated with increased levels in GCF of a variety of molecules involved in inflammatory and immune responses, as well as markers reflecting tissue destruction.³⁶ Therefore, GCF is generally considered to reflect inflammation, turnover of connective tissue and resorption of alveolar bone in the surrounding periodontal tissues.³⁷ In the present study, the GCF concentrations of IL-1 β e MMP-8 were verified at baseline and 1, 4 and 12 weeks after periodontal treatment. The intragroup analysis showed no statistical significant differences, while CG presented a statistically significant higher concentration of IL-1 β after 1 week and of MMP-8 after 12 weeks when compared to TG.

The lack of significant reduction in biomarkers levels after treatment is surprising, since previous studies have shown that SRP is able to suppress IL-1 β and MMP-8 levels.^{35, 36, 38-41} It is well accepted that smoking alters the host response, including vascular function, neutrophil/monocyte activities, adhesion molecule expression, antibody production, as well as cytokine and inflammatory mediators release.²¹ The expression of 22 chemokines and cytokines in gingival crevicular fluid (GCF) from smokers and non-smokers with periodontitis and periodontally healthy control subjects were compared and it has demonstrated that smokers present higher level of IL-1 β (even when healthy sites of smokers are compared with healthy sites of

non-smokers), and that non-smokers present more intra-group differences between healthy and diseased sites than smokers.²¹ Mantyla et al.⁴² found that the decrease of MMP-8 concentrations after treatment was not statistically significant in smokers' sites, only in non-smokers. Therefore, the negative influence of smoking, which impairs normal host responses, might have made it difficult to verify significant differences in IL-1 β and MMP-8 concentration at intragroup comparisons.

The ability of PDT to inactivate host-derived inflammatory cytokines found in periodontally diseased sites was tested *in vitro*. It was found that complete IL-1 β inactivation occurred when the cytokines were exposed to a 60-second PDT treatment, while it was not significantly inactivated by treatment with the photosensitizer alone or light alone,⁹ which could explain the significant higher level of IL-1 β in CG than in TG at one week examination. This finding is also in line with a study that clinically evaluated the adjunctive effect of PDT in twenty-four nonsmoking adults with untreated chronic periodontitis, assigned in a split-mouth design to receive SRP with or without one course of adjunctive photodynamic therapy,¹⁵ that also observed significant lower level of IL-1 β in the SRP +PDT group 1 week after the periodontal treatment.

GCF levels of IL-1 β and MMP-8 were also quantified by ELISA tests after SRP alone, SRP + a single episode of PDT and SRP + two episodes of PDT in 58 patients with chronic periodontitis.⁸ GCF samples were obtained before periodontal treatment, 6 weeks and 12 weeks after treatment. The results revealed that 12 weeks after treatment, gingival crevice fluid from patients with SRP and PDT treatment showed significant IL-1 β and MMP-8 suppression versus those with SRP alone. It is generally agreed that IL-1 is the major mediator of tissue destruction in periodontal disease and MMP-8 (collagenase-2) is known to be the main host cell-derived collagenase leading to periodontal tissue destruction as a result of the degradation of gingival and periodontal ligament collagen.^{43, 44} Thus, as MMP-8 and IL-1 β are potential biomarkers of periodontal disease,⁴⁵ lower concentrations of these molecules in GCF of sites treated with SRP +PDT can suggest that PDT provided an additional effect on periodontal healing. With regard to IL-1 β , data suggest that photodynamic therapy might have a beneficial effect in controlling periodontal inflammation during the early healing period, which corroborates a previous study.¹⁵ On the other hand, it has been already described that high MMP-8 levels after SRP and during maintenance phase

shows a risk of further loss of periodontal support.^{46, 47} Based on MMP-8 outcomes, it can be speculated that PDT was able to provide a more stable result, since control sites showed a higher concentration of MMP-8 after 12 weeks, suggesting possible active tissue destruction or high risk for future destruction.

Conclusion

The present study showed that the adjunctive effect of a single episode of PDT to SRP in smokers failed to demonstrate clinical improvements in terms of PD reduction and CAL gain 4 and 12 weeks after periodontal treatment. However, it resulted in a significantly higher suppression of IL-1 β 1 week after periodontal treatment and of MMP-8 12 weeks after periodontal treatment, suggesting a possible positive effect on periodontal healing.

Acknowledgments

This study was supported by grants from São Paulo State Research Foundation (FAPESP Grant 2009/15845-0), Brazilian Foundation for the Improvement of Higher Education (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Grant 302888/2010-1). The authors report no conflicts of interest related to this study.

