Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

GUILHERME DE OLIVEIRA MACEDO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COMO ADJUVANTE AO
TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICO E NA TERAPIA
PERIODONTAL DE SUPORTE EM DIABÉTICOS TIPO 2: ESTUDO
CLÍNICO E LABORATORIAL EM HUMANOS**

Ribeirão Preto
2009

GUILHERME DE OLIVEIRA MACEDO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COMO ADJUVANTE AO
TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICO E NA TERAPIA
PERIODONTAL DE SUPORTE EM DIABÉTICOS TIPO 2: ESTUDO
CLÍNICO E LABORATORIAL EM HUMANOS**

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos
necessários para obtenção do
título de Doutor em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Ribeirão Preto
2009

Macedo, Guilherme de Oliveira

Efeito da terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não-cirúrgico e na terapia periodontal de suporte em diabéticos tipo 2: estudo clínico e laboratorial em humanos.

Ribeirão Preto, 2009.

108 p.: Il.; 30 cm

Orientador: Grisi, Márcio Fernando de Moraes

Tese de doutorado apresentada no Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Periodontia.

1. periodontite, 2. diabetes, 3. terapia fotodinâmica

Guilherme de Oliveira Macedo

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COMO ADJUVANTE AO
TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICO E NA TERAPIA
PERIODONTAL DE SUPORTE EM DIABÉTICOS TIPO 2: ESTUDO
CLÍNICO E LABORATORIAL EM HUMANOS.**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Doutor em
Periodontia.

DATA DE APROVAÇÃO: ____/____/____

1) Professor (a) Doutor (a)_____

_____.

2) Professor (a) Doutor (a)_____

_____.

3) Professor (a) Doutor (a)_____

_____.

4) Professor (a) Doutor (a)_____

_____.

5) Professor (a) Doutor (a)_____

_____.

Dedicatória

A **Mônica**, que divide comigo todos os momentos importantes de minha vida. Dedico a você não somente este trabalho como também parte daquilo que há de bom em mim. Amo você.

A **Pedro**, que somente daqui a alguns anos poderá entender o que escrevo agora. Você me mostrou que os problemas que julgamos grandes ficam pequenos quando temos um filho nos braços sorrindo para nós. Quantas vezes te abraçar trouxe-me a energia que precisava para concluir este trabalho.

Aos meus pais **José Fernandes e Júlia**. Obrigado pelo apoio que sempre me deram, não medindo esforços para me proporcionar a melhor formação pessoal e profissional.

Agradecimento Especial

Aos Professores de Periodontia da FORP-USP: **Arthur Belém Novaes Júnior, Márcio Fernando de Moraes Grisi, Sérgio Luís Scombatti de Souza, Mário Taba Jr e Daniela Bazan Palioto**. Quero agradecer pelos dez anos em que fui aluno desse grupo. Termino esta etapa de minha vida com orgulho do que fiz e de cabeça erguida para encarar os desafios dessa carreira. Devo a essa equipe a construção de meu currículo, do qual me orgulho muito. Tive a grande oportunidade de ter trabalhado com todos em diversas pesquisas e, com este trabalho, termino oficialmente meu ciclo na USP de Ribeirão Preto. Meu eterno agradecimento por todas as oportunidades que me foram dadas.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro deste trabalho (Processo N° 06/00460-9).

Ao Prof. Paulo Tambasco, por estar disponível a ajudar, ensinar e orientar, independente do seu envolvimento com a pesquisa.

Ao Prof. Sérgio Salvador, pelo apoio que sempre me foi dado antes mesmo do Doutorado, prontificando-se sempre a me ajudar.

À Professora Luciene Figueiredo, Izilvânia e toda equipe da Universidade de Guarulhos, que tão bem me receberam. Obrigado pelo apoio e pela realização do exame microbiológico deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Cirurgia pelo agradável convívio.

Às Professoras Tânia Fortes e Margarete Almeida pela torcida para que tudo desse certo.

A Fabíola Oliveira, por ter me ensinado de maneira competente a realizar a análise laboratorial (ELISA) deste estudo.

A Glauce e Natália, pelo apoio que me prestaram no Laboratório de Biologia Molecular.

A Dulce e Tatiana, pelo profissionalismo, atenção e amizade ao longo desses anos de convivência. Muito obrigado. Não me esquecerei de vocês.

A Suely, que tanto me ajudou durante os atendimentos clínicos com sua paciência e carinho.

A Zilda, que me ajudou sempre na árdua tarefa de agendar os pacientes desta pesquisa.

A Vani, pelas suas inestimáveis contribuições em diversas pesquisas.

A Sebastião, por toda a ajuda prestada.

A Isabel Sola e Regiane Moi, por sempre me ajudarem com as inúmeras burocracias da pós-graduação.

A Júnia e Roger, pelo apoio prestado em vários trabalhos.

Aos colegas de Doutorado **Raquel e Rafael**, que estiveram comigo desde os difíceis tempos de mestrado. A nossa história é tão longa que é difícil resumir em poucas palavras tudo o que passou e principalmente tudo o que ficou. Fica sem dúvida o sentimento de ter valido a pena pelo que conquistamos e pelo que levaremos desse convívio. Tenho certeza que vocês chegarão longe. Muito sucesso.

A Patrícia, que se juntou a nós no Doutorado. Obrigado por tudo e sucesso.

Às colegas e amigas **Flávia, Priscila Paganini, Priscila Nóbrega, Annelissa e Adriana**, por toda a ajuda que me deram nesses últimos anos. Agradeço também pelo carinho que tiveram com a minha família e por todo apoio dado nessa fase final do Doutorado. Sucesso a todas.

Aos colegas do mestrado **Ingrid, Karina, Luciana, Patrícia e Danilo** pelo prazer do convívio agradável que tivemos durante as atividades clínicas.

A **Vladimir e Cristiana**, pelo desejo de que tudo desse certo.

A **Joselina**, pela tranquilidade e confiança transmitida.

A todos os demais funcionários que contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da terapia fotodinâmica (TFD) como adjuvante à terapia periodontal (TP), no preparo básico e na fase de terapia periodontal de suporte (TPS), de pacientes diabéticos tipo 2. O estudo foi dividido em duas fases (fase 1 – tratamento e fase 2 – terapia de suporte). Foram selecionados 45 pacientes diabéticos tipo 2, dos quais 30 receberam a TP associada à TFD (Grupo G1) e 15 realizaram TP. Foi prescrita antibioticoterapia (doxiciclina 100mg/dia) por 14 dias a todos os pacientes de ambos os grupos. Foram avaliados no exame inicial e 3 meses após a terapia os seguintes parâmetros: Índice de Placa (IP), Profundidade de Sondagem (PS), Nível de Inserção Clínica (NIC), Sangramento à Sondagem (SS), Supuração (SUP), Hemoglobina Glicosilada (HbA1c), Glicemia em Jejum (GJ). Foi coletado um pool de amostras de fluido gengival e biofilme subgengival para análise da interleucina I beta (IL1- β) e exame microbiológico. Os resultados da fase 1 serviram como dados iniciais para fase 2. Nesta fase 2, o Grupo G1 foi subdividido em dois grupos de 15 indivíduos: G1R – onde foi realizada raspagem e alisamento; e G1-F – onde foi realizada somente aplicação de PDT. O grupo G2 (n=15) recebeu raspagem e alisamento radicular. As mesmas avaliações da fase 1 foram feitas após 3, 6 e 9 meses da realização da TPS. Para avaliações entre dois grupos o teste de Mann-Whitney foi aplicado, enquanto para intra-grupos foi empregado o Wilcoxon signed rank test. Para a avaliação intra-grupo entre os tempos 3, 6, 9 e 12 meses foi utilizado o teste de Friedman. Foi admitido o nível de significância de 5%. Na fase 1 não houve diferenças significativas entre os grupos para os parâmetros avaliados ($P > 0,05$). A análise intra-grupos demonstrou uma redução significativa da HbA1C ($8,5 \pm 0,9$ / $7,5 \pm 0,7$) ($P < 0,01$) e GJ ($163,53 \pm 68,04$ / $154 \pm 62,45$) ($P < 0,01$) para o grupo G1. Houve uma redução significativa das bactérias do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) ($P < 0,05$). Na fase 2 não houve diferenças entre grupos para os parâmetros avaliados. Houve redução significativa do número bolsas entre 4, 5 e ≥ 6 mm e aumento de sítios ≤ 3 mm entre o tempo de 3 meses e as demais reavaliações ($P < 0,05$). Houve redução da IL1- β entre 3 e 6 meses para o grupos G1-R ($P < 0,05$). Concluiu-se que a aplicação da TFD como adjuvante à terapia periodontal, em uma única aplicação, não foi capaz de promover efeitos adicionais sobre os parâmetros clínicos, laboratoriais e microbiológicos avaliados, bem como sobre os níveis de IL1- β presentes no fluido gengival. A aplicação da TFD na fase de TPS promoveu resultados semelhantes em relação aos grupos G1-R e G2 para todos os parâmetros avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite, Diabetes, Terapia fotodinâmica.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) as an adjunctive treatment to non-surgical periodontal therapy (PT) and periodontal supportive therapy (PST) in chronic periodontitis patients with type 2 diabetics. The study was conducted into two phases. Phase 1: Forty-five diabetics type 2 patients were selected and randomly treated with scaling and root planing (SRP) followed by a single episode of PDT (G1 group/n=30) or SRP alone (G2 group/n=15). Plaque Score (PS), Probing Depth (PD), Clinical Attachment Level (CAL), Bleeding Score (BS), Suppuration (S), Glycated Hemoglobin (HbA1c), and Fasting Glucose (FG) levels were measured at baseline and 3 months after therapy. Samples of subgingival biofilm and crevicular fluid were collected for microbiological and IL1- β analysis respectively. Phase 2: Group G1 was subdivided in two subgroups: G1-R – treated with SRP alone (n=15), and G1-F treated with PDT alone (n=15). G2 group was treated with SRP alone (n=15). The results of phase 1 were based on baseline to phase 2 analysis. The same parameters of phase 1 were measured at 3, 6, 9, and 12 months. Mann-Whitney test was applied to assess the differences between groups and Wilcoxon signed rank test for intra-groups differences. Friedman test was applied to assess the differences among 3, 6, 9, and 12 months. A significance level of 5% was established. In phase 1, no significant statistical differences were observed to any parameter evaluated between groups ($P<0.05$). Intra-groups analysis showed a significant reduction of HbA1C ($8.5 \pm 0.9 / 7.5 \pm 0.1$) ($P<0.01$), and FG ($163.53 \pm 68.04 / 154 \pm 62.45$) ($P<0.01$) for G1 group. There was also a significant reduction of bacterial red complex (*P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola*) ($P<0,05$). In phase 2, there were no differences between groups for the parameters assessed. There was a significant reduction in the number of sites of 4 and 5 mm and ≥ 6 mm and increase of the number of sites with ≤ 3 mm between 3 months and other times of revaluations ($P<0,05$). There was a reduction of IL1- β between 3 and 6 months for the G1-R group ($P<0,05$). It can be concluded that the adjunctive application of a single episode of PDT to scaling and root planing did not show additional improvement in non-surgical periodontal therapy. The PDT in periodontal maintenance showed similar results in relation to the groups G1 and G2-R for all parameters assessed. Therefore, PDT can be used as a substitute of SRP during PST when mechanical instrumentation for plaque and calculus removal is not mandatory.

KEY WORDS: Periodontitis, Diabetes, Photodynamic Therapy.

Sumário

Resumo

Abstract

1 Introdução.....18

2 Justificativa.....24

3 Proposição.....28

4 Material e Métodos30

5 Resultados47

6 Discussão58

7 Conclusões67

Referências Bibliográficas69

Apêndice76

Anexo107

1 Introdução

A inter-relação entre a Doença Periodontal (DP) e o Diabetes mellitus (DM) tem sido avaliada através de estudos que demonstram uma forte ligação entre as duas doenças¹. O DM é caracterizada por anormalidades endócrino-metabólicas que podem promover danos a estruturas como olhos, rins, vasos sanguíneos, coração e nervos^{2, 3}. São observados fundamentalmente dois tipos de DM: Tipo 1 (insulino-dependente) ou Tipo 2 (não insulino-dependente). O DM Tipo 1 está relacionado à hipoprodução de insulina devido à destruição de células beta pancreáticas, enquanto o Tipo 2 envolve a resistência dos tecidos-alvos à ação da insulina. A resistência à insulina ocorre por causa de defeitos da própria molécula de insulina ou alterações nos receptores celulares desse hormônio e representa cerca de 90% dos casos de diabetes⁴.

A periodontite é uma doença de etiologia bacteriana que tem sido referida como a sexta complicação do diabetes⁵. Estudos epidemiológicos têm demonstrado sua maior prevalência em diabéticos do que em sujeitos com tolerância normal à glicose, sugerindo então que o diabetes é um fator de risco para doença periodontal⁶. Contudo, o grau de controle metabólico do diabetes é determinante para a inter-relação entre as duas patologias.

O grau de controle metabólico do paciente diabético pode ser dividido em controlados, moderadamente controlados ou pobremente controlados, havendo diferenças significantes quanto à perda de inserção periodontal e à profundidade de bolsas em doentes pobremente controlados, quando comparados a um grupo controle não diabético. Esses dados sugerem que a condição do DM modifica a evolução da DP^{7, 8}. Portanto, deve ser dada atenção especial para a condição dos tecidos periodontais em diabéticos, particularmente quando a doença não está bem controlada^{9, 10}.

Alterações biológicas inerentes ao diabetes, como microangiopatia, metabolismo do colágeno com excessiva atividade colagenolítica, modificações na resposta inflamatória do hospedeiro e predisposição genética, alteram a predisposição do indivíduo diabético à doença periodontal¹¹. Entretanto, existem evidências de que a infecção periodontal pode predispor ou exacerbar o diabetes, sendo estas então doenças bidirecionais, cuja presença e/ou controle pode apresentar mútua influência^{1, 12}.

Foi proposto um modelo de dois caminhos para explicar a relação entre o DP e o DM. A base bioquímica por meio da qual a hiperglicemia pode levar a complicações microvasculares vistas em diabéticos é decorrente do crescente acúmulo de produtos finais da degradação da glicose (AGEs) no plasma e tecidos desses pacientes. A ligação destes produtos a receptores de macrófagos inicia um ciclo de supra-regulação de citocinas, com a síntese principalmente de Interleucina 1- β (IL1- β), entre outras. Por outro lado, é reconhecido que a DP, devido à presença de periodontopatógenos e seus fatores de virulência, induz a secreção de IL1- β , além de aumentar a resistência à insulina. A síntese e secreção de citocinas mediadas pela infecção periodontal podem amplificar a resposta dos produtos finais de glicosilação, os quais induzem uma maior produção de citocinas, que por sua vez exacerbam a DP. Desta forma, e de maneira similar a outras infecções bacterianas, a relação entre DM e infecção periodontal torna-se bi-direcional^{13, 14}.

A raspagem e alisamento radicular são procedimentos mecânicos mais comumente utilizados em Periodontia, sendo empregadas em todas as fases do tratamento periodontal, e também na Terapia Periodontal de Suporte (TPS), cujo principal objetivo é o controle e prevenção da recorrência da doença¹⁵. A terapia mecânica promove uma redução significativa nos níveis de patógenos, porém, não é

totalmente efetiva na erradicação de todas as bactérias responsáveis pela instalação e perpetuação da doença periodontal¹⁶. A utilização de antibióticos pode reduzir o nível de periodontopatógenos e potencializar os benefícios da terapia mecânica¹⁷⁻²⁰. Estudos envolvendo a terapia periodontal não-cirúrgica^{9, 10, 21-23} indicaram melhora apenas no estado periodontal de pacientes diabéticos tipo 2, contudo, quando a terapia mecânica foi associada à antibioticoterapia houve uma melhora no estado periodontal e no controle glicêmico²⁴⁻²⁶. Os benefícios da associação de antimicrobianos à terapia periodontal foram revelados por um estudo que observou a redução da necessidade de insulina após administração de penicilina²⁷.

Na busca pela melhor terapia a ser instituída em pacientes sistemicamente comprometidos, tem sido demonstrado que tetraciclina e seus derivados quimicamente modificados têm, independentemente de seus efeitos antimicrobianos, um efeito de modulação sobre a resposta do hospedeiro através da inibição de metaloproteinases (MMPs) relacionadas com a destruição tecidual^{28, 29}. Desta maneira, o uso de doxiciclina como auxiliar da terapia mecânica periodontal em diabéticos tem potencial para atuar em diferentes vias. Primeiro, como um antibiótico de largo espectro, efetivo contra a maioria dos patógenos periodontais, que alcança concentrações no fluido gengival 7 a 10 vezes acima do nível do soro e assim fornece uma importante função na redução de patógenos, diminuindo os sinais e sintomas locais da doença periodontal. Segundo, como um potente modulador da resposta do hospedeiro, melhorando assim o estado do paciente diabético³⁰.

O efeito do tratamento periodontal sobre o diabetes mellitus pode ser dependente do tipo de terapia estabelecida, associando ou não terapias adjuvantes ao tratamento periodontal como antibioticoterapia local ou sistêmica^{17, 24-27, 31}. A terapia antimicrobiana fotodinâmica tem como princípio a erradicação de células-

alvo através da utilização de um fotossensibilizador e uma fonte de luz (*laser*) com comprimento de onda apropriado³², podendo assim promover a eliminação de microrganismos presentes na doença periodontal³³⁻³⁵. Esta modalidade terapêutica originalmente foi desenvolvida para o tratamento de neoplasias, todavia, vários microrganismos, inclusive espécies encontradas na cavidade oral, podem ser eliminados conforme demonstrado em modelos experimentais desenvolvidos *in vitro*^{33, 34, 36-39}. Além disso, alguns fatores de virulência como lipopolissacarídeos e proteases podem ser reduzidos através da fotossensitização⁴⁰.

O principal fator que determina a susceptibilidade dos microrganismos à terapia fotodinâmica, representada pela luz *laser*, está na capacidade da bactéria em absorver luz de um determinado comprimento de onda no momento da irradiação. Em relação à natureza da luz *laser* a mais importante característica é o comprimento de onda, bem como a forma de aplicação (contínua ou intermitente) e o tempo de exposição utilizado. Outros fatores como pH, cor, condutividade térmica, conteúdo de água e matéria orgânica, além da densidade de colônias bacterianas podem ser citados⁴¹.

A utilização do *laser* de baixa intensidade permite diferenciar os tecidos do hospedeiro das bactérias pela administração de fotossensibilizadores, os quais se unem aos microrganismos alvo. A técnica de fotossensitização letal deve ser hábil em preencher o mais importante requisito de um agente terapêutico – a capacidade de destruir os microrganismos responsáveis pela doença sem causar danos aos tecidos. Estudos desenvolvidos em desenhos experimentais utilizando o modelo animal e humano demonstram que a fotossensitização letal pode erradicar microrganismos⁴² e seu uso em diversos processos infecciosos pode ser preconizado³³.

Com o objetivo de eliminar bactérias do biofilme supra e subgengival, a TFD tem sido aplicada com várias combinações de *laser* e agentes fotosensibilizadores como o azul de toluidina, azul de metileno, cloreto de tetrametilitionina e cloreto de fenotiazina. Dentre estes o agente azul de toluidina tem se mostrado um efetivo fotosensibilizador⁴³. Dobson & Wilson (1992) demonstraram em um estudo *in vitro* que as bactérias associadas à doença periodontal podem ser eliminadas através da fotosensibilização com Azul de Toluidina e *laser* de Hélio/Neônio⁴⁴.

A fotosensibilização letal de uma população bacteriana presente em amostra de placa subgengival foi demonstrada por Sarkar & Wilson (1993)⁴⁵. Amostras de placa subgengival de 20 pacientes com periodontite crônica foram expostas a uma fonte de luz *laser* de 7.3 mW (*laser* Hélio/Neônio) por 30 segundos na presença de 50 µg/ml de azul de toluidina. A contagem de microrganismos viáveis nas amostras foi reduzida consideravelmente pela combinação do fotosensibilizador (azul de toluidina) com a fonte de *laser*.

2 Justificativa

Em um estudo realizado em nove capitais brasileiras entre 1986 e 1988, observou-se a prevalência de 7,6% de diabetes mellitus numa população com idade entre 30 e 69 anos. Dados de 2003 apontam uma prevalência de 12% de pacientes com diabetes de mellitus na cidade de Ribeirão Preto. Resultados similares foram obtidos em outros países em período semelhante⁴⁶. Esta prevalência vem aumentando progressivamente com os anos. Recentemente, pesquisas demonstram que nos Estados Unidos sua prevalência atual é de 8,4% da população adulta⁴⁷.

Está bem estabelecida pela literatura a influência negativa da DM sobre a condição periodontal desses pacientes. Contudo, vários estudos têm tentado estabelecer até que ponto o tratamento periodontal pode influenciar positivamente no controle metabólico de pacientes diabéticos. Esta relação pode ser avaliada de maneira mais evidente em pacientes com DM tipo 2, já que os diabéticos tipo 1, por serem insulino-dependentes, possuem um controle muito próximo dos níveis de insulina e dos marcadores sistêmicos da doença, como a HbA1c. Desta forma, seria difícil avaliar possíveis alterações metabólicas nesses pacientes que realizam ajustes freqüentes em suas medicações de controle⁴⁸.

A associação de antibioticoterapia à terapia periodontal mecânica convencional é indicada no tratamento de pacientes diabéticos com controle glicêmico deficiente⁴. Dentre os antibióticos utilizados, a doxiciclina tem apresentado resultados positivos sobre o controle metabólico do paciente diabético tipo 2, havendo uma redução nos níveis de HbA1c⁴⁸. Além de sua ação na redução de patógenos, sua utilização já foi relacionada com a redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL1- β , além de poder inibir o processo de glicosilação não-enzimática. Assim, a administração de antibioticoterapia a pacientes diabéticos

pobremamente controlados pode promover um efeito positivo sobre o controle glicêmico do diabetes.

A IL1- β é uma potente citocina inflamatória produzida por monócitos e macrófagos ligada ao processo de reabsorção óssea^{49, 50}. Há uma relação direta entre a diminuição dos níveis desse marcador e a redução dos sinais clínicos da DP. Estudos anteriores realizaram a quantificação dessas citocinas no fluido gengival (FG) através de método imunoenzimático (ELISA), demonstrando haver uma quantidade suficiente neste fluido para sua identificação e quantificação^{51, 52}.

A associação de terapias antibacterianas adicionais tem trazido benefícios à terapia periodontal por reduzir os níveis bacterianos em sítios infectados. A presença e redução bacteriana pós-terapia tem sido avaliada através da análise de amostras bacterianas de placa subgengival pelo método *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, que é um método qualitativo, semi-quantitativo do biofilme subgengival. O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* é capaz de demonstrar a redução e/ou eliminação de patógenos periodontais após terapia periodontal não-cirúrgica em pacientes diabéticos⁵³.

A terapia fotodinâmica apresenta um efeito antibacteriano local, o que pode trazer benefícios adicionais à terapia tradicional pela possibilidade de uma maior descontaminação dos sítios infectados sem, no entanto, submeter o paciente a novas dosagens de antibióticos. Desta forma, a avaliação da terapia fotodinâmica em diabéticos nas fases de tratamento e principalmente na fase de terapia periodontal de suporte pode ser justificada pelo seu efeito antibacteriano obtido com um menor trauma local quando comparada à raspagem subgengival⁴².

Assim, justificam-se as avaliações clínicas, sistêmicas, imunoenzimáticas e bacteriológicas da terapia fotodinâmica como adjuvante à terapia periodontal não-cirúrgica e na fase de terapia periodontal de suporte, em pacientes diabéticos tipo 2.

3 Proposição

A proposta deste estudo foi avaliar em pacientes diabéticos tipo 2:

- O efeito clínico da terapia fotodinâmica como adjuvante à terapia periodontal não-cirúrgica;
- O efeito clínico da terapia fotodinâmica na terapia periodontal de suporte;
- O efeito da terapia fotodinâmica sobre os níveis de Interleucina 1- β (IL1- β) presentes no fluido gengival quando aplicada como adjuvante à terapia periodontal não-cirúrgica e na terapia periodontal de suporte;
- O efeito da terapia fotodinâmica sobre a microbiota subgengival quando aplicada como adjuvante à terapia periodontal não-cirúrgica e na terapia periodontal de suporte.

4 Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP (Processo nº 2006.1.934.58.2)(Anexo A). Foram selecionados 45 indivíduos diabéticos tipo 2 do setor de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, do Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Saúde Escola Cuiabá da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e da triagem da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP. A participação na pesquisa foi voluntária e os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B), de acordo com o capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde. Todos os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo, tipos de terapias a serem aplicadas com seus riscos e benefícios.

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 estabelecido há pelo menos cinco anos, hemoglobina glicosilada (HbA1c) maior do que 7%, presença de periodontite estabelecida com 2 ou mais dentes com nível de inserção clínica maior ou igual 6 mm e um ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm (Machtei et al., 1992)⁵⁴, presença de no mínimo um dente uniradicular em cada quadrante com ao menos um sítio maior do que 5 mm e presença de no mínimo 15 dentes remanescentes. Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: tabagismo nos últimos 5 anos, gravidez ou lactação, HIV positivos, desordens sanguíneas, inflamações crônicas ou condição imunológica alterada, ingestão regular de drogas como antiinflamatórios, antibióticos, imunossupressores, anticoagulantes, tratamento periodontal realizado a menos de 6 meses e uso de antibióticos nos últimos 6 meses.

Desenho experimental do estudo

Fase 1 (Tratamento)

Os pacientes foram aleatoriamente separados em dois grupos de tratamentos: Grupo 1 (G1) - terapia periodontal não-cirúrgica associada à terapia fotodinâmica (30 pacientes); Grupo 2 (G2) - terapia periodontal não-cirúrgica (15 pacientes). Durante esta fase, ambos os grupos receberam antibioticoterapia (doxiciclina 100mg/dia via oral) (Vibramicina 100mg/Pfizer, Guarulhos, SP, Brasil) durante 14 dias, após dose inicial de 200mg e instruções de higiene bucal para controle do biofilme dental.

Os dois grupos foram submetidos à terapia periodontal básica, por um especialista (periodontista), em duas sessões, num intervalo de 24 horas, por meio de raspagem (supragengival e subgengival) e alisamento radicular de toda a boca com a utilização de instrumentos manuais (curetas de Gracey; Hu-Friedy MFG. Co. Inc., Chicago, IL, EUA) e ultra-sônicos (Bob-Cat, Dentsply/Cavitron, Long Island City, NY, EUA). Contudo, quando necessário, a raspagem foi complementada num período de até dez dias após a segunda sessão de raspagem. A instrumentação envolveu quadrante por quadrante, até adequada instrumentação da área e alisamento radicular verificado com auxílio de uma sonda periodontal. No grupo G1, após a raspagem e alisamento radicular foi aplicada a terapia fotodinâmica nos sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm. Os indivíduos receberam profilaxia profissional de quinze em quinze dias durante os três primeiros meses após raspagem para o controle de biofilme supragengival. Nas visitas quinzenais de controle e avaliação, a cooperação do paciente ao estudo foi monitorada verificando-se o estado de higiene bucal e a correta utilização das medicações prescritas.

O registro dos parâmetros clínicos periodontais e as coletas de amostras de FG e placa subgengival foram realizados após 90 dias sempre nos mesmos sítios onde foram coletadas as amostras iniciais. A reavaliação dos níveis de HbA1c e glicemia em jejum (GJ) foram realizados após 90 dias.

Os dados e amostras coletados após 90 dias da realização do tratamento foram utilizados como dados iniciais para a Fase 2 do estudo.

Fase 2 (TPS)

A Fase 2 deste estudo consistiu na realização da terapia periodontal de suporte dos pacientes que participaram da Fase 1, 90 dias após a realização do tratamento periodontal não-cirúrgico. Os mesmos trinta pacientes pertencentes ao grupo G1 foram divididos aleatoriamente em dois grupos de quinze pacientes para a fase de TPS. Um grupo realizou os procedimentos para controle do biofilme dental e raspagem radicular com curetas manuais nos sítios maiores ou iguais a 4 mm que ainda apresentassem sangramento. Este grupo foi designado como G1-R (n=15). O outro grupo realizou os procedimentos para controle do biofilme dental e aplicação da terapia fotodinâmica em sítios iguais ou maiores do que 4 mm que ainda apresentassem sangramento. Este grupo foi designado como G1-F (n=15). Os pacientes do G2 realizaram os procedimentos para controle do biofilme dental e raspagem radicular com curetas manuais nos sítios maiores ou iguais a 4 mm que ainda apresentassem sangramento. Os procedimentos para controle do biofilme dental consistiram em reforço de higiene oral, profilaxia e polimento dental.

Os parâmetros clínicos periodontais, amostras de fluido gengival e placa subgengival, coleta de sangue para dosagem de HbA1c e GJ, foram realizadas três, seis e nove meses após a realização dos procedimentos da terapia de suporte.

Esses tempos correspondem respectivamente aos períodos de seis, nove e doze meses em relação aos dados iniciais da Fase 1. O desenho experimental e as reavaliações estão apresentadas de forma gráfica nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 – Fluxograma. G1-Tratamento periodontal não-cirúrgico + Terapia Fotodinâmica; G2-Tratamento periodontal não-cirúrgico; G1F-Terapia Periodontal de Suporte (Fotodinâmica); G1R-Terapia periodontal de Suporte (Raspagem).

Figura 2 - Cronograma de procedimentos, exames e coletas de amostras.

- a) Exame Clínico Periodontal
- b) Coleta de Fluido
- c) Coleta de Biofilme Subgengival
- d) Coleta de Sangue
- e) Exame Radiográfico
- f) Tratamento Periodontal Não-Cirúrgico + Terapia Fotodinâmica – G1
- g) Tratamento Periodontal Não-cirúrgico – G2
- h) Terapia Periodontal de Suporte (Raspagem) – G1R
- i) Terapia Periodontal de Suporte (Fotodinâmica) – G1F
- j) Terapia Periodontal de Suporte (Raspagem) – G2

O exame periodontal (clínico e radiográfico), os exames laboratoriais e as coletas e processamento das amostras de fluido gengival e biofilme subgengival foram realizados de acordo com os critérios descritos a seguir.