References

1. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:32-38.
2. Angaji M, Gelskey S, Nogueira-Filho G, Brothwell D. A systematic review of clinical efficacy of adjunctive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. *Journal of periodontology* 2010;81:1518-1528.
3. Darby I. Non-surgical management of periodontal disease. *Australian dental journal* 2009;54 Suppl 1:S86-95.

4. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology 2000* 2001;25:77-88.
5. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *Journal of periodontology* 2004;75:196-209.
6. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000* 1997;14:12-32.
7. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000* 2011;55:143-166.
8. Ge L, Shu R, Li Y, et al. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomedicine and laser surgery* 2011;29:33-37.
9. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *Journal of periodontology* 2009;80:1790-1798.
10. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of periodontal research* 2009;44:751-759.
11. Goulart Rde C, Bolean M, Paulino Tde P, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomedicine and laser surgery* 2010;28 Suppl 1:S53-60.
12. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *Journal of periodontal research* 2008;43:162-167.
13. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *The Journal of clinical dentistry* 2007;18:34-38.
14. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:877-884.

15. Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Journal of periodontal research* 2011;46:89-96.
16. Lulic M, Leiggener Gorog I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2009;36:661-666.
17. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rossler 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 in medical science* 2009;24:681-688.
18. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 2008;79:1638-1644.
19. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2009;36:575-580.
20. Giannopoulou C, Cappuyns I, Cancela J, Cionca N, Mombelli A. Effect of Photodynamic Therapy, Diode Laser and Deep Scaling on Cytokine and Acute-Phase Protein Levels in Gingival Crevicular Fluid of Residual Periodontal Pockets. *Journal of periodontology* 2011.
21. Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2011;38:219-228.
22. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology* 2011;38 Suppl 11:60-84.
23. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral diseases* 2004;10:311-318.
24. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology* 2010;81:4-14.

25. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *Journal of periodontology* 2007;78:965-973.
26. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *Journal of periodontology* 2009;80:98-105.
27. Al-Zahrani MS, Austah ON. Photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing in treatment of chronic periodontitis in smokers. *Saudi medical journal* 2011;32:1183-1188.
28. Ruhling A, Fanghanel J, Houshmand M, et al. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. *Clinical oral investigations* 2010;14:637-644.
29. Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A, Holletschke A, Pfister W, Schutze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *Journal of periodontology* 2010;81:975-981.
30. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers in medical science* 2011.
31. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in medical science* 2011.
32. Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou C, Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers in medical science* 2011.
33. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers in surgery and medicine* 2002;30:60-66.
34. Bostrom L, Linder LE, Bergstrom J. Smoking and cervicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 1999;26:352-357.

35. Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2011;38 Suppl 11:85-105.
36. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2004;31:475-482.
37. Keles GC, Cetinkaya BO, Isildak I, Koprulu H, Acikgoz G. Levels of platelet activating factor in gingival crevice fluid following periodontal surgical therapy. *Journal of periodontal research* 2006;41:513-518.
38. Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *Journal of periodontal research* 2010;45:148-152.
39. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology* 2000;71:1535-1545.
40. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2002;29:48-53.
41. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology* 2000;27:366-369.
42. Mantyla P, Stenman M, Kinane DF, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *Journal of periodontal research* 2003;38:436-439.
43. Kraft-Neumarker M, Lorenz K, Koch R, et al. Full-mouth profile of active MMP-8 in periodontitis patients. *Journal of periodontal research* 2012;47:121-128.
44. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* 1997;14:216-248.

45. Miller CS, King CP, Jr., Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 2006;137:322-329.
46. Hernandez M, Gamonal J, Tervahartiala T, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *Journal of periodontology* 2010;81:1644-1652.
47. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *Journal of periodontology* 2010;81:251-259.

Table 1. Demographic Data for the Population

Baseline	
N	20
Age	46.05±6.38
Gender (Male/female)	9/11
Incisors	18
Canines	12
Premolars	10

Table 2. Clinical parameters at baseline and after 4 and 12 weeks (mean $\pm$ dp)