Exame clínico periodontal

O exame clínico periodontal foi feito por um único examinador durante todo o estudo. Depósitos de biofilme dental foram corados com solução evidenciadora para medir sua porcentagem sobre as superfícies dos dentes, sendo representada pelo índice de placa (IP). Concomitantemente a esse procedimento, os pacientes receberam instruções de higiene oral, incluindo a técnica de escovação, uso de fio dental e escova interdental e unitufo quando necessárias. A presença de biofilme dental foi avaliada dicotomicamente⁵⁵.

Para a realização do exame de sondagem periodontal, foram confeccionadas placas guia de acetato de 5 mm de espessura, obtidas através levantamento dos modelos de gesso dos arcos dentários de cada paciente. Sulcos de referência foram criados na superfície externa da placa com o auxílio de um disco de carborundum montado em mandril de baixa rotação. Foram realizadas seis canaletas por dente, referentes aos sítios a serem sondados para padronizar o ponto de inserção e inclinação da sonda periodontal.

Para a mensuração da profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) foi utilizada uma sonda periodontal computadorizada de pressão controlada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, U.S.A.). Foram avaliados 6 sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual), perfazendo um total de até 168 sítios por indivíduos, e obtidas as medidas de PS (medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa), e NIC

(medida da junção cimento-esmalte até a base da bolsa), ambas utilizando a ponta tipo “stent”.

A presença do sangramento à sondagem (SS) e supuração (SUP) foi considerada positiva quando ocorrida em até vinte segundos após a inserção da sonda para medida de PS. As porcentagens dos sítios com sangramento e supuração, avaliados dicotomicamente, foram calculados para cada indivíduo.⁵⁶

Exame radiográfico

O exame radiográfico consistiu em uma série periapical completa de cada paciente, com a técnica do paralelismo com auxílio de posicionadores radiográficos tipo “Han-Shin”. O exame radiográfico foi realizado como exame complementar ao diagnóstico e não fez parte dos resultados deste estudo.

Exames Laboratoriais

Os pacientes foram encaminhados para o laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP em datas predefinidas para a coleta de amostras de sangue. Foi colhido 15 ml de cada paciente, para a realização dos exames de HbA1c (Labtest Sistemas para Diagnostico, SP, Brasil) e glicemia em jejum (Glicose GOD-ANA enzimática, Labtest, Brasil).

Coleta do fluido gengival e análise da IL1- β

Foram coletados os fluidos do sítio de maior profundidade em dentes uniradiculares de cada quadrante de cada paciente para análise quantitativa da citocina IL1- β . Na existência de vários dentes com mesma profundidade num mesmo

quadrante foi escolhido o dente mais anterior, para evitar a contaminação salivar e pela facilidade de coleta⁵⁷. A coleta do fluido gengival foi realizada previamente aos procedimentos clínicos. O dente selecionado foi secado com ar e isolado com rolos de algodão. O biofilme supragengival foi cuidadosamente removido e o fluido gengival coletado com tiras de papel filtro de metilcelulose (Periopaper, Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, EUA) por 30 segundos. Após a remoção da tira de papel do sulco gengival, foi realizada a avaliação do volume do fluido coletado através de um dispositivo de mensuração eletrônico (Periotron 8000/Oraflow Inc., Plainview, NY, EUA) (Figura 3).

Figura 3 – Avaliação do volume de fluido coletado. A – Periotron 8000; B – Periopaper antes da coleta; C – Periopaper após a coleta do fluido gengival; D – Leitura do fluido.

Uma curva padrão correlacionando volumes conhecidos com valores obtidos pelo aparelho foi obtida e, a partir de um programa para análises estatísticas GraphPad Prism, demo version 5.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), uma regressão polinomial de quarta ordem foi aplicada ponto-a-ponto para determinação

do volume de FG colhido de cada sítio. A tira foi então retirada e transferida para um tubo de “eppendorf” isolado com um filme para evitar a evaporação do fluido. Após três minutos, o procedimento de coleta foi repetido para a obtenção de uma nova tira que foi utilizada para a avaliação do volume do fluido gengival através de um dispositivo de mensuração eletrônico (Periotron 8000, Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, EUA). Foram obtidas duas tiras de cada sítio, num total de oito tiras por paciente, que foram armazenadas num mesmo tubo “eppendorf”. Tiras contaminadas por sangue ou saliva foram descartadas. Todas as amostras foram estocadas a uma temperatura de -80C° até a análise (Bozkurt et al., 2006)⁵⁷.

As amostras de fluido gengival previamente absorvidas pelos filtros de papel foram eluídas em 200 µl de solução salina tamponada (PBS - *phosphate buffered saline*) contendo 0,1% de solução Tween 20 (USB Corpo., Cleveland, OH, EUA) e 1 µl de coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA). Os tubos foram agitados por trinta minutos e centrifugados a 10000 rpm por cinco minutos. A amostra foi dividida em alíquotas para a quantificação das citocinas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA - *enzymelinked immunosorbent assay*). O biomarcador avaliado foi a IL-1β, através do uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine HS IL-1β, ELISA kit, HSLB00C/HS600B R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Uma placa contendo 96 poços foi utilizada e preparada com anticorpo monoclonal específico contra a citocina a ser quantificada (anticorpo de captura), em cada poço, 24 horas antes do início do processamento das amostras. Todos os reagentes foram levados a temperatura ambiente e uma solução diluente foi adicionada em cada poço, que já apresentava o anticorpo monoclonal específico contra a citocina aderida. Os padrões e amostras foram adicionados aos poços,

permitindo a ligação da citocina ao anticorpo imobilizado. Após um período de incubação de três horas os poços foram lavados com solução tampão e um segundo anticorpo policlonal específico contra a citocina foi adicionado. A placa foi novamente incubada e lavada em seguida. Foi adicionado em todos os poços o substrato (NADPH), que inicia a reação colorimétrica catalisada pela fosfatase alcalina, 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 (μ Quant, Biotek Instruments, Wemont, USA), com absorvância em 490 nm. A curva padrão feita com os padrões fornecidos no kit serviram como parâmetro para a determinação das concentrações das proteínas. Sítios com níveis de citocina abaixo dos limites de detecção do teste foram estatisticamente estimadas como metade do menor valor detectado⁵⁸.

Coleta de biofilme subgengival e exame microbiológico

As amostras de biofilme foram retiradas dos mesmos quatro sítios em que foram coletados os fluidos gengivais. Os sítios foram primeiramente isolados com rolos de algodão estéreis e secos com jatos de ar; a placa supragengival foi removida com a utilização de uma cureta estéril; posteriormente, outra cureta estéril foi utilizada para a coleta de placa subgengival⁵⁹, da porção mais profunda da bolsa para a região coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais de 1,5 ml, tipo “eppendorf”, contendo 150 μ l de solução TE (pH 7,6) e, em seguida, foi acrescentado a estas, 100 μ l de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. O material

colhido nos quatro sítios foi armazenado num mesmo tubo “eppendorf” formando um pool das amostras de biofilme subgengival. As amostras foram identificadas e armazenadas a uma temperatura de -80°C até a análise⁶⁰.

As amostras foram analisadas através da técnica de *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization* para avaliação dos microorganismos presentes na placa bacteriana subgengival. Foram analisadas 40 bactérias descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA separados por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998; Socransky & Haffajee, 2002).

Espécie	CEPAS	Espécie	CEPAS
Complexo azul		Complexo laranja (continuação)	
<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>Aggregatibacter 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.

Hibridização DNA-DNA

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por dez minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi

depositada em uma das canaletas do Minislot (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA) (Figura 4) ficando, assim, concentrada em uma membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas das trinta canaletas do Minislot (Immunelectrics) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microorganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie correspondentes a 10^5 e 10^6 células, respectivamente. A membrana foi então removida do Minislot (Immunelectrics) e o DNA nela concentrado fixado por meio de aquecimento em forno a 120°C por vinte minutos⁶⁰.

Figura 4 - Minislot (Immunelectrics, Cambridge, Massachusetts, EUA).

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C , por uma hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x solução salina citratada - SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim)⁶⁰.

Em seguida, a membrana foi posicionada no Miniblotter (Immunelectrics) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do Miniblotter (Immunelectrics) adicionou-se uma sonda de DNA (diluída a

aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 x SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de vinte horas, a 42°C⁶⁰.

Deteccão das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do Miniblotter (Immunetics), lavada por quarenta minutos a 65°C numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por uma hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por trinta minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana depois foi lavada duas vezes, por vinte minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e uma vez, por cinco minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, pH 9,5. O passo seguinte foi a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-StarTM Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, RU, Inglaterra). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40 cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24 cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) por quarenta minutos. O filme, posteriormente, foi revelado manualmente pelo método

convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, mantidas à temperatura de 20°C⁶⁰.

Os filmes radiográficos foram lidos por um único examinador cego e calibrado. O sinal produzido pelas sondas foram comparados em intensidade ao sinal produzido pelas mesmas sondas nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 – foi equivalente a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 – aproximadamente 10^5 células; 3 – entre 10^5 e 10^6 células; 4 – aproximadamente 10^6 células e, finalmente, 5 – determinado como mais de 10^6 células. Esses registros foram então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos pools coletados de cada indivíduo.

Terapia fotodinâmica

Os grupos G1 e G1F receberam a terapia fotodinâmica de acordo com as instruções do fabricante que preconiza a aplicação da TFD em seis sítios por dente como indica a figura 6. No grupo G1, após raspagem e alisamento do elemento dental com curetas de Gracey (Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA) num tempo estipulado de instrumentação de 10 minutos (Schwarz et al., 2003), as bolsas periodontais foram irrigadas com água destilada e em seguida aplicado o fotosensibilizador cloreto de fenotiazina na concentração de 100µm/ml (Helbo® Blue, Helbo Medizintechnik GmbH, Áustria). O fotosensibilizador é fornecido pelo fabricante numa seringa de vidro juntamente com uma cânula de ponta romba em embalagens individualizadas de uso único. Sua aplicação foi realizada a partir do fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal até a margem gengival em seis sítios por dente, deixando-a agir por um minuto. Após este tempo foram removidos os excessos irrigando a área com

água destilada. Em seguida, a área corada foi então irradiada com um *laser* de diodo (Helbo Medizintechnik GmbH, Áustria), com um comprimento de onda de 660 nm e uma potência máxima de 60 mW/cm². Cada sítio do dente a ser tratado foi irradiado por 10 segundos totalizando 60 segundos por dente. Para a irradiação dos sítios foram utilizadas pontas tipo 3D para (Figuras 5 e 6) que permaneceram estáticas durante os 10 segundos de irradiação de cada sítio na posição mais apical possível. Após a irradiação, os sítios foram irrigados com solução salina. No grupo G1-F foi aplicada somente a terapia fotodinâmica nos sítios que apresentaram as condições previamente descritas.

Figura 5 – A-Laser de diodo (HELBO® *TheraLite Laser*) empregado na pesquisa. B-Desenho esquemático da ponta 3D utilizada no meio subgengival.

Fonte: figuras retiradas do material didático fornecido pelo fabricante.

Figura 6 – A-Bolsa contaminada. B-Raspagem da bolsa. C-Aplicação do fotosensibilizador (cloreto de fenotiazina). D-Lavagem da bolsa com soro fisiológico. E- Aplicação do *laser* com ponta 3D. F- Setas indicam os seis pontos que são irradiados durante os sessenta segundos de aplicação do *laser*.

Fonte: figuras retiradas do material didático fornecido pelo fabricante.

Análise Estatística

A análise estatística dos resultados microbiológicos e imunoenzimáticos foi realizada considerando-se um único dado de cada paciente, referente ao pool de amostras coletadas em cada tempo. Os dados microbiológicos em ambas as etapas foram transformados em escala logarítmica. Para avaliação da normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, admitindo-se o nível de significância de 5%. Como a distribuição da amostra não foi normal, os dados foram submetidos a testes não-paramétricos. Para análise estatística da Fase 1, foram utilizados os testes de Mann-Whitney (entre-grupos) e Wilcoxon (intra-grupos). Para a análise dos

resultados da Fase 2, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis (entre-grupos) e o de Friedman (intra-grupos). Quando houve diferença significativa na análise intra-grupos, foi empregado o teste complementar de Dunn. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

5 Resultados

Fase 1 – Tratamento

Todos os 45 participantes desta fase da pesquisa realizaram as reavaliações previstas nos tempos determinados. Todos os pacientes envolvidos no estudo receberam a medicação prevista. Não houve o relato de efeitos adversos e todos os indivíduos relataram ter utilizado a medicação da maneira como foi prescrita, pelo tempo determinado. Do início do tratamento ao tempo de três meses, nenhum paciente relatou ajustes na dieta e em medicações previamente prescritas pelo médico que realiza o acompanhamento de sua diabetes.

Houve uma maior prevalência de mulheres em ambos os grupos como demonstra a Tabela 1. Os dados iniciais demonstram uma similaridade entre os grupos para todos os parâmetros clínicos e laboratoriais avaliados (Tabela 2).

Tabela 1 – Dados demográficos.

Variável	TP	TP+TFD
Homens	5	11
Mulheres	10	19
Média de idade (anos)	50,41 ± 8,18	50,33 ± 6,02

Após a terapia estipulada pelo protocolo da pesquisa, houve uma redução significativa dos parâmetros clínicos avaliados entre o exame inicial e a reavaliação de 3 meses ($P<0,001$). As profundidades de sondagem foram divididas em três grupos (profundidade de sondagem $\leq$ a 3 mm, 4 a 5 mm e $\geq$ a 6 mm) não havendo diferenças entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da terapia periodontal da Fase 1 (Inicia e 3 meses).

Parâmetros Clínicos	G1 (n=30)	G2 (n=15)	*Valor de <i>P</i>
Profundidade de Sondagem (PS) (mm)			
Inicial	2,34 ± 0,47	2,54 ± 0,53	NS
3 meses	1,71 ± 0,51	1,92 ± 0,62	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,05	<0,05	
Nível de Inserção Clínica (mm)			
Inicial	3,13 ± 0,84	3,25 ± 0,97	NS
3 meses	2,57 ± 0,54	2,79 ± 0,82	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,01	<0,01	
Índice de Placa (%)			
Inicial	59,24 ± 17,52	63,72 ± 16,92	NS
3 meses	17,78 ± 12,62	19,56 ± 15,46	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,001	<0,001	
Sangramento à Sondagem (%)			
Inicial	62,3 ± 12,2	64,5 ± 12,5	NS
3 meses	15,8 ± 5,2	15,7 ± 7,5	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,001	<0,001	
Supuração (%)			
Inicial	1,5 ± 1,4	1,1 ± 1,8	NS
3 meses	0,0±0,0	0,0±0,0	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,001	<0,001	
Nº de sítios com PS ≤ 3 mm			
Inicial	91,66 ± 25,79	104,33 ± 22,13	NS
3 meses	121,09 ± 27,23	119,53 ± 29,09	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,001	<0,02	
Nº de sítios com PS de 4 a 5 mm			
Inicial	36,33 ± 12,84	35,63 ± 26,10	NS
3 meses	19,53 ± 8,51	16,66 ± 8,19	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,001	<0,001	
Nº de sítios com PS ≥ 6 mm			
Inicial	7,16 ± 2,74	8,04 ± 2,35	NS
3 meses	2,06 ± 1,17	2,46 ± 0,91	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,001	<0,001	

NS – Não Significante ($P>0,05$)

* Teste de Mann-Whitney para comparações entre-grupos (horizontal)

** Teste de Wilcoxon para comparações intra-grupos (vertical)

Os parâmetros metabólicos avaliados (HbA1c e glicemia em jejum) não apresentaram diferenças entre os grupos em todos os períodos avaliados. A análise intra-grupos demonstrou uma diferença significativa na redução da HbA1c e glicemia em jejum para o grupo G1 (Tabela 3). As variações dos resultados da HbA1c podem ser observadas no Gráfico 1.

Tabela 3 – Resultados de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) e Glicemia em Jejum (GJ).

Grupos	HbA1c (%)			GJ (mg/dl)		
	Inicial	3 meses	*P	Inicial	3 meses	*P
G1	8,52 ± 0,93	7,5 ± 0,7	0,01	163,53 ± 68,04	154,54 ± 62,45	0,01
G2	8,27 ± 0,82	7,7 ± 0,9	NS	159,1 ± 74,52	166,66 ± 49,79	NS
** P	NS	NS		NS	NS	

NS – Não Significante ($P > 0,05$)

* Teste de Mann-Whitney para comparações entre-grupos (horizontal)

** Teste de Wilcoxon para comparações intra-grupos (vertical)

Análise entre-grupos (Mann-Whitney - $p > 0,05$)

* Análise intra-grupos (Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$)

Gráfico 1 – Variação da HbA1c na Fase 1 - Tratamento.

A análise da citocina pró-inflamatória IL1- β não demonstrou diferenças entre os grupos G1 e G2 no exame inicial e 3 meses após terapia. Houve uma redução significativa nos níveis creviculares da IL1- β entre o exame inicial e 3 meses ($P<0,05$). Para as amostras que se apresentaram no exame de reavaliação abaixo do nível detectável foi considerado o menor valor indicado pela curva padrão estipulada (Gráfico 2).

Análise entre-grupos (Mann-Whitney, $P>0,05$): letras diferentes indicam diferença estatística significativa

Análise intra-grupos (Wilcoxon signed rank test, $P<0,05$): letras diferentes indicam diferença estatística significativa

Gráfico 2 – Níveis de IL1- β nos grupos G1 e G2: Inicial e 3 meses.

Os resultados microbiológicos demonstraram uma similaridade entre a presença de espécies bacterianas entre os grupos no início do tratamento ($P>0,05$). Após a terapia houve a mudança no padrão microbiológico de ambos os grupos. Ambas as terapias reduziram significativamente as bactérias do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) ($P<0,05$), como demonstra o Gráfico 3.

Análise entre-grupos (Teste de Mann-Whitney, $P > 0,05$)

*Análise intra-grupos (Teste de Wilcoxon, $P < 0,05$)

Gráfico 3 – Médias de contagem das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival na fase 1 do estudo nos grupos G1 e G2.

Fase 2 – TPS

Na fase de TPS todos os pacientes participaram da pesquisa até a reavaliação de 3 e 6 meses. A partir desse tempo dois pacientes do grupo G1-R, três pacientes do G1-F e dois pacientes do G2 abandonaram a pesquisa. Portando para os grupos G1-R, G1-F e G2 o tamanho da amostra foi de 13, 12 e 13 pacientes, respectivamente. Na reavaliação de 12 meses um paciente do grupo G1-R e um do Grupo G2 abandonaram a pesquisa, permanecendo cada grupo com 12 pacientes.

Nessa fase da pesquisa não houve diferenças significativas entre os grupos para os seguintes parâmetros: PS, NIC, IP e SS. Não houve nessa fase a presença de supuração em nenhum sítio avaliado. Quando os sítios foram separados por grupos de profundidade, houve diferença entre 3 meses e os demais tempos para o número de sítios com profundidades ≤ 3 mm, de 4 a 5 mm e ≥ 6 mm nos grupos avaliados, à exceção do grupo G1-F que apresentou diferença significativa somente entre 3 e 6 meses (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados clínicos da terapia periodontal de suporte - Fase 2: 3, 6, 9 e 12 meses.

(continua)

Parâmetros Clínicos	G1-R	n	G1-F	n	G2	n	*Valor de P
PS (mm)							
3 meses	1,73 $\pm$ 0,28	15	1,76 $\pm$ 0,44	15	1,92 $\pm$ 0,62	15	NS
6 meses	1,72 $\pm$ 0,32	15	1,74 $\pm$ 0,35	15	1,98 $\pm$ 0,57	15	NS
9 meses	1,73 $\pm$ 0,47	13	1,78 $\pm$ 0,51	12	1,91 $\pm$ 0,65	13	NS
12 meses	1,77 $\pm$ 0,33	12	1,85 $\pm$ 0,32	12	2,03 $\pm$ 0,57	12	NS
**Valor de P	NS		NS		NS		
NCI (mm)							
3 meses	2,56 $\pm$ 0,84	15	2,38 $\pm$ 0,28	15	2,79 $\pm$ 0,82	15	NS
6 meses	2,62 $\pm$ 0,81	15	2,39 $\pm$ 0,34	15	2,69 $\pm$ 0,62	15	NS
9 meses	2,76 $\pm$ 0,77	13	2,54 $\pm$ 0,35	12	2,73 $\pm$ 0,60	13	NS
12 meses	2,78 $\pm$ 0,79	12	2,53 $\pm$ 0,56	12	2,71 $\pm$ 0,62	12	NS
**Valor de P	NS		NS		NS		
IP (%)							
3 meses	20,53 $\pm$ 1,97	15	18,62 $\pm$ 15,44	15	19,56 $\pm$ 15,46	15	NS
6 meses	18,12 $\pm$ 10,14	15	16,42 $\pm$ 20,05	15	17,35 $\pm$ 12,54	15	NS
9 meses	21,34 $\pm$ 14,92	13	20,31 $\pm$ 12,34	12	18,97 $\pm$ 15,02	13	NS
12 meses	20,79 $\pm$ 20,12	12	17,52 $\pm$ 0,55	12	21,94 $\pm$ 10,02	12	NS
**Valor de P	NS		NS		NS		
SS (%)							
3 meses	14,74 $\pm$ 8,42	15	15,61 $\pm$ 7,26	15	15,71 $\pm$ 7,54	15	NS
6 meses	13,83 $\pm$ 9,29	15	13,15 $\pm$ 5,24	15	13,43 $\pm$ 4,22	15	NS
9 meses	15,91 $\pm$ 6,32	13	14,82 $\pm$ 4,76	12	15,03 $\pm$ 3,23	13	NS
12 meses	16,32 $\pm$ 3,14	12	15,02 $\pm$ 3,12	12	16,74 $\pm$ 2,34	12	NS
**Valor de P	NS		NS		NS		

Tabela 4 – Resultados clínicos da terapia periodontal de suporte - Fase 2: 3, 6, 9 e 12 meses.

(conclusão)

Parâmetros Clínicos	G1-R	n	G1-F	n	G2	n	* Valor de <i>P</i>
Nº de sítios com PS ≤ 3 mm							
3 meses	122,53 ± 44,92 ^a	15	120,24 ± 36,66 ^a	15	119,53 ± 55,50 ^a	15	NS
6 meses	129,34 ± 43,70 ^b	15	127,26 ± 35,07 ^b	15	127,06 ± 36,36 ^b	15	NS
9 meses	131,73 ± 40,01 ^b	13	128,06 ± 44,32 ^b	12	129,46 ± 31,23 ^b	13	NS
12 meses	130,13 ± 31,25 ^b	12	127,57 ± 40,01 ^b	12	127,39 ± 33,21 ^b	12	NS
**Valor de <i>P</i>	0,05		0,05		0,05		
Nº de sítios com PS 4 a 5 mm							
3 meses	18,46 ± 7,48 ^a	15	20,06 ± 7,16 ^a	15	16,66 ± 8,19 ^a	15	NS
6 meses	9,53 ± 5,96 ^b	15	12,06 ± 5,25 ^b	15	9,26 ± 5,42 ^b	15	NS
9 meses	8,46 ± 5,23 ^b	13	11,06 ± 4,68 ^b	12	7,86 ± 5,09 ^b	13	NS
12 meses	8,56 ± 4,73 ^b	12	12,13 ± 5,51 ^b	12	8,06 ± 4,82 ^b	12	NS
**Valor de <i>P</i>	<0,001		<0,001		<0,002		
Nº de sítios com PS ≥ 6 mm							
3 meses	2,20 ± 1,08 ^a	15	1,93 ± 1,27 ^a	15	2,46 ± 0,91 ^a	15	NS
6 meses	0,80 ± 0,56 ^b	15	1,06 ± 0,88 ^b	15	0,73 ± 0,48 ^b	15	NS
9 meses	0,66 ± 0,48 ^b	13	1,20 ± 0,86 ^{ab}	12	0,60 ± 0,41 ^b	13	NS
12 meses	0,73 ± 0,48 ^b	12	1,26 ± 0,86 ^{ab}	12	0,66 ± 0,51 ^b	12	
**Valor de <i>P</i>	<0,05		<0,05		<0,05		

NS – Não Significante ($P > 0,05$)

*Teste de Kuskal-Wallis para comparações entre-grupos (horizontal)

**Teste de Friedman para comparações intra-grupos (vertical) - letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística (Teste complementar de Dunn – $P < 0,05$)

Os resultados de HbA1c e GJ não demonstraram alterações significativas em ambos os grupos nos tempos avaliados ($P > 0,05$). A análise intra-grupo também não apontou diferenças entre os intervalos de tempos dos grupos avaliados ($P > 0,05$) (Gráficos 4 e 5).

Análise entre-grupos (Kruskal-Wallis, $P>0,05$)

Análise intra-grupos (Friedman, $P>0,05$)

Gráfico 4 – Variação da HbA1c nos períodos de avaliação da Fase 2 – TPS.

Análise entre-grupos (Kruskal-Wallis, $P>0,05$)

Análise intra-grupos (Friedman, $P>0,05$)

Gráfico 5 – Resultados da Glicemia em jejum nos períodos de avaliação da Fase 2 -TPS.

Os resultados da quantificação da IL1- β no fluido gengival apontaram uma diferença significativa intra-grupo entre os tempos de 3 e 6 meses e entre 6 e 12 meses para o grupo G1-R (Gráfico 6).

Análise entre-grupos (Kruskal-Wallis, $P>0,05$)

*Análise intra-grupos (Friedman, $P<0,05$), Teste complementar de Dunn ($P<0,05$)

Gráfico 6 – Variação dos níveis de IL1- β na Fase 2 – TPS.

Os resultados da análise microbiológica estão representados em escala logarítmica de 10 (Gráfico 7). Não houve diferenças significativas em relação às bactérias do complexo vermelho na análise entre e intra-grupos em todos os tempos experimentais.

Análise entre-grupos (Mann-Whitney, $P > 0,05$)

* Diferença significativa entre 3 e 6 meses (Teste de Friedman/Teste de Dunn, $P < 0,05$)

† Diferença significativa entre 3 e 9 meses (Teste de Friedman/Teste de Dunn, $P < 0,05$)

⊗ Diferença significativa entre 3 e 12 meses (Teste de Friedman/Teste de Dunn, $P < 0,05$)

Gráfico 7 – Médias de contagem das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos grupos G1 e G2.

6 Discussão

Os resultados clínicos demonstraram uma similaridade entre os grupos na fase de tratamento para todos os parâmetros avaliados. O grupo G1 recebeu uma única aplicação TFD após a raspagem e alisamento dos sítios comprometidos de modo similar a estudos prévios que avaliaram a TFD como adjuvante à terapia periodontal não-cirúrgica. Esses estudos demonstraram de maneira semelhante aos nossos resultados que uma única aplicação da TFD após raspagem manual⁶¹ ou instrumentação ultra-sônica⁶², não foi capaz de produzir resultados clínicos melhores do que somente a aplicação da terapia convencional. Contudo, esses estudos foram conduzidos com pacientes saudáveis e sem administração de antibioticoterapia sistêmica. Um estudo recente de Al-Zahrani et al. (2009)⁶³ avaliou os efeitos de uma única aplicação TFD como adjuvante ao tratamento 45 pacientes diabéticos tipo 2 divididos em 3 grupos segundo o tipo de tratamento. Quinze pacientes realizaram somente raspagem e alisamento radicular (RAR), 15 pacientes realizaram RAR mais doxicilina sistêmica e 15 pacientes foram tratados com RAR mais TFD. Os resultados demonstraram que após 3 meses da terapia não houve diferenças em todos os parâmetros clínicos avaliados bem como não houve diferenças entre os tratamentos para a HbA1c.

O efeito antimicrobiano da TFD não produzir efeitos clínicos adicionais à descontaminação manual e à antibioticoterapia sistêmica. Isso provavelmente ocorreu pelo fato da raspagem convencional já ser, por si só, um meio comprovadamente eficaz na redução e ou eliminação tanto do biofilme dental como de cálculos subgengivais e cemento necrótico⁶⁴⁻⁶⁶. Além disso a doxiciclina possui efeitos sobre periodontopatógenos, metaloproteinases além de bloqueio da Kinase C, relacionada à diminuição de secreção de citocinas pró-inflamatórias, que podem ter influência na remissão da inflamação dos tecidos periodontais.^{30, 31, 67} Isso talvez

indique a dificuldade, no protocolo estabelecido pelo estudo, em se demonstrar algum efeito adicional da TFD com adjuvante ao tratamento periodontal. Por isto, talvez sejam necessárias maiores amostras ou um maior número de aplicações da TFD para avaliar melhor a sua função como adjuvante à terapia periodontal não-cirúrgica como demonstrou Lulic et al. (2009)⁶⁸, que apontaram diferenças clínicas significantes com a aplicação da TFD após raspagem, 5 vezes, num período de duas semanas, em sítios residuais.

Tanto o presente estudo como estudos anteriores não aplicaram a TFD como monoterapia (sem instrumentação manual) em pacientes com periodontite crônica não-tratada^{61, 62, 68-70}. Isso se deve ao fato de, apesar de possuir um efeito previamente avaliado sobre a redução da microbiota sugengival, a TFD não é capaz de remover o cálculo e cemento necrótico, importantes na patogênese periodontal com fatores retentivos de biofilme subgengival^{71, 72}. Além disso, não há informações ainda sobre como o efeito da TFD pode ser limitada pela organização estrutural do biofilme, que é desfeita ao serem utilizados instrumentos manuais. Contudo, na doença periodontal agressiva, a aplicação da TFD como monoterapia realizada por Oliveira et al., obteve resultados clínicos semelhantes à raspagem e alisamento radicular⁷³.