	Baseline	4 weeks	12 weeks	P value*	Change 0-4 weeks	Change 0-12 weeks
PD (mm)					PD reduction	PD reduction
Test	5.39 $\pm$ 0.74 ^a	3.52 $\pm$ 0.82 ^b	3.58 $\pm$ 1.05 ^b	<0.001 [†]	1.87 $\pm$ 0.69	1.81 $\pm$ 0.52
Control	5.35 $\pm$ 0.70 ^a	3.37 $\pm$ 0.98 ^b	3.77 $\pm$ 1.06 ^b	<0.001 [†]	1.98 $\pm$ 0.77	1.58 $\pm$ 1.28
P value[†]	0.854	0.580	0.734		0.490	0.258
CAL (mm)					CAL gain	CAL gain
Test	10.83 $\pm$ 1.45 ^a	9.01 $\pm$ 1.70 ^b	9.24 $\pm$ 1.91 ^b	<0.001 [†]	1.82 $\pm$ 1.22	1.60 $\pm$ 0.92
Control	11.12 $\pm$ 1.52 ^a	9.28 $\pm$ 1.60 ^b	9.72 $\pm$ 1.86 ^b	<0.001 [†]	1.85 $\pm$ 1.37	1.41 $\pm$ 1.58
P value[†]	0.284	0.275	0.083		0.729	0.709
GR (mm)					GR increase	
Test	0.24 $\pm$ 0.50	0.43 $\pm$ 0.68	0.53 $\pm$ 0.83	0.073	0.19 $\pm$ 0.36	0.29 $\pm$ 0.65
Control	0.26 $\pm$ 0.81	0.54 $\pm$ 1.03	0.48 $\pm$ 0.88	0.276	0.28 $\pm$ 0.79	0.20 $\pm$ 0.61
P value[†]	0.813	0.734	0.688		0.688	0.547

* Friedman Test (intragroup comparisons)

[†] Wilcoxon Signed Ranks Test (between-groups comparisons)^{a, b} Tukey Test-different letters represent statistically significant differences[†] Statistically significant different (p<0.05)

Table 3. GCF IL-1 β and MMP-8 concentrations at baseline and after 1, 4 and 12 weeks (mean $\pm$ dp)

	Baseline	1 week	4 weeks	12 weeks	P value*
IL-1β					
Test	32.84 $\pm$ 29.72	24.65 $\pm$ 18.85	24.86 $\pm$ 25.29	28.16 $\pm$ 24.54	0.603
Control	25.45 $\pm$ 17.82	34.07 $\pm$ 24.81	27.18 $\pm$ 20.82	27.69 $\pm$ 26.31	0.087
P value[†]	0.784	0.048 [‡]	0.622	0.898	
MMP-8					
Test	245.75 $\pm$ 207.52	284.39 $\pm$ 260.91	250.82 $\pm$ 215.92	303.31 $\pm$ 331.62	0.420
Control	238.15 $\pm$ 274.59	307.90 $\pm$ 301.12	257.15 $\pm$ 273.40	534.23 $\pm$ 647.37	0.090
P value[†]	0.409	0.729	0.869	0.024 [‡]	

* Friedman Test (intragroup comparisons)

[†] Wilcoxon Signed Ranks Test (between-groups comparisons)

[‡] Statistically significant different (p<0.05)

Artigo II em Inglês

Artigo II em Inglês

TITLE PAGE

Antimicrobial photodynamic therapy associated to nonsurgical periodontal treatment in smokers: microbiological results

Adriana C. Queiroz, MSc^{1,2}

Flávia Adelino Suaid, PhD²

Patrícia Freitas de Andrade, PhD²

Arthur B. Novaes Jr., PhD²

Mário Taba Jr, PhD²

Daniela B. Palioto, PhD²

Márcio F.M. Grisi, PhD²

Sérgio L.S. Souza, PhD²

¹School of Dentistry, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil 69025 050

²Department of Buco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil 14040-904

Address for correspondence:

Sérgio Luís Scombatti de Souza

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP)

Departamento de CTBMF e Periodontia, Av. do Café, s/n, 14040-904. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Fax number: +55 16 36024135

E-mail: scombati@forp.usp.br

Sources of support: This study was supported by grants from São Paulo State Research Foundation (FAPESP Grant 2009/15845-0), Brazilian Foundation for the Improvement of Higher Education (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Grant 302888/2010-1).

Keywords: Chronic Periodontitis, Smoking, Periodontal Debridement, Photodynamic Therapy, DNA Probes

ABSTRACT

Background and objective: Studies suggest a trend for smokers in harboring more or greater numbers of potential periodontal pathogens than non-smokers. Therefore, the adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) to scaling and root planning (SRP) could be advantageous in smokers. The aim of this study was to investigate the microbiologic effects of adjunctive aPDT on nonsurgical periodontal treatment in smokers with chronic periodontitis (CP).

Material and Methods: Twenty smokers with CP had two contralateral teeth randomly assigned in a split-mouth design to receive SRP (CG) or SRP + a single episode of aPDT (TG), with a diode laser and a phenothiazine photosensitizer. Levels of 40 subgingival species were measured using checkerboard DNA-DNA hybridization at baseline and 1, 4 and 12 weeks after periodontal treatment.