Durante a fase de TPS, a TFD (grupo G1-F) apresentou na análise entre-grupos resultados similares aos grupos G1-R e G2 após 3, 6 e 9 meses à realização da terapia periodontal de suporte. Estudos prévios também avaliaram a TFD durante a TPS, porém em pacientes saudáveis e como adjuvantes à diferenças clínicas em relação à raspagem somente^{68, 69}. Não há até o momento estudos que demonstrem o efeito da TFD sem a associação com raspagem para uma devida comparação de resultados. Como todos os sítios tratados neste estudo foram instrumentados

durante a Fase 1 (tratamento), presume-se que cálculos e cimento necrótico foram totalmente removidos. Assim, a descontaminação bacteriana promovida pela TFD nesta fase resultou numa estabilidade clínica semelhante entre os grupos, podendo ser mantida através das reavaliações⁷¹. Esta estabilidade também pode ter sido influenciada pela antibioticoterapia realizada na fase de tratamento, pois um estudo de Lopez et al. (2006)⁷⁴ demonstraram a possibilidade de a terapia antimicrobiana sistêmica alcançar resultados semelhantes ao da raspagem 12 meses após o tratamento inicial.

A análise intra-grupos apontou uma redução significativa do número de sítios com profundidades de 4 a 5mm e ≥ 6 mm no tempo de 6 meses, ou seja, 3 meses após a aplicação da TFD na fase 2(Tabela 4). Nesta fase a TFD foi aplicada como monoterapia e isso é particularmente interessante para o paciente diabético pelo fato de ser uma terapia antimicrobiana que até o momento não apresenta os riscos dos efeitos colaterais, bem como de resistência antimicrobiana associado a um menor trauma quando comparado à raspagem convencional. Contudo a redução no tempo de 6 meses em sítios ≥ 6 mm observada no grupo G1-F não se manteve significativa nas avaliações de 9 e 12 meses (Tabela 4). Isso talvez se deva ao fato de a TFD ser capaz de reduzir a contaminação bacteriana sem, contudo, alterar a superfície radicular. Já a raspagem realizada nos grupos G1-R e G2 pode ter contribuído para a raspagem e alisamento adicionais aos procedimentos realizados na fase de tratamento.

Os pacientes do grupo G1-R apesar de não terem sido tratados com a TFD nesta fase, receberam a terapia na fase de tratamento. Um possível efeito adicional da TFD sobre os sítios tratados poderia ter influenciado os resultados do procedimento de raspagem na fase de TPS. Contudo, pela similaridade de

resultados em relação com o grupo controle, parece que não houve tal influência, que pode ser justificada pelo fato de a TFD ter sido realizada de maneira pontual, ou seja, numa única aplicação.

Outro fator importante a ser discutido em relação aos resultados clínicos da fase de TPS é a influência do controle do biofilme supragengival para a manutenção da saúde periodontal. Os resultados apontam uma similaridade no nível de controle do biofilme dental, bem como de sangramento gengival durante os tempos de reavaliação⁷⁵. Estudos anteriores apontam que a realização de terapia periodontal de suporte a cada 3 meses seria suficiente para a manutenção dos resultados da terapia periodontal. Os pacientes desse estudo foram controlados mensalmente até ser completado o período de reavaliação⁷⁶⁻⁷⁸. Assim, o controle do biofilme supragengival certamente foi importante para a estabilidade dos resultados em todos os grupos da fase de TPS.

A HbA1c é o parâmetro de avaliação do diabetes sugerido pela literatura para a monitoração do controle glicêmico do paciente diabético^{14, 79, 80}. O exame baseia-se na detecção da ligação não-enzimática das moléculas de glicose à hemoglobina circulante na corrente sanguínea. Como o tempo de vida médio de uma hemácia é em torno de 123 ± 23 dias, o resultados desse exame dá uma medida aproximada do nível glicêmico do paciente nos últimos 3 meses^{4, 81}. Os resultados demonstraram uma melhora significativa para a HbA1c dos pacientes do grupo G1 onde a TFD foi aplicada (Tabela 3, Gráfico 1). Em estudo prévio realizado por O'Connel et al. uma redução significativa da HbA1 em pacientes diabéticos tipo 2 após a terapia periodontal associada à administração de doxiciclina foi alcançada após realização de protocolo semelhante ao aplicado ao grupo G2⁸⁰, que em nosso estudo não resultou em alterações significativas, apesar de ter sido tratado com protocolo

semelhante. Isso pode ser explicado pela média inicial de HbA1c mais elevada (em torno de 10 a 11%) compara à média inicial do nosso estudo (em torno de 8%). Pacientes diabéticos que apresentam altas taxas de HbA1c podem sofrer maiores variações de reduções provocadas tanto pelo tratamento periodontal quanto por ajuste em dieta e medicamentos hipoglicêmicos, hábitos e estresse. Quanto mais próximo do padrão de normalidade ($HbA1C < 7\%$), maior a probabilidade de o controle glicêmico ser feito através somente da dieta⁸². Exceto a terapia periodontal, os demais fatores mencionados não foram monitorados pela pesquisa.

Resultados de redução de HbA1c em pacientes diabéticos devem ser vistos com cautela. Por ser o diabetes uma síndrome sistêmica, vários fatores podem influenciar no seu controle glicêmico. Resultados desse estudo demonstram que apesar do controle da infecção periodontal, a HbA1c de alguns pacientes aumentaram após a terapia, como pode ser observado pelo aumento do desvio-padrão visto no Gráfico 1. Apesar de não haver relatos por parte de pacientes sobre alterações do controle de dieta durante a Fase 1 da pesquisa, a falha na ingestão de medicamentos hipoglicêmicos ou situações de estresse podem ter influenciado em sua glicemia.

As alterações intra-grupos da HbA1c indicaram uma redução significativa após 3 meses somente para o grupo G1. Contudo esse grupo foi composto de 30 pacientes, ou seja, o dobro de pacientes do que o grupo G2. Um menor número de pacientes pode levar a uma menor sensibilidade da análise estatística, ou seja, maiores variações seriam necessárias para a detecção de diferenças significativas.

Durante a fase 2 (TPS) não houve diferenças significativas para a HbA1c entre os grupos e entre os tempos avaliados. Segundo Grossi et al.²⁶ avaliação do controle glicêmico após 3 meses de terapia é difícil pela necessidade de ajuste em

dieta e medicações dos pacientes. No grupo G1-R e G2 houve uma tendência de redução da HbA1c no tempo de 12 meses. Contudo, devemos salientar que dois pacientes em cada grupo mudaram a medicação para controle glicêmico, tendo sido prescrita para esses indivíduos insulina. A administração de insulina a pacientes diabéticos tipo 2 pode ocorrer dependendo da dificuldade de controle do seu estado glicêmico. O fato de ser administrada a insulina a esses pacientes não muda o seu diagnóstico de diabéticos tipo 2⁸².

Os resultados da glicemia em jejum foram semelhantes para ambos os grupos. Todavia, salientamos que segundo Janket et al. (2005)⁴⁸, a glicemia em jejum não é um bom parâmetro de avaliação para o controle glicêmico do paciente. Esta avaliação é um dado referente ao momento em que o paciente realiza o exame. Por isto, variações podem ocorrer de acordo com fatores outros como o respeito do período de jejum, o estresse emocional no momento do exame que pode levar a uma variação do nível glicêmico no momento do exame. Por esses motivos, a glicemia em jejum não é um parâmetro confiável para a avaliação do controle metabólico do paciente diabético.

A análise da IL1- β presente no fluido sofreu uma redução significativa após a terapia periodontal e se manteve sem alterações significativas para ambos os grupos durante a TPS. Como em nossos resultados, a presença de altos níveis de IL1- β no fluido gengival de pacientes diabéticos também foi encontrado por Engebretson et al. (2004)^{51, 83}. A redução de IL1- β após a terapia periodontal não-cirúrgica corrobora com resultados de estudos anteriores^{84, 85}. Entretanto, não há até o momento dados prévios sobre os níveis creviculares de IL1- β e suas variações, na fase de manutenção, em diabéticos. É certo, segundo nossos resultados, que a aplicação da TFD na TPS obteve efeito semelhante aos grupos de raspagem, o que

pode indicar sua eficiência na manutenção dos níveis dessa citocina que está relacionada ao processo inflamatório dos tecidos periodontais^{51, 83, 86}.

As espécies bacterianas detectadas no presente estudo estão em concordância com os resultados qualitativos da microbiota presente em pacientes brasileiro com periodontite crônica não-tratados sistemicamente saudáveis⁸⁷. Essa comparação entre estudos com diabéticos e não-diabéticos pode ser possível pois resultados de Hintao et al. demonstraram não haver diferenças entre a microbiota subgengival de diabéticos e não-diabéticos⁸⁸.

Os resultados da análise microbiológica apontaram uma redução significativa das bactérias periodontopatogênicas que compõem o grupo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) descrito por Sockansky et al. após a fase de tratamento periodontal sem diferenças entre os grupos⁸⁹. Estudos prévios também apontaram uma redução das bactérias do complexo vermelho após a raspagem^{90, 91}. É importante salientar que ambos os grupos receberam antibioticoterapia que por si só é capaz de reduzir os níveis bacterianos do biofilme subgengival. Dessa forma torna-se difícil a evidenciação do efeito da a TFD sobre pacientes tratados com antibioticoterapia concomitante. Também por esse motivo os resultados da TPS devem ser discutidos com atenção pois não podemos mensurar com exatidão o efeito residual da antibioticoterapia sistêmica aplicada em pacientes diabéticos já que, um estudo prévio demonstrou que a aplicação de uma terapia antimicrobiana sistêmica (amoxicilina+metronidazol) tem a capacidade de produzir uma redução significativa dos patógenos periodontais 12 meses após a sua aplicação como monoterapia, ou seja, sem a realização de raspagem.

Durante a TPS não houve diferenças entre os níveis bacterianos entre os grupos. Colombo et al. avaliaram o efeito da raspagem sobre a microbiota de

pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica e demonstraram, assim como nossos resultados, que a terapia convencional de raspagem é capaz de reduzir a prevalência e os níveis de bactérias do complexo vermelho após 3, 6 e 9 meses de controle ⁹¹. Após a aplicação da TFD aos 3 meses houve redução significativa da quantidade de algumas espécies bacterianas, porém as bactérias do complexo vermelho não sofreram alterações significativas.

O grupo G1-F apresentou resultados microbiológicos semelhantes aos outros dois grupos. Não há até o momento estudos em diabéticos avaliando a TFD para a comparação de resultados. Estudo de Chondros et al., em pacientes não-diabéticos, avaliaram a TFD como adjuvante à raspagem na TPS do tratamento periodontal⁶⁹. O estudo falhou em demonstrar alterações significativas na composição bacteriana com uma única aplicação da TFD após raspagem.

Os resultados de nossa pesquisa indicam que a TFD como terapia adjuvante ao tratamento não-cirúrgico não foi capaz de promover resultados mais favoráveis em relação aos parâmetros avaliados quando comparado ao G2. Contudo, os resultados da TPS apontam a TFD como uma alternativa terapêutica para o controle da doença periodontal de pacientes diabéticos, especialmente por ser uma terapia indolor e não-invasiva que demonstrou ser similar à raspagem e alisamento radicular.

7 Conclusões

A partir da metodologia utilizada e dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

- A aplicação da TFD como adjuvante à terapia periodontal, em uma única aplicação, não foi capaz de promover efeitos adicionais sobre os parâmetros clínicos, laboratoriais e microbiológicos avaliados, bem como sobre os níveis de IL1- β presentes no fluido gengival;

- A aplicação da TFD na TPS promoveu resultados semelhantes em relação aos grupos G1-R e G2 para todos os parâmetros avaliados.

Referências Bibliográficas

1. Scannapieco FA. Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol* 1998;69:841-850.
2. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;55:65-85.
3. Puavilai G, Chanprasertyotin S, Sriphrapradaeng A. Diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: 1997 criteria by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ADA), 1998 WHO consultation criteria, and 1985 WHO criteria. World Health Organization. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;44:21-26.
4. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000* 2007;44:127-153.
5. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329-334.
6. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-131.
7. Novaes AB, Jr., Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I-- Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996;7:65-73.
8. Novaes AB, Jr., Pereira AL, de Moraes N, Novaes AB. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J Periodontol* 1991;62:116-122.
9. Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol* 1998;25:112-124.
10. Westfelt E, Rylander H, Blohme G, Jonasson P, Lindhe J. The effect of periodontal therapy in diabetics. Results after 5 years. *J Clin Periodontol* 1996;23:92-100.
11. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001;6:99-112.
12. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2001;28:306-310.
13. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001;6:125-137.
14. Rodrigues DC, Taba MJ, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol* 2003;74:1361-1367.
15. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993;64:243-253.
16. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:932-940.
17. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with

- alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 2000;27:897-903.
18. Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol* 1984;55:325-335.
 19. Renvert S, Dahlen G, Wikstrom M. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. *J Periodontol* 1996;67:562-571.
 20. Stabholz A, Nicholas AA, Zimmerman GJ, Wikesjo UM. Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1998;25:794-800.
 21. Seppala B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1994;21:161-165.
 22. Aldridge JP, Lester V, Watts TL, Collins A, Viberti G, Wilson RF. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1995;22:271-275.
 23. Smith GT, Greenbaum CJ, Johnson BD, Persson GR. Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *J Periodontol* 1996;67:794-802.
 24. Williams RC, Jr., Mahan CJ. Periodontal disease and diabetes in young adults. *J Am Med Assoc* 1960;172:776-778.
 25. Miller LS, Manwell MA, Newbold D, et al. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol* 1992;63:843-848.
 26. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol* 1997;68:713-719.
 27. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* 1996;10:45-78.
 28. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol 2000* 2000;24:226-238.
 29. Sasaki T, Ramamurthy NS, Yu Z, Golub LM. Tetracycline administration increases protein (presumably procollagen) synthesis and secretion in periodontal ligament fibroblasts of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Periodontol Res* 1992;27:631-639.
 30. Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol* 2001;6:138-145.
 31. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2001;72:774-778.
 32. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905.
 33. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990;5:281-293.
 34. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28.

35. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 1993;75:299-306.
36. Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol* 1997;65:441-445.
37. Paardekooper M, De Bruijne AW, Van Steveninck J, Van den Broek PJ. Intracellular damage in yeast cells caused by photodynamic treatment with toluidine blue. *Photochem Photobiol* 1995;61:84-89.
38. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992;25:77-81.
39. Wilson M, Yianni C. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. *J Med Microbiol* 1995;42:62-66.
40. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72:676-680.
41. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J* 1994;44:181-189.
42. Martinetto P, Gariglio M, Lombard GF, Fiscella B, Boggio F. Bactericidal effects induced by laser irradiation and haematoporphyrin against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Drugs Exp Clin Res* 1986;12:335-342.
43. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology 2000* 2009;51:109-140.
44. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* 1992;37:883-887.
45. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 1993;28:204-210.
46. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992;15:1509-1516.
47. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults--United States, 1999-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:833-837.
48. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res* 2005;84:1154-1159.
49. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991;26:230-242.
50. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
51. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2004;75:1203-1208.
52. Kurtis B, Tuter G, Serdar M, et al. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:1849-1855.
53. Salvi GE, Kandyaki M, Troendle A, Persson GR, Lang NP. Experimental gingivitis in type 1 diabetics: a controlled clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol* 2005;32:310-316.