Results: All 40 bacterial species evaluated were detected in different levels at baseline, with no statistic significant differences between groups. After periodontal treatment, the levels of some bacterial species decreased, while some other species presented an increase. Despite this variation, the statistical analysis was not able to identify significant differences neither at intragroup nor at intergroup comparisons.

Conclusion: In the present study, periodontal treatment with SRP or SRP + aPDT was not able to reduce levels of 40 subgingival species in smokers with CP. These outcomes indicate that smoking impairs periodontal pocket decontamination after nonsurgical treatment.

Introduction

Tobacco smoking, mostly in the form of cigarette smoking, is recognized as the most important environmental risk factor for periodontitis (1). Numerous cross-sectional studies focusing the effect of smoking on periodontal health have been reported, with odds ratios generally in the order of 2 to 6 (2). Many factors contribute to the deleterious periodontal effects of smoking, including alterations in both microbial composition and local host response. Systemic innate and immune responses are impacted by smoking, and tobacco components have toxic effects for local cell populations (3). There are a number of studies that suggest that smokers have a tendency in harboring greater numbers of potential periodontal pathogens than non-smokers without increasing the amount of plaque. This undoubtedly supports the hypothesis that a significantly different subgingival environment in smokers, related to an altered immune response, should result in a different microflora (1). The prevalence (% of sites colonized) of several orange and red complex species is significantly greater in smokers when compared to former smokers or to individuals who had never smoked (4).

Literature also suggests that periodontal treatment outcome in smokers is less favorable than in non-smokers (2). Studies show that probing depth reduction and clinical attachment level improvements in smokers are 50% to 75% of those obtained by non-smokers following non-surgical and surgical periodontal therapy (3). It has been demonstrated that *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola* prevalence decreased significantly post scaling and root planing (SRP) in never and past smokers, but increased in current smokers (5). Therefore, adjunctive methods associated with the mechanical removal of biofilm, which is currently the most frequently used method of periodontal disease treatment, can be proposed to treat smokers with periodontitis. Smoking is among the factors that make some patients prime candidates for adjunctive systemic antimicrobial therapy (6). Despite some good results, systemic antibiotic therapy presents some disadvantages, including several biofilm's resistance mechanisms, inability of systemic drugs to achieve a therapeutic concentration in the gingival crevice fluid, an increased risk of adverse drug reactions, increased selection of multiple antibiotic resistant microorganisms and uncertain patient compliance (7,8).

A noninvasive photochemical approach for infection control, namely antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), which combines the application of a nontoxic chemical agent (photosensitizer) with low-level energy light, has received much attention in the treatment of oral diseases (9). The bactericidal effect of aPDT is based upon the preferential binding of the photosensitizer to the bacterial cell surface. The photosensitizer molecule absorbs light and generates highly reactive O₂ species, in particular, singlet ¹O₂, that can damage a wide variety of proteins, lipids and carbohydrates. Singlet ¹O₂ has a very short half-life and, therefore, its destructive radius is small, resulting in photoreactive effects only in very close proximity to where the photosensitizer compound is located. This localized reaction, and the fact that bacterial cells are not equipped with the same ability to expel reactive oxygen compounds such as eukaryotic cells, makes aPDT highly bactericidal with little damage to the surrounding tissue. The simultaneous inactivation of bacterial protease is likely due to the fact that protease is closely associated with the bacterial cell wall (10).

In vitro studies have demonstrated that aPDT increases bacterial killing (10-13). Clinical trials evaluated the effect of aPDT in the treatment of periodontitis. Association of aPDT to SRP significantly reduced the percentage of sites positive for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *T. forsythia* at 180 days when compared to SRP treatment alone (14). Another study showed statistically significant reductions of *F. nucleatum* and *E. nodatum* at 3 months and *E. corrodens* and *Capnocytophaga* species at 6 months after treatment with aPDT (15), while it was also observed a significant difference in the DNA quantity of *F. nucleatum* between the aPDT and control groups 12 weeks after treatment (16).

Therefore, since previous studies show a potential microbiologic effect of aPDT, the aim of the present study is to evaluate the effects of the nonsurgical periodontal treatment (SRP) associated with aPDT in the reduction of specific subgingival periodontopathogens in smokers with chronic periodontitis, when compared to SRP alone.