54. Machtei EE, Christersson LA, Grossi SG, Dunford R, Zambon JJ, Genco RJ. Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol* 1992;63:206-214.
55. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol* 1972;43:38.
56. Ainamo J, Bay I. [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet* 1976;80:149-152.
57. Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Sutcu R, Delibas N, Demirel R. Gingival crevicular fluid leptin levels in periodontitis patients with long-term and heavy smoking. *J Periodontol* 2006;77:634-640.
58. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 2007;23:1-7.
59. Teles FR, Haffajee AD, Socransky SS. The reproducibility of curet sampling of subgingival biofilms. *J Periodontol* 2008;79:705-713.
60. Gursky LC. Efeito do controle de placa subgengival na recolonização bacteriana subgengival após raspagem e alisamento radiculares. In: *Dissertação* Guarulhos - SP, 2005:75.
61. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008;79:1638-1644.
62. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;36:575-580.
63. Al-Zahrani MS, Bamshous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol* 2009;80:1568-1573.
64. Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol* 1979;50:495-509.
65. Shiloah J, Patters MR. Repopulation of periodontal pockets by microbial pathogens in the absence of supportive therapy. *J Periodontol* 1996;67:130-139.
66. Garrett JS. Effects of nonsurgical periodontal therapy on periodontitis in humans. A review. *J Clin Periodontol* 1983;10:515-523.
67. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* 1998;3:51-61.
68. 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. *J Clin Periodontol* 2009;36:661-666.
69. 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 Med Sci* 2008.
70. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008;35:877-884.

71. Pinheiro SL, Donega JM, Seabra LM, et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* 2009.
72. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002;28:12-55.
73. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965-973.
74. Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006;33:648-660.
75. Lorentz TC, Cota LO, Cortelli JR, Vargas AM, Costa FO. Prospective study of complier individuals under periodontal maintenance therapy: analysis of clinical periodontal parameters, risk predictors and the progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;36:58-67.
76. Axelsson P, Lindhe J. The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1981;8:281-294.
77. Lindhe J, Nyman S. Clinical trials in periodontal therapy. *J Periodontal Res* 1987;22:217-221.
78. Ramfjord SP. Maintenance care for treated periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1987;14:433-437.
79. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
80. O'Connell PA, Taba M, Nomizo A, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008;79:774-783.
81. Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:135-141.
82. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 1:S62-67.
83. Kardesler L, Buduneli N, Biyikoglu B, Cetinkalp S, Kutukculer N. Gingival crevicular fluid PGE2, IL-1beta, t-PA, PAI-2 levels in type 2 diabetes and relationship with periodontal disease. *Clin Biochem* 2008;41:863-868.
84. Correa FO, Goncalves D, Figueredo CM, Gustafsson A, Orrico SR. The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing levels of interleukin-1beta and proteases in gingival crevicular fluid from patients with type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:2143-2150.
85. Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007;34:835-843.
86. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol* 1998;3:40-50.
87. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:360-369.
88. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:175-181.

89. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
90. Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:148-157.
91. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol* 2005;76:778-784.

Apêndice

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Eu, _____,
RG _____, CPF _____ assino esse Termo de Consentimento com a finalidade de autorizar a minha participação na pesquisa **Efeito da terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não-cirúrgico e na terapia periodontal de suporte em diabéticos tipo 2: estudo clínico e laboratorial em humanos.**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi e do cirurgião-dentista Guilherme de Oliveira Macedo, pois foram dadas a mim todas as informações necessárias para que eu possa tomar esta decisão, sendo que estou ciente que:

1. Esta pesquisa vai ser desenvolvida para que possam ser analisados os efeitos adicionais da terapia fotodinâmica sobre o tratamento dos problemas gengivais de todos os meus dentes e o efeito da terapia fotodinâmica na fase de manutenção do tratamento da gengiva que será feito em mim. Será realizado o tratamento (fase de tratamento) da minha gengiva e a manutenção do tratamento (fase de manutenção) até 01 ano (12 meses) do início da terapia.
2. A pesquisa será realizada pois a terapia fotodinâmica possui um efeito antibacteriano que pode ajudar a melhorar a minha gengiva e o meu diabetes.
3. Antes de começar o tratamento da minha gengiva e depois de 3, 6, 9 e 12 meses será colhido sangue do meu braço, para ver a situação da diabetes (quantidade de açúcar no meu sangue).
4. Antes de começar o tratamento da minha gengiva e depois de 1, 3, 6, 9 e 12 meses será colhido o fluido gengival (saliva da minha gengiva) e placa bacteriana subgengival (bactérias que ficam dentro da minha gengival).
5. Nos meus dentes serão verificadas as medidas da profundidade do espaço que existe entre o dente e a gengiva, será realizado todo o tratamento de minhas gengivas através da remoção do tártaro e da placa que se formam sobre as raízes de meus dentes, serão feitos moldes dos meus dentes, radiografias e fotografias com a finalidade de avaliar as melhoras após o tratamento, me serão dadas todas as instruções e orientações para que eu aprenda a utilizar corretamente a escova e o fio dental. Cada sessão terá uma duração média de 1 hora e meia.
6. Na pesquisa haverá grupos que irão aplicar ou não a terapia fotodinâmica. Serei escolhido de maneira aleatória (sorteio) para participar de um dos grupos da pesquisa. Assim, estou ciente que poderá ser aplicado ou não na minha gengiva a terapia fotodinâmica. Este procedimento me foi explicado de maneira que entendi o procedimento, benefícios e riscos.
7. Se for escolhido para o grupo de manutenção com terapia fotodinâmica não serão realizados os procedimentos de raspagem e alisamento subgengival (abaixo da gengival).
8. A pesquisa irá durar 01 ano (12 meses) e deverei comparecer às consultas agendadas tanto na fase de tratamento como na de manutenção.
9. Antes de iniciar a remoção do tártaro e da placa que se formam sobre as raízes dos meus dentes, receberei gratuitamente cápsulas de antibiótico (doxiciclina 100mg) para ingeri-los durante 14 dias. Irei ingerir uma cápsula por dia.

- 10.** O tratamento irá melhorar a inflamação da minha gengiva.
- 11.** Os procedimentos que poderão me causar incômodo são: exames que serão feitos em minha boca, fotografias, radiografias, moldes de meus dentes, remoção do tártaro e anestesia, coleta de saliva e placa bacteriana, aplicação da terapia fotodinâmica e também os exames de coleta de sangue do meu braço.
- 12.** A outra alternativa para curar a minha doença gengival instalada nas raízes dos dentes, que não seja a remoção do tártaro seria a extração (remoção) do dente.
- 13.** Os riscos que podem existir são os riscos que as pessoas que se submetem a tratamento dos dentes e das gengivas que necessite de anestesia local estão sujeitas.
- 14.** Foi garantido a mim acompanhamento desde o primeiro exame até o fim do tratamento gengival básico, incluindo a manutenção do tratamento.
- 15.** Foi garantido a mim, também, que qualquer dano à minha saúde, que seja decorrente da minha participação nesta pesquisa, será reparado sem que eu necessite fazer qualquer despesa.
- 16.** Me foi garantido o direito a qualquer esclarecimento que eu achar necessário antes durante a até mesmo após a realização da pesquisa.
- 17.** Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência integral no decorrer da pesquisa. Se necessário entrar em contato com o Dr. Guilherme de Oliveira Macedo pelo telefone (0xx16) 3911-7147.
- 18.** Tenho liberdade de me recusar a participar ou retirar o meu consentimento em qualquer momento, sem que eu sofra penalizações e sem prejuízo ao meu atendimento.
- 19.** Foi garantido a mim que os dados que revelei serão mantidos em segredo, assegurando a minha privacidade.
- 20.** Receberei uma cópia desse Termo de Consentimento.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2____

Paciente ou responsável

Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi

CPF: 512067738-04

Guilherme de Oliveira Macedo

CPF: 386867915-49

Apêndice B – Artigo em inglês 1.

Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Treatment in Type II Diabetes. A Randomized, Controlled Clinical Trial.

Guilherme O. Macedo, Graduate student of Periodontology*

Arthur B. Novaes Jr., Chairman of Periodontology*

Sérgio L.S. Souza, Professor of Periodontology*

Mário Taba Jr, Professor of Periodontology*

Daniela B. Palioto, Professor of Periodontology*

Márcio F.M. Grisi, Professor of Periodontology*

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

Address for correspondence (Ok to print):

Márcio Fernando de Moraes Grisi

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP)

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

E-mail: mgrisi@forp.usp.br

This study had a financial support from The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP; protocol number 06/04600-9).

Word Count - 2496, Tables – 2, Figures – 3

Short running title: PDT as adjunct to Periodontal Treatment in type 2 diabetic patients

The results of this study failed in show improvements with PDT as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients with diabetes type II at 3 months of follow-up.

Abstract

Background: Periodontitis is considered a complication of diabetes mellitus (DM). Recent clinical data have suggested a potential benefit of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of periodontitis. The aim of this study was to evaluate the clinical and metabolic effects of the adjunctive use of PDT to non-surgical periodontal treatment in patients with type 2 DM.

Methods: Forty-five patients with type 2 diabetes and diagnosis of chronic periodontitis were treated with scaling and root planning (SRP; N=15) or SRP and photodynamic therapy (SRP+PDT, N=30), using a laser source with a wavelength of 690 nm associated with a photoactivatable substance (phenothiazine). Patients of both groups took doxycycline (100 mg/day) for 2 weeks. Monitored parameters of plaque score (PS), bleeding on probe (BOP), probing depth (PD), suppuration (S), gingival recession, and clinical attachment level (CAL), glycated hemoglobin (HbA1c) were measured at baseline and 3 months after therapy.

Results: At baseline and 3 months no significant statistical differences were observed for PD, CAL, S, and BOP between groups ($P>0,05$). Intra-groups analysis showed a significant reduction of HbA1C (8.5 ± 0.9 to 7.5 ± 0.1 , $P<0,01$) in the SRP+PDT group. There were no inter-group differences ($P>0,05$).

Conclusion: A simple application of aPDT as an adjunct to periodontal treatment failed to result in any additional improvement in all parameters evaluated.

Key words: Clinical trials; periodontal diseases/therapy; photochemotherapy, photosensitizing agents.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is one of a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both ¹. Type 2 diabetes, previously called non–insulin-dependent diabetes, results from insulin resistance, which alters the use of endogenously produced insulin at the target cells ². The insulin resistance results in an increase of blood glycaemic levels that can be monitored through hemoglobin A1c test (HbA1c). The HbA1c test is able to measure glycohemoglobin levels and provides an estimate of the average blood glucose level for approximately 123 ± 23 days³.

DM and periodontal disease (PD) are common and prevalent chronic diseases in adults and the relationship between them represents a well-recognized example of a systemic disease predisposed to oral infection ^{2, 4}. The preponderance of evidence suggests that diabetes also increases the risk of periodontitis. A thorough meta-analysis concluded that the majority of studies demonstrate a more severe periodontal condition in diabetic adults than in adults without diabetes. These study included over 3,500 diabetic adults and clearly demonstrated a significant association between periodontitis and diabetes⁵. In a large epidemiologic study in the United States, adults with poorly controlled diabetes had a 2.9-fold increased risk of having periodontitis compared to non-diabetic adult subjects; conversely, well-controlled diabetic subjects had no significant increase in the risk of periodontitis⁶.

The chronic Gram-negative infection of periodontal origin may be considered a potential focus of infection that aggravates metabolic control in diabetics⁷. Thus, the subgingival microbial biofilm present in the periodontium gains a greater significance. Apart from the conventional mechanical non-surgical and surgical treatment methods

for periodontal disease, others adjunctive anti-infectious therapeutic possibilities are available. O'Connell et al. considered doxycycline as an effective adjunct to periodontal treatment in non-controlled diabetics⁸. Therefore, the association of systemic antibiotics can result in additional improvement in periodontal clinical parameters as well as in the glycemetic control. Moreover, additional non-traumatic methods of local disinfection may be interesting due to the higher risk of infections in non-controlled diabetics^{2, 9}.

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a local and non-traumatic method of antibacterial treatment and may be used as adjunct to or as conventional therapy for the treatment of periodontitis^{10, 11}. aPDT is based on the principle that a photoactivatable substance, the photosensitizer, binds to the target cell and can be activated by light of a suitable wave-length. During this process, free radicals of singlet oxygen are formed, producing an effect that is toxic to the cell. When first reports emerged on light-absorbing properties and fluorescence of various dyes, it became clear that dye excitation by light exerts destructive action in biologic systems. This so-called "photodynamic action" was described as a process in which light, after being absorbed by dyes, sensitizes organisms for visible light-inducing cell damage¹². Although PDT is more widely known for its application in the treatments of neoplasms¹³, there is also an interest in antimicrobial photodynamic therapy because a large number of microorganisms (including oral species) have been reported to be killed in vitro by this approach^{10, 11, 14-16}.

Local infections, such as periodontal disease, may be potential targets for antibacterial photodynamic therapy since subgingival biofilm should be accessible to the aPDT^{10,17-19}. However, aPDT as adjunct to periodontal treatment needs to be better evaluated to elucidate if it has the potential to improve clinical outcomes in

heathy and systemically diseased patients, such as diabetic patients. Therefore, the aim of the present prospective controlled clinical study was to evaluate the effectiveness of aPDT as an adjunct to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis in patients with type 2 DM.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was reviewed and approved by the Institution's Human Research Committee (protocol: 2006.1.934.58.2). Approximately 4500 medical records were reviewed between 2006 and 2007 to select forty five subjects (age range, 36 to 56 years; mean age, 45 8.11years). Criteria for inclusion were: type 2 DM diagnosed for >5 years and HbA1c >7%, at least one site with probing depth (PD) $\geq$ 5mm on each quadrant and two teeth with attachment loss $\geq$ 6mm. Exclusion criteria were: use of antibiotics or periodontal treatment in the previous 6 months, smoking within the past 5 years, pregnancy or lactation, major diabetic complications, and concomitant medical therapy to the others systemic complications. The selected subjects were rescheduled for laboratory, periodontal and clinical examinations and radiographs. All subjects signed informed consent forms.

Clinical Data Collection and HbA1c measurement

The clinical parameters were recorded by an experienced examiner that used a computerized periodontal probe to perform the periodontal measurements. Six sites per tooth were recorded at baseline and at 3 months after periodontal treatment. The parameters recorded were probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), suppuration (SUP), and the presence or absence of biofilm at four sites per tooth (plaque index [PI]). BOP was assessed simultaneously

with the pocket measurements, and the presence or absence of bleeding up to 30 seconds after probing was recorded⁸.

For the metabolic assessment, peripheral blood samples were analyzed for HbA1c. The samples were analyzed by the same laboratory using the same enzymatic method⁸. HbA1c was expressed as a percentage, and it was measured by high-pressure liquid chromatography .

Study Design

Fourteen days before treatment, all patients were enrolled in a hygiene program according to individual needs and received oral hygiene instructions. Supragingival professional tooth cleaning was performed 7 days before baseline. Subjects were randomly assigned to two groups: SRP (SRP; N=15) or SRP and aPDT (SRP+PDT; N=30). All subjects of both groups were treated with SRP using hand instruments and ultrasonic instrumentation in combination with doxycycline , 100mg/day, for 2 weeks after an initial dose of 200mg. The antibiotic therapy started on the day before the periodontal treatment. The SRP sessions were performed by the same operator in two to four sessions within 24 to 36 hours²⁰ using hand instruments and an ultrasonic device while the subjects were under local anesthesia. The SRP+aPDT group received after hand and ultrasonic instrumentation a single episode of aPDT in the tooth with probing depth (PD) ≥ 5 mm. For the aPDT group, a diode laser was selected with a wave length of 660nm, and a maximum power of 60 mW/cm² was used together with a phenothiazine chloride photosensitizer , in a concentration of 10 mg/ml. The photosensitizer was applied by placing the applicator at the bottom of the periodontal pocket and was continuously deposited in a coronal direction for 1 minute followed by copious irrigation with distilled water to remove excess. In sequence, the

pocket was exposed to the laser light using the fiber optic applicator with a diameter of 0.6mm for 10 seconds. The treatment was done in six sites per tooth totaling 1 minute of treatment per tooth. Oral hygiene was reviewed twice monthly, followed by prophylaxis for 3 months in both groups.

To allow more comprehensive comparisons between groups, the sites were subset into baseline PD categories of shallow (≤ 3 mm), moderate (4 to 5mm), and deep pockets (≥ 6 mm).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using a software package for all calculations. All teeth were included in the statistical evaluation and mean values and SD were calculated. The Mann-Whitney U test was performed to determine whether the two groups had similar clinical measurements at baseline and whether one treatment produced better clinical results after a 3-month follow-up. The Wilcoxon signed-rank test was used to analyze whether clinical measurements differed before and after treatment. Differences were considered statistically significant when the P value was <0.05 .

Results

All subjects completed the 3 months evaluation period. Healing was uneventful on all cases. No adverse effects were reported by any of the subjects. The final sample consisted of 45 subjects with poorly controlled diabetes with an elevated mean HbA1c serum level of 8.3%. Twenty nine subjects (64.4%) were women, and 16 (35.6%) were men. Their mean age was 52.9 years, and they had an average of 23.2 teeth. The SRP group consisted of 10 women and five men whose mean age was 50.4 ± 8.1 years, and the SRP+ PDT group consisted of nineteen women and eleven

men whose mean age was 50.2 ± 6.1 years (Table 1). None of these demographic parameters showed a statistically significant difference between the groups. At baseline, both groups had similar mean values for age, plaque, gingival bleeding, PD and CAL. Both groups also had similar average values for the metabolic parameters (Table 2).

At baseline, before periodontal treatment, a high prevalence of BOP is noted for both groups. After 3 months, the reductions were similar between SRP (49.2%) and SRP+PDT (45%). The oral hygiene status was evaluated at baseline and twice a month for 3 months. Both groups showed significant reductions in PI scores: 44.1% for SRP group and 41.4% for SRP+PDT group, with no statistically significant differences between them. No statistically significant difference was observed between the groups with regard to PD and CAL and both therapies showed a significant reduction of the others clinical parameters at 3 months. Additionally, all individuals had periodontal pockets of up to 4-3 mm at baseline and after 3 months; however, the number of deeper pockets was reduced after the periodontal treatment (Figures 1 and 2).

Diabetes was poorly controlled in both groups. The HbA1c mean value was 8.5% for the SRP group and 8.1% for the SRP+PDT group. Three months after the periodontal treatment, both groups had a reduction in the average HbA1c levels, but it was statistically significant only in SRP+PDT group (Table 2). The difference in HbA1c levels after 3 months was $0.3 \pm 1.3\%$ for SRP and $0.8 \pm 1.5\%$ for SRP+PDT. Although results demonstrated a greater reduction in HbA1c levels in SRP+PDT, comparison between the groups did not show a statistical difference (Table 2).

Discussion

Periodontitis is an infectious disease, which treatment is primarily based on eliminating the bacterial infection. Several studies^{21, 22} consider the mechanical therapy of the root surface as the basic prerequisite for a successful treatment. However, manual SRP can often be difficult because of the complex and unfavorable root morphology when working blindly at deep pocket sites²³. In recent years different attempts have been made to introduce antibacterial PDT as an additional therapy^{16, 24}. Many in vitro studies^{16, 24, 25} have shown that periodontal microorganisms can be effectively suppressed with aPDT. It is not clear, however, if aPDT can be clinically implemented as a successful anti-infectious procedure in periodontal diseases since there are few controlled clinical studies on healthy or diabetic patients.

In the present clinical study, aPDT was tested as an adjunct for the treatment of chronic periodontitis in patients with diabetes type 2. Braun et al.²⁶, in a split-mouth design study, demonstrated a clinical improvement after aPDT as adjunctive therapy. Our results also showed improvements on clinical parameters after SRP+aPDT, but they were statistically similar to the SRP group. In fact, both treatment modalities showed improvements on all parameters after 3 months, with no statistical difference between groups. Therefore, aPDT did not show additional benefits as adjunct to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes. These results are in agreement with Christodoulides et al.¹⁹ that failed to show differences between SRP and SRP+aPDT on PD and CAL in healthy patients¹⁹. In the same way, a recent study of short term effects of aPDT on periodontal status of patients with diabetes was not able to demonstrate a significant clinical improvement 3 months after treatment²⁷.

The periodontal treatment is related to a reduction in the local symptoms like bleeding on probing 24. Previous reports showed that in healthy patients the reduction in gingival bleeding was more pronounced in subjects treated with SRP+aPDT than in patients treated with SRP alone, This study failed to demonstrate statistically differences between groups for this clinical parameter (45% to SRP+PDT and 49.2% to SRP). These results are in accordance with previous studies that showed similar reduction in bleeding on probing after non-surgical periodontal treatment in patients with diabetes. However, it is important to emphasize that poorly controlled diabetes can promote vascular alterations²⁸ and others metabolic alterations that can be involved in remission of symptoms like gingival bleeding. Thus, it is difficult to compare diabetic patients with healthy patients and the effect of aPDT on the reduction of gingival bleeding needs to be better investigated. Moreover, our data showed a significant reduction in PI that together with SRP and antibioticophery are important to local decontamination that results in BOP improvements.

aPDT was applied a single time after root scaling and doxycycline administration and no additional improvements were detected. The conventional mechanical and sonic instrumentation of the root surface in the treatment of chronic periodontitis by itself is able to achieve a periodontal clinical improvement and doxycycline can promote and additional anti-inflammatory effects^{8, 29-33} Thus, multiples laser applications could be used accomplished to reach a significant improvement over root scaling disinfection. Previous results showed that repeated (five times) aPDT adjunctive to debridement during periodontal maintenance improved clinical outcomes in residual pockets. Thus a possible influence of single or multiples aPDT applications must be investigated in no-treated chronic periodontitis.

Periodontal debridement requires a certain level of skill, time, and endurance. It seems appropriate to choose an easily handled apparatus that allows one to achieve a highly efficient and time saving removal of contaminants, with less effort on behalf of the clinician. In this way, one-stage periodontal therapy within 24 to 36 hours was established to minimize the risk for reinfections and to reduce the repeated trauma²⁰. This approach is very important when patients with poor glycemic control are treated. However, there are no conclusive evidences that one-stage therapy is superior to conventional periodontal treatment.

Periodontal therapy in association with doxycycline has the potential to alter glycemic control. O'Connell et al.⁸ showed that non-surgical periodontal treatment in association with systemic doxycycline reduced HbA1c levels in about 13%. The SRP+aPDT group showed a similar and significant reduction in Hb1Ac levels after therapy (11.7%). However, the SRP group showed a reduction of 6,5% on glycemic control and this result could have been influenced by initial overall mean of HbA1c, which was smaller than in a previous study⁸. In this regard, it is important to highlight that patients with elevated levels of Hba1c can be affected by many factors, such dietary patterns, lifestyle modifications, oral agents and insulin due to the large risk of complications in diabetes.³⁴ Therefore, it can be difficult to predict the real influence of periodontal therapy in patients with very poorly glycemic control. Moreover, these results may be influenced by dietary factors, which were not monitored during this investigation.

In conclusion, aPDT in a single application does not show a clinical improvement as adjunct to SRP. More studies are necessary to evaluate the effects of multiple applications of aPDT on periodontal therapy and their additional effects on glicemic control of patients with diabetes.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP; protocol number 06/04600-9) for their financial support of this study.

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;28 Suppl 1:S37-42.
2. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
3. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2002;25:275-278.
4. Novaes AB, Jr., Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I-- Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996;7:65-73.
5. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;1:1-36.
6. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30:182-192.
7. Soslone WA. Epidemiological and clinical aspects of periodontal diseases in diabetics. *Ann Periodontol* 1998;3:3-12.
8. O'Connell PA, Taba M, Nomizo A, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008;79:774-783.
9. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis* 2008;14:191-203.
10. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005;79:159-170.
11. Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006;25:487-504.
12. Martinetto P, Gariglio M, Lombard GF, Fiscella B, Boggio F. Bactericidal effects induced by laser irradiation and haematoporphyrin against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Drugs Exp Clin Res* 1986;12:335-342.
13. DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Phys Ther* 1999;79:839-846.

14. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 1993;75:299-306.
15. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J* 1994;44:181-189.
16. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 1993;28:204-210.
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 Med Sci* 2008.
18. Pinheiro SL, Donega JM, Seabra LM, et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* 2009.
19. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008;79:1638-1644.
20. Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, Van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Long-term impact on microbial load. *J Periodontol* 1999;70:646-656.
21. Greenstein G. Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: a review. *J Periodontol* 1992;63:118-130.
22. Moore J, Wilson M, Kieser JB. The distribution of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in relation to periodontally involved root surfaces. *J Clin Periodontol* 1986;13:748-751.
23. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, et al. Four modalities of periodontal treatment compared over five years. *J Periodontal Res* 1987;22:222-223.
24. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343-1349.
25. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2595-2601.
26. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008;35:877-884.
27. Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol* 2009;80:1568-1573.
28. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000 2007;44:127-153.
29. Loos B, Kiger R, Egelberg J. An evaluation of basic periodontal therapy using sonic and ultrasonic scalers. *J Clin Periodontol* 1987;14:29-33.

30. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, et al. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-452.
31. Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol* 1996;1:443-490.
32. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Haffajee AD. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984;11:448-458.
33. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981;8:57-72.
34. Vinik AI, Vinik E. Prevention of the complications of diabetes. *Am J Manag Care* 2003;9:S63-80; quiz S81-64.

Apêndice C – Artigo em inglês 2.

Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Treatment in Type 2 Diabetics: Microbiological and Gingival Crevicular Fluid IL1- β Results.

Guilherme O. Macedo, Graduate student of Periodontology*

Arthur B. Novaes Jr., Chairman of Periodontology*

Sérgio L.S. Souza, Professor of Periodontology*

Mário Taba Jr, Professor of Periodontology*

Daniela B. Palioto, Professor of Periodontology*

Márcio F.M. Grisi, Professor of Periodontology*

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

Address for correspondence (Ok to print):

Márcio Fernando de Moraes Grisi

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP)

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

E-mail: mgrisi@forp.usp.br

This study had a financial support from The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP; protocol number 06/04600-9).

Word Count - 2496, Tables – 1, Figures – 3

Short running title: aPDT in diabetic patients: Microbiological and IL1- β results.

The results of this study failed in show improvements with PDT as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients with diabetes type II at 3 months.

Abstract

Background: The aim of this study was evaluate the effectiveness of the adjunctive use of aPDT to non-surgical periodontal treatment in patients with type 2 diabetes on gingival crevicular fluid (GCF) interleukin-1 β (IL1- β) levels and subgingival plaque (SP).

Methods: Forty-five patients with diabetes type 2 and diagnosis of chronic periodontitis were treated with scaling and root planning (SRP; N=15) or SRP and photodynamic therapy (SRP+aPDT, N=30), using a laser source with a wavelength of 690 nm associated with photosensitizer agent. Doxycycline was prescribed to patients of both groups for 2 weeks. At baseline and 3 months after therapy, GCF and subgingival plaque (SP) samples were collected and pooled from four sites of each quadrant. GCF IL1- β levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). SB were analysed for the counts of 40 subgingival species by checkerboard DNA-DNA hybridization.

Results: The GCF IL1- β levels were significantly lower after 3 months in SRP($31,10 \pm 8,92$ to $9,19 \pm 4,49$) and SRP+aPDT ($35,39 \pm 8,08$ to $7,02 \pm 2,75$) ($P < 0,05$) without differences between groups ($P > 0,05$). Both groups significantly reduced counts of

red complex species (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. fonsythis*) without differences between them at 3 months.

Conclusion: Changes in GCF IL1- β and SP were similar to SRP and SRP+aPDT. Thus, PDT as an adjunct to non-surgical periodontal treatment, in a single application, in patients with type 2 diabetes did not show additional improvements at 3 months following non-surgical periodontal treatment.

Introduction

Periodontitis is characterized by a destruction of periodontal tissues initiated by oral pathogens that induce an inflammatory cascade. Patients with type 2 diabetes have greater incidence and severity of periodontal disease than those without diabetes¹⁻³. It appears that a number of mediators are involved on inflammation of the periodontal tissues, including a variety of cytokines produced by several different cells⁴. IL-1 is a potent proinflammatory cytokine that can influence the host response in the periodontal lesion. It is produced in two forms, α and β . Interleukin-1 β (IL1- β) is major inflammatory cytokine occurring in gingival fluid associated with periodontitis and is produced by cells as macrophages but also by others, including neutrophils⁵. Periodontal lesions show a marked accumulation of neutrophils and monocytes/macrophages that is associated with increased levels of IL-1 β ⁵. Patients with diabetes can present a hyperresponsiveness to these cells, and it might result in a significantly increased production of proinflammatory cytokines as IL1- β . This explains the evidence that subjects with diabetes mellitus present higher amounts of gingival crevicular fluid (GCF) IL-1 β than non-diabetics^{6, 7}.

The chronic Gram-negative infection of periodontal origin may be considered a potential focus of infection that aggravates metabolic control in diabetics⁸. Apart

from the conventional mechanical non-surgical and surgical treatment methods of periodontal disease, other adjunctive anti-infectious therapeutic possibilities are available. In this way, systemic antibiotics as doxycycline can result in additional improvement in periodontal clinical parameters and in the glicemic control in non-controlled diabetic 9. Moreover, additional non-traumatic methods of local disinfection may be interesting due to the risk of infections in non-controlled diabetics^{10, 11}.