Material and Methods

Study Population

23 smokers with chronic periodontitis, who were referred for periodontal treatment in the Department of Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto,

University of São Paulo were included in the study after having signed an informed consent. The entry criteria for patients were as follows: (i) Chronic periodontitis (according to the criteria of the 1999 International Workshop for the Classification of Periodontal Diseases and Conditions), presenting bilaterally at least two sites with probing depth (PD) of 5 mm or more; (ii) at least 20 teeth present; (iii) smokers (who smoked ten or more cigarettes a day during at least five years); (iv) and good general health. Subjects were excluded if they: (i) have a diagnosis of aggressive periodontitis; (ii) were pregnant or lactating females; (iii) suffered from any systemic diseases; (iv) were taking long-term anti-inflammatory drugs; (v) had received periodontal treatment within the last 6 months. The study was approved by the Institution's Human Research Committee (protocol number 2009.1.588.58.0, approved on June 25, 2009).

Study Design

The study had a split-mouth design. 20 pairs of contralateral teeth were included (18 incisors, 12 canines, and 10 premolars); each subject had just one pair of teeth analyzed and each tooth exhibited probing depth of 5 mm on at least two sites. One tooth in each contralateral pair was randomly treated with subgingival SRP using hand and ultrasonic instruments (control group); the other was treated with SRP associated with PDT (test group). The same experienced periodontist treated all patients. A computer-generated random number table was used as randomization method.

Oral Hygiene Program

Fourteen days before treatment, all patients were enrolled in a hygiene program according to individual needs and received oral hygiene instructions. Supragingival plaque retention factors were removed and Supragingival professional tooth cleaning was performed 7 days before baseline.

Periodontal treatment

Mechanical supra and subgingival instrumentation were conducted under local anesthesia using Gracey curets (Hu-Friedy instruments, Chicago, IL, USA) and ultrasonic instrument (Cavitron Select, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA). For the PDT group, a diode laser (Minilaser 2075F, Helbo Photodynamic Systems,

Grieskirchen, Austria) with a wavelength of 660 nm and a maximum power of 60 mW/cm² was used with a phenothiazine photosensitizer (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria) in a concentration of 10 mg/ml. The photosensitizer was applied at the bottom of the periodontal pocket: it was deposited continuously in a coronal direction for 1 minute, followed by copious irrigation with saline solution to remove any excess. The pocket was exposed to the laser light using an 8.5-cm-long flexible fiber optic tip (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria), with a diameter of 0.6 mm, for 10 seconds. The treatment was done in six sites per tooth (17).

Collection of plaque samples and Checkerboard DNA–DNA hybridization

Subgingival plaque samples were taken at baseline and at 1, 4 and 12 weeks post-therapy from the contralateral selected sites, which presented PD of at least 5 mm before treatment. Briefly, after removal of supragingival biofilm, subgingival biofilm samples were taken using individual sterile curettes (mini-Gracey curettes #11–12) from the selected site and placed into separate microtubes containing 0.15 mL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6). Immediately after, 0.15 mL of 0.5 M NaOH was added to each sample. The microtubes were stored at -80 °C. Counts of 40 subgingival species were determined in each biofilm sample using the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. The samples were boiled for 10 minutes and neutralized using 0.8 mL of 5 M ammonium acetate. The released DNA was placed into the extended slots of a Minislot 30 apparatus (Immunetics, Cambridge, MA, USA) concentrated onto a positively charged nylon membrane (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA) and fixed to the membrane by baking at 120°C for 20 min. The membrane was placed in a Miniblotter 45 (Immunetics, Cambridge, MA, USA) with the lanes of DNA at 90° to the lanes of the device. Digoxigenin-labeled whole genomic DNA probes to 40 subgingival species were hybridized in individual lanes of the Miniblotter. Following hybridization, the membranes were washed at high stringency and the DNA probes detected using antibody to digoxigenin conjugated with alkaline phosphatase and chemiluminescence detection. The last two lanes in each run contained standards at concentrations of 10⁵ and 10⁶ cells of each species. Signals were evaluated visually by comparison with the standards at 10⁵ and 10⁶ bacterial cells for the test species on the same membrane by a calibrated examiner. They were recorded as: 0 = not

detected; 1 < 10^5 cells; 2 = $\sim 10^5$ cells; 3 = 10^5 – 10^6 cells; 4 = $\sim 10^6$ cells; or 5 > 10^6 cells. The sensitivity of this assay was adjusted to allow the detection of 10^4 cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe. This procedure was carried out in order to provide the same sensitivity of detection for each species. Failure to detect a signal was recorded as 0, although conceivably, counts in the 1–1000 ranges could have been present (4,18,19).

Statistical analysis

The mean counts ($\times 10^5$) of individual bacterial species were averaged across subjects in both groups. The significance of differences among the groups for the microbiological parameters was sought using the Wilcoxon test, since it was a split-mouth design study and considering the normality of the data distribution. Friedman test was used to evaluate differences between the time-points. The level of significance was 5% for all analysis.

Results

20 subjects (age range, 35 to 55 years; mean age, 46.05 ± 6.38 years; 9 male and 11 female) completed the study (table 1). Two subjects had to take antibiotics for medical reasons and one had to move town. All 40 bacterial species evaluated were detected in different levels at baseline. Statistical significant differences could not be detected between groups. After periodontal treatment, the levels of some bacterial species decreased, while some other species presented an increase. *T. forsythia*, for example, increased in test group and decreased in control group, while *P. gingivalis* increased in control group and remained stable in test group and *T. denticola* presented a decrease in both groups. Despite this variation, the statistical analysis was not able to identify significant differences neither at intragroup nor at intergroup comparisons (figures 1 and 2).

Discussion

The aim of this study was to evaluate the effects of the nonsurgical periodontal treatment (SRP) associated or not to aPDT in the reduction of specific subgingival periodontopathogens in smokers with chronic periodontitis. The effects of SRP or

SRP + aPDT on the levels of 40 bacterial species were evaluated 1, 4 and 12 weeks after periodontal treatment. An important change on microbiologic parameters was not observed in both groups, demonstrating that neither SRP nor SRP+aPDT were able to significantly reduce bacterial species. Many trials have shown that SRP significantly reduces the prevalence and levels of pathogenic species such as *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia*, which correlates with a reduced probing depth (5,20). However, in this study, smoking probably negatively influenced host responses, as demonstrated in previous clinical trials. The frequency of detection of *T. forsythia*, *P. micros* and *C. rectus* was lower in non-smokers than in smokers after periodontal treatment and the chance to detect a sum of levels >20% of *P. micros* and/or *F. nucleatum* was 13.8 higher in treated smoking patients (6). In a study where smokers received SRP or SRP + local application of doxycycline, SRP alone was not able to reduce microbiologic parameters, even though a significant reduction in the frequency of *T. forsythia* and *P. gingivalis* was found in SRP + Doxycycline group (21). van der Velden (22) reported that smokers did not show a significant decrease in the frequency of many putative periodontopathogens (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* and *P. micros*) after periodontal treatment. According to Kinane and Chestnutt (2), although smokers can also benefit from treatment, albeit to a lesser degree, treatment failures tend to predominate among smokers. Smokers usually have deeper pockets after therapy than non-smokers, and these will continue to harbor quantitatively and qualitatively more pathogenic bacteria than shallower pockets. Coupled with this are the reduced fibroblast, PMN, and epithelial cell function, reduced host defense response, and reduced vascularity of the site. These tissue differences in smokers following the initial short-term healing after therapy may partly explain the differences in treatment response.

Because of this diminished treatment response in smokers, clinicians may recommend adjunctive antimicrobial therapy for smokers. This practice may be justified by evidence that suggests subgingival pathogens are more difficult to eliminate in smokers following scaling and root planning (3). To act as an alternative antimicrobial therapy, this study evaluated the adjunctive effect of aPDT on the levels of bacterial species in smokers. The ability of aPDT to kill bacteria has been shown in previous *in vitro* studies. The exposure of bacterial cultures to a 665-diode laser at 100 mW in the presence of methylene blue (MB) as a photosensitiser produced a

95–99% kill rate in the various species that were tested (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *S. sanguis*) (23). In the same way, He/Ne laser was able to kill large proportions of the bacteria present in subgingival plaques samples from patients with chronic periodontitis, sensitized by toluidine blue (24), which was also observed in biofilms of *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* (25). Likewise, a significant reduction in the number of viable *P. gingivalis* organisms was detected in the oral cavities of rats, where toluidine blue was used together with laser light (26). In subgingival plaque samples from 33 patients with chronic periodontitis, a significant reduction in the proportion of sites positive for periodontopathogens (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *P. nigrescens*) was observed 180 days after periodontal treatment in SRP+aPDT group when compared to SRP group (14). Furthermore, aPDT successfully suppressed *F. nucleatum* DNA concentration in 24 patients with localized chronic periodontology. In studies conducted in patients under supportive periodontal treatment, Chondros et al. (15) found 3 months after therapy a statistically significant reduction of *F. nucleatum* and *E. nodatum* in the aPDT test group.