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a local and non-traumatic method of antibacterial treatment and may be used as adjunct to or as conventional therapy for the treatment of periodontitis^{12, 13}. PDT photosensitizers were suggested to penetrate gingival structures without causing any adverse effects.¹⁴ aPDT is based on the principle that a photoactivatable substance, the photosensitizer, binds to the target cell and can be activated by light of a suitable wave-length. Although aPDT is more widely known for its application in the treatments of neoplasms¹⁵, there is also an interest in antimicrobial photodynamic therapy because a large number of microorganisms (including oral species as *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) *Prevotella intermedia* (P.i.), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Fusobacterium nucleatum* (F.n.)) have been reported to be killed in vitro by this approach^{12, 13, 16-18}. Local infections such as periodontal disease may be potential targets for antibacterial photodynamic therapy since the subgingival biofilm should be accessible to aPDT^{12,19-21}. Previous studies failed to identify differences in specific periodontal pathogens in subjects with diabetes when compared with non-diabetic subjects. ^{22, 23}. DNA–DNA hybridization developed by Socransky et al.²⁴ can be very useful in the evaluation the effect of aPDT on the subgingival biofilm, facilitating rapid processing of large numbers of plaque samples with a wide range of species^{25, 26}.

Controlled clinical trials evaluating the effect of aPDT are still limited in patients with or without diabetes.²⁷ Moreover, there are no available data evaluating the effects of the aPDT as adjunctive to non-surgical periodontal treatment on microbiological pathogens and cytokines, like IL1- β in patients with diabetes. Thus, the aim of this study was evaluate the effectiveness of the adjunctive use of aPDT to non-surgical periodontal treatment in patients with type 2 diabetes on GCF IL1- β levels and SP.

MATERIALS AND METHODS

Patient Population

The research protocol was reviewed and approved by the Human Research Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, (protocol 2006.1.934.58.2). Approximately 4500 medical records were reviewed between 2006 and 2007 to select forty five subjects (age range, 36 to 56 years; mean age, 45 8.11years). Criteria for inclusion were: type 2 DM diagnosed for >5 years and HbA1c >7%, at least one site with probing depth (PD) $\geq$ 5mm on each quadrant and two teeth with attachment loss $\geq$ 6mm. Exclusion criteria were: use of antibiotics or periodontal treatment in previous 6 months, smoking within the past 5 years, pregnancy or lactation, major diabetic complications, and concomitant medical therapy to the others systemic complications. The selected patients had a minimum of 15 teeth.

Study Design

In this parallel study, subjects were randomly assigned by a coin toss to two groups: SRP (SRP; N=15) or SRP plus aPDT (SRP+aPDT; N=30). All subjects of both groups were treated with SRP using hand instruments and ultrasonic instrumentation in combination with doxycycline , 100mg/day, for 2 weeks after an

initial dose of 200mg. The antibiotic therapy started on the day before the periodontal treatment. The SRP sessions were performed by the same operator in two to four sessions within 24 to 36 hours²⁸ using hand instruments and an ultrasonic device while the subjects were under local anesthesia. The SRP+aPDT group received after hand and ultrasonic instrumentation a single episode of aPDT in the tooth with probing depth (PD) ≥ 5 mm. For the aPDT group, a diode laser was selected with a wave length of 690nm, and a maximum power of 60 mW/cm² was used together with a phenothiazine chloride photosensitizer in a concentration of 10 mg/ml. The treatment was done using a fiber optic applicator with a diameter of 0.6mm for 10 seconds in six sites totaling 1 minute of treatment per tooth. Oral hygiene was reviewed twice monthly, followed by prophylaxis, for 3 months in both groups²⁹.

GCF and subgingival biofilm collection

Each patient contributed with four samples of different sites that were pooled. GCF was collected from the deepest periodontal pocket from the maxillary anterior area of each quadrant to avoid salivary contamination and because of easy fluid collection³⁰. Briefly, teeth were air-dried and isolated with cotton rolls. Supra gingival plaque was gently removed, and GCF was sampled with a precut methylcellulose filter papers strips for 30 seconds³¹. Strips were measured for fluid volume and then moved to microcentrifuge tubes. The absorbed GCF volume of each strip was determined by an electronic gingival fluid measuring device. The readings from the electronic instrument were converted to an actual volume (microliters) by reference to the standard curve. After this measurement, the samples of each patient were pooled, transferred to Eppendorf tubes isolated with parafilm and stored at -80C until assay was performed.

Pooled subgingival plaque samples were collected from same sites of the GCF, using sterile mini-Gracey curettes (11–12) after removal of supragingival plaque, if present. The samples were placed in the same Eppendorf tubes containing 0.15ml of TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6). One hundred microlitres of 0.5M NaOH was added to each tube and the samples were dispersed using a vortex mixer³² and stored at -80C until a microbiological assay was performed.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA).

Measurements of cytokines in GCF were performed as previously described.³³ The concentrations of the cytokine were determined by ELISA using commercially available kits according to the manufacturer's instructions. Calculation of the IL1- β concentration in each GCF sample was performed by dividing the total amount of IL1- β by the volume of the sample. The results are expressed as picograms of cytokine per microliter of GCF, from duplicate measurements³¹.

Checkerboard DNA–DNA hybridization

Counts of 40 bacterial species (table 1) were determined in each sample, using the Checkerboard DNA–DNA hybridization technique²⁴. The microbiological analysis was entirely performed at the Laboratory of Microbiology of Guarulhos University and DNA–DNA hybridization technique was performed as previously described³². Evaluation of the number of bacteria in the samples was performed by comparing the obtained signals with the ones generated by pooled standard samples containing 10⁶ and 10⁵ of each the species.

Statistical analysis

Mean counts of individual bacterial species were averaged within each subject and then across subjects in the two therapeutic groups. The significance of differences among the groups for IL1- β and microbiological parameters was determined using the Mann–Whitney U-test. Wilcoxon test was used to test differences between two experimental periods. The level of significance was set at 5%. Hence, all subjects who entered the study (n=45) were included in the analyses at all time points.

Results

All subjects completed the 3 months evaluation period. Healing was uneventful in all cases. No adverse effects were reported by any of the subjects. Their mean age was 52.9 years, and they had an average of 23.2 teeth. The SRP group consisted of 10 women and five men whose mean age was 50.4 ± 8.1 years, and the SRP+ PDT group consisted of nineteen women and eleven men whose mean age was 50.2 ± 6.1 years. There are no adverse events or side effects in both groups.

Diabetes was poorly controlled in both groups. The HbA1c mean value was $8.5 \pm 0.9\%$ for SRP group and $8.2 \pm 0.8\%$ for SRP+PDT group. After 3 months both groups had a reduction in the average HbA1c levels ($7.5 \pm 0.7\%$ for the SRP group and $7.7 \pm 0.9\%$ for the SRP+PDT group) but without statistical differences between the groups (Figure 1).

IL1- β showed a significant reduction in both groups after 3 months (figure 2). SRP showed a reduction of $31,10 \pm 8,92$ to $9,19 \pm 4,49$ and SRP+PDT of $35,39 \pm 8,08$ to $7,02 \pm 2,75$. These results were not different between the groups.

Microbiological results and differences between the groups are presented in Figure 3. No statistically significant difference was observed between groups at the baseline and post-treatment examinations. Both groups showed a significant reduction in periodontal pathogens of the red complex (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. fonsythis*) previously described by Socranski et al³⁴.

Discussion

Periodontitis is an infectious disease^{35, 36} and a current concept for treating periodontitis is primarily founded on eliminating the infection. In the present clinical study the effects of photodynamic therapy as adjunct in treatment of periodontitis on GCF IL-1 β levels and subgingival plaque in patients with type 2 diabetes were tested.

The observation that the postoperative healing was uneventful in all cases throughout the study period indicates that non-surgical periodontal treatment with aPDT is well tolerated. In the clinical protocol, the subgingival debridement was performed within 24 hours instead of conventional subgingival weekly per quadrant debridement³⁷. This approach is justified by previous studies that showed similar results between the two approaches. Moreover, this protocol allows the application of the antibiotic therapy during the entire SRP treatment. Doxycycline was indicated in this study since previous studies showed that this drug is able to influence positively the glycemic control^{9, 38}. Moreover, additional non-traumatic methods of local disinfection may be interesting due to the risk of infections in non-controlled diabetics^{10, 11}.

IL-1 β is a potent mediator of tissue destruction that induce degradation of connective tissue and resorption of alveolar bone⁴ and its increase in GCF is related to periodontitis³⁹ and its decrease occurs after periodontal treatment⁴⁰ in patients with

or without diabetes. The present findings confirm these observations, with significant post-treatment reductions in GCF IL-1 β levels. The concentration of GCF IL-1 β levels ($31,10 \pm 8,92$ pg/ μ l in the SRP+aPDT group and $35,39 \pm 8,08$ pg/ μ l in the SRP group) at baseline were similar with previous studies in patients with type 2 diabetes 41, 42. However, this study presented a greater reduction of cytokine levels at 3 months after treatment (70,5% in the SRP group and 80,2% in the SRP+aPDT group) than Correa et al. 39 and Navarro-Sanches et al. 40 that showed reductions of 27,5% and 43,9% respectively at the same time intervals, after non-surgical treatment 40, 41. This difference can be related with the antibiotic therapy that was applied in the present study since O'Connell et al. 9 showed that doxycycline can result in a decrease of pro-inflammatory cytokines, as IL-1 β , in periodontal disease.

Previous studies failed to identify differences in specific periodontal pathogens in subjects with diabetes when compared with non-diabetic subjects. 22, 23. Regarding microbiological outcomes, this study showed a reduction of red complex species in both groups. Recently in vivo studies in animal models have reported a reduction in the microbial load following the application of antimicrobial photodynamic therapy 43-45 with a significant reduction in the *P. gingivalis* count but with no significant reduction in *F. nucleatum*. These results are in agreement with our results in human subgingival biofilm, as shown in figure 2. Comparing the photosensitization of periodontal bacteria with scaling and root planing, the bacterial elimination following antimicrobial photodynamic therapy produced results similar to those of conventional scaling. Christodoulides et al. 21 evaluated the microbiological effects of the adjunctive PDT in nonsurgical periodontal treatment in patients suffering from chronic periodontitis. Similarly, both treatment procedures revealed comparable microbiological changes in periodontal pathogens of the red complex, previously

described by Socransky et al³⁴. These results are in agreement with our results that showed a similar significant reduction of periodontal pathogens in both groups.

Previous studies demonstrated that aPDT has a potential effect on periodontal pathogens and inflammation reduction^{20, 21, 46}. This study failed to show differences between groups with a single aPDT application. Lulic et al.⁴⁷ showed a clinical improvement after repeated (five times) aPDT adjunctive to debridement during periodontal maintenance in residual pockets. However, there is a lack of evidence if there are differences between single or multiple aPDT applications on microbial species count and pro-inflammatory cytokines in diabetic and non-diabetics subjects with chronic periodontitis. Moreover, few studies indicate that antimicrobial photodynamic therapy may be an alternative treatment to scaling⁴⁸. That would be interesting since aPDT is a non-traumatic local antibacterial therapy and patients with diabetes have a higher risk of infections. This possibility was shown by de Oliveira et al. in treatment of aggressive periodontitis. However, no evidence of the effectiveness of aPDT as single therapy has been reported on chronic periodontitis in patients with diabetes.

Based on the results, it was concluded that a single episode of antimicrobial photodynamic therapy, as an adjunct to scaling and root planning, failed to provide an additional improvement on the reduction of periodontal pathogens and GCF IL1- β levels.

References

1. Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:135-141.
2. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000 2007;44:127-153.

3. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-131.
4. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
5. Tokoro Y, Yamamoto T, Hara K. IL-1 beta mRNA as the predominant inflammatory cytokine transcript: correlation with inflammatory cell infiltration into human gingiva. *J Oral Pathol Med* 1996;25:225-231.
6. Bulut U, Develioglu H, Taner IL, Berker E. Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid in type 2 diabetes mellitus and adult periodontitis. *J Oral Sci* 2001;43:171-177.
7. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:256-260.
8. Soslone WA. Epidemiological and clinical aspects of periodontal diseases in diabetics. *Ann Periodontol* 1998;3:3-12.
9. O'Connell PA, Taba M, Nomizo A, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008;79:774-783.
10. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
11. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis* 2008;14:191-203.
12. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005;79:159-170.
13. Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006;25:487-504.
14. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med* 2003;33:161-168.
15. DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Phys Ther* 1999;79:839-846.
16. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 1993;75:299-306.
17. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J* 1994;44:181-189.
18. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 1993;28:204-210.
19. 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 Med Sci* 2008.
20. Pinheiro SL, Donega JM, Seabra LM, et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* 2009.
21. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008;79:1638-1644.

22. Tervonen T, Oliver RC, Wolff LF, Bereuter J, Anderson L, Aepli DM. Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1994;21:375-379.
23. Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodontol Res* 2001;36:18-24.
24. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-792.
25. Papapanou PN, Madianos PN, Dahlen G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci* 1997;105:389-396.
26. Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 1997;68:651-666.
27. Al-Zahrani MS, Bamshous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol* 2009;80:1568-1573.
28. Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, Van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Long-term impact on microbial load. *J Periodontol* 1999;70:646-656.
29. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965-973.
30. Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Sutcu R, Delibas N, Demirel R. Gingival crevicular fluid leptin levels in periodontitis patients with long-term and heavy smoking. *J Periodontol* 2006;77:634-640.
31. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* 2009;80:98-105.
32. Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tsuzuki CO, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2009;36:857-867.
33. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:12-20.
34. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
35. Greenstein G. Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: a review. *J Periodontol* 1992;63:118-130.
36. Moore J, Wilson M, Kieser JB. The distribution of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in relation to periodontally involved root surfaces. *J Clin Periodontol* 1986;13:748-751.
37. Eberhard J, Jepsen S, Jervoe-Storm PM, Needleman I, Worthington HV. Full-mouth disinfection for the treatment of adult chronic periodontitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2008:CD004622.

38. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor- α and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2001;72:774-778.
39. Figueredo CM, Ribeiro MS, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:1457-1463.
40. Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007;34:835-843.
41. Correa FO, Goncalves D, Figueredo CM, Gustafsson A, Orrico SR. The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing levels of interleukin-1 β and proteases in gingival crevicular fluid from patients with type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:2143-2150.
42. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2004;75:1203-1208.
43. 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. *J Periodontal Res* 2008;43:162-167.
44. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72:676-680.
45. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76:1100-1105.
46. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008;35:877-884.
47. 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. *J Clin Periodontol* 2009;36:661-666.
48. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology* 2000 2009;51:109-140.

Anexo

Anexo A – Carta de aprovação do comitê de ética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/214/FORP

Ribeirão Preto, 20 de outubro de 2008.

Senhor Professor,

Ref.: Processo nº 2006.1.934.58.2
CAAE nº 0038.0.138.000-06

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 92ª Sessão, realizada em 16 de outubro de 2008, **aprovou o Relatório Parcial e a prorrogação de 08 meses para entrega do Relatório Final** do Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito da terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não-cirúrgico e na terapia periodontal de suporte em diabéticos tipo 2. Estudo clínico e laboratorial em humanos"**.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Final** no dia **30 de junho de 2009**.

Atenciosamente,

Glaucete Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi

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

GDR/gdr

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa - Glaucete Della Rosa - e-mail: glaucete@forp.usp.br