Although it could be expected an additional effect of aPDT even in challenging clinical situations (such as in smokers), some trials were not able to show improvements in microbiological parameters when aPDT was applied. In a study with 58 subjects with chronic periodontitis, *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola* were evaluated by DNA analysis after periodontal treatment. No significant differences were found between control group (subgingival ultrasound only) and laser group (additionally treated by aPDT) (27). Similarly, in another study that evaluated 24 patients with chronic periodontitis, there were no significant differences between SRP and SRP+aPDT groups regarding microbiological changes (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *Parvimonas micra*, *F. nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens*, and *Capnocytophaga* spp. analyzed by PCR) (28). Ruhling et al. (29) concluded that aPDT was not superior to conventional mechanical treatment of persistent pockets, after analyzing *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, and *P. intermedia*) by PCR. In addition, a recent Statement of the American Academy of Periodontology concluded that current evidence shows that antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), either as a

monotherapy or adjunctive to SRP, seems to be unpredictable and inconsistent in their ability to reduce subgingival microbial loads beyond that achieved by SRP alone or, at best, the evidence is lacking or conflicting (30).

Many factors can alter the expected results of periodontal treatment with aPDT. Several conditions such as drug ion concentration, period of retention of the drug within the tissue, time for biological response, pH of the environment (tissue/tooth interface), presence of exudates and gingival fluid, and mode of drug application may influence the biological response to aPDT (29). It was found that only cationic photosensitizers (PS) or strategies that permeabilize the Gram-negative permeability barrier in combination with non-cationic PS are able to kill multiple logs of Gram-negative species. Phenothiazinium dyes, as the one applied in this study, are naturally cationic, owing to the involvement of one amino group and have been widely employed to carry out photodynamic inactivation of a large range of both Gram-positive, Gram-negative bacteria and also fungal cells (31,32). Wavelength can be related to collateral tissue damage: in general, the shorter wavelength lasers, such as diode laser with a wavelength of 660 nm used in the present protocol, are more likely to penetrate deeper into soft tissues. The extent of tissue penetration by shorter wavelengths is related to their affinity for pigmented tissues and a low absorption coefficient in water. Therefore, the characteristics of the laser and photosensitizer were in accordance with evidences observed in literature and with the manufacturer's instructions.

Even though it could not be demonstrated in this clinical trial, the concept of aPDT is plausible and could foster new therapeutic concepts in the treatment of periodontal diseases. The knowledge available so far justifies the dedication of more research efforts to this method (29). It can be speculated that a modification on clinical protocol may lead to significant microbiological changes. Maybe, the frequency of the aPDT application is a possible explanation for the absence of microbiologic differences between the groups. In this study, a single episode of aPDT was performed and future studies are necessary elucidate to what extent multiple applications of aPDT might enhance the outcome of therapy (28).

Conclusion

The results presented in this study show that the adjunctive effect of a single episode of aPDT to SRP in smokers failed to demonstrate microbiological

improvements, evaluated with checkerboard DNA-DNA hybridization at baseline and 1, 4 and 12 weeks after periodontal treatment.

References

1. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *Journal of clinical periodontology* 2005; 32 Suppl 6:180-195.
2. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2000; 11(3):356-365.
3. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *Journal of periodontology* 2004; 75(2):196-209.
4. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *Journal of clinical periodontology* 2001; 28(5):377-388.
5. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *Journal of clinical periodontology* 1997; 24(10):767-776.
6. van Winkelhoff AJ, Winkel EG. Antibiotics in periodontics: right or wrong? *Journal of periodontology* 2009; 80(10):1555-1558.
7. Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. *Journal of periodontology* 2004; 75(11):1553-1565.
8. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology* 2000 2011; 55(1):143-166.
9. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, Koshy G, Romanos G, Ishikawa I, Izumi Y. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology* 2000 2009; 51:109-140.
10. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *Journal of periodontology* 2009; 80(11):1790-1798.
11. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, Boussios CI, Kent R, Goodson JM, Tanner AC, Soukos NS. The

- antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of periodontal research* 2009; 44(6):751-759.
12. Goulart Rde C, Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G, Jr., Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomedicine and laser surgery* 2010; 28 Suppl 1:S53-60.
 13. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *Journal of periodontal research* 2008; 43(2):162-167.
 14. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, Spolidorio DM, de Toledo BE, Garcia VG. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers in medical science* 2011.
 15. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rossler 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 in medical science* 2009; 24(5):681-688.
 16. Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A, Holletschke A, Pfister W, Schutze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *Journal of periodontology* 2010; 81(7):975-981.
 17. 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. *Journal of periodontology* 2009; 80(1):98-105.
 18. Novaes AB, Jr., Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers in medical science* 2012; 27(2):389-395.
 19. Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2011; 38(9):828-837.
 20. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology* 2005; 32(2):200-206.

21. Machion L, Andia DC, Saito D, Klein MI, Goncalves RB, Casati MZ, Nociti FH, Jr., Sallum EA. Microbiological changes with the use of locally delivered doxycycline in the periodontal treatment of smokers. *Journal of periodontology* 2004; 75(12):1600-1604.
22. Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Loos BG. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of clinical periodontology* 2003; 30(7):603-610.
23. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers in medical science* 2003; 18(1):51-55.
24. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research* 1993; 28(3):204-210.
25. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Archives of oral biology* 1992; 37(11):883-887.
26. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003; 47(3):932-940.
27. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2009; 36(7):575-580.
28. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rossler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 2008; 79(9):1638-1644.
29. Ruhling A, Fanghanel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, Kocher T. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. *Clinical oral investigations* 2010; 14(6):637-644.
30. American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease. *Journal of periodontology* 2011; 82(4):513-514.
31. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2009; 6(3-4):170-188.

32. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in surgery and medicine* 2006; 38(5):468-481.

Legends

Figure 1. Mean counts ($\times 10^5$) of 40 bacterial species in each treatment group (SRP and SRP + aPDT) at baseline, 1, 4 and 12 weeks after treatment. Statistically significant differences were not detected.

Figure 2. Mean counts ($\times 10^5$) of 40 bacterial species comparing the treatments groups (SRP and SRP + aPDT) at baseline, 1, 4 and 12 weeks after treatment. Statistically significant differences were not detected.

Figure 1

Figure 2

Anexos

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comitê de Ética em Pesquisa

OF.CEP/250/FORP

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2009.

Senhor Professor,

Ref.: Processo nº 2009.1.588.58.0
CAAE nº 0048.0.138.000-09

A pedido da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, desta Faculdade, informamos que o referido Comitê em sua 100ª Sessão, realizada em 18 de junho de 2009, **aprovou o Projeto de Pesquisa:** "Avaliação do efeito adjunto da terapia fotodinâmica aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular em pacientes fumantes. Estudo clínico controlado e randomizado".

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** no dia **30 de junho de 2010** e o **Relatório Final** no dia **30 de junho de 2011**.

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

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG _____, CPF _____ fui convidado a participar da pesquisa, cujo título é “Avaliação do efeito adjunto da terapia fotodinâmica aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular em pacientes fumantes. Estudo clínico controlado e randomizado.”. Eu assino esse Termo de Consentimento que autoriza a minha participação na pesquisa, pois me foram dadas todas as informações necessárias para que eu pudesse tomar esta decisão. Estou ciente de que:

1. A pesquisa é de responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza e tem a participação das doutorandas em Periodontia Adriana Queiroz e Flávia Adelino Suaid. Foram explicados todos os procedimentos que serão realizados em mim.
2. Esta pesquisa será feita para que se possam verificar as vantagens da luz laser. Para isso, as alunas farão alguns exames antes e depois de realizar profilaxia dos meus dentes e aplicar a luz laser. Portanto, serão realizados raspagem dos dentes e aplicação da luz do laser com finalidade de melhorar a inflamação gengival
3. Os procedimentos que poderão me causar incômodo são: exames que serão feitos em minha boca, fotografias, profilaxia dos dentes, raspagem dos dentes e anestesia.
4. Foi-me garantido que as alunas me acompanharão desde o primeiro exame até o final do meu tratamento.
5. As alunas ou o Prof. Sérgio tirarão todas as minhas dúvidas durante o meu tratamento.
6. Sei que posso não querer participar desta pesquisa ou que posso retirar o meu consentimento a qualquer hora, sem que eu tenha alguma penalização e sem prejudicar o meu atendimento.
7. Sei que os meus dados ficarão arquivados na FORP-USP e que somente serão usados na publicação da pesquisa.
8. Foi-me garantido, também, que eu terei assistência e não terei gastos se acontecer algum problema com minha saúde devido a minha participação nesta pesquisa.
9. Os pesquisadores se comprometeram a prestar assistência total a mim durante a pesquisa. Se necessário, poderei entrar em contato com o Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza (tel. 3602 3980, e-mail: scombatti@forp.usp.br), Dra. Adriana Corrêa de Queiroz (tel. 34213775, e-mail: acqueiroz@usp.br) ou Dra. Flávia Adelino Suaid (tel. 36234320, e-mail: flavinha@usp.br)
10. Receberei uma cópia desse Termo de Consentimento.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__

Paciente

Pro. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza, CPF: 078945798-90

Adriana Corrêa Queiroz CPF: 705713762-15

Flávia Adelino Suaid, CPF: 287259288-13