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

Efeito da terapia antimicrobiana fotodinâmica no
tratamento da periodontite experimental. Estudo
bioquímico e microbiológico em cães.

Rafael Ramos de Oliveira

Ribeirão Preto

2009

Rafael Ramos de Oliveira

Efeito da terapia antimicrobiana fotodinâmica no tratamento da periodontite experimental. Estudo bioquímico e microbiológico em cães.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior

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

Ribeirão Preto

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus

Administrativo de Ribeirão Preto/USP

RAFAEL RAMOS DE OLIVEIRA

Efeito da terapia antimicrobiana fotodinâmica no tratamento da periodontite experimental. Estudo bioquímico e microbiológico em cães. Ribeirão Preto, 2009.

123 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Novaes Júnior, Arthur Belém.

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

Nome: OLIVEIRA, RR

Título: Efeito da terapia antimicrobiana fotodinâmica no tratamento da periodontite experimental. Estudo bioquímico e microbiológico em cães.

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

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“It has been said that something as small as the flutter of a butterfly’s wing can ultimately cause a typhoon halfway around the world.” *Chaos Theory*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Remo e Beth...

Ao meu irmão Rodolfo...

...simplesmente, por tudo!

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior, pela sua competência, espírito científico e dedicação à pesquisa... mas principalmente pela confiança em mim depositada e por todas as oportunidades oferecidas durante este período. Foi uma honra ter sido seu aluno e um privilégio tê-lo como amigo. Muito obrigado.

Aos professores de Pós-Graduação em Periodontia (FORP-USP), responsáveis pela minha formação pessoal e profissional: Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi, Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza, Prof. Dr. Mário Taba Jr. e Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto Bulle.

Aos meus colegas professores da PUCRS: Prof. Dr. Eraldo Luís Batista Júnior, Prof. Dr. Luiz César da Costa Filho e Profa. Maria Angélica Graça por se desdobrarem, literalmente, na minha ausência.

À Profa. Dra. Magda Feres (UnG) por seu inestimável auxílio na interpretação dos dados microbiológicos juntamente com a bióloga Izilvania Barreto pela presteza na realização da análise microbiológica dos nossos estudos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet (FOB-USP) pela amizade, ensinamentos e competência na realização da análise bioquímica dos nossos estudos.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia, Aparecida Dulce de Oliveira Negretti e Tatiana A. Passos Fernandes, meus sinceros agradecimentos, pela

eficiência, disposição, atenção, cordialidade e bom-humor; e pela dedicação ao nosso curso de pós-graduação e a seus alunos.

Aos professores de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, Prof. Dr. Alexandre Elias Trivellato, Prof. Dr. Cassio Edvard Sverzut, Prof. Dr. Luiz Antonio Salata, Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier e Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros pelo convívio agradável e amizade desenvolvida durante todos esses anos.

Aos professores do Depto. de Materiais Dentários e Prótese, Prof. Dr. Valdir Antônio Muglia, Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza pelos ensinamentos e pela amizade desenvolvida.

Aos funcionários do Biotério, Aldo e Édson, cuja contribuição é imprescindível para a realização de nossos estudos. Ao médico veterinário Fábio Motta por toda a atenção e competência demonstrada nos cuidados prestados aos cães.

Aos técnicos de laboratório Sebastião Bianco, Junia Ramos, Adriana Luisa G. Almeida, Roger Fernandes e a especialista de laboratório Fabíola S. de Oliveira por sua contribuição no desenvolvimento de nossos estudos.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação Isabel C. Galino Sola e Regiane M. Sacilotto pela disponibilidade, competência e atenção concedidas... sempre.

Às funcionárias da clínica de pós-graduação Zilda e Sueli pela amizade, respeito, disponibilidade e pelo convívio descontraído e durante todos esses anos.

Às meninas da FUNORP, Kelly, Lair e Cristiane pela eficiência junto ao Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia.

Aos meus colegas de pós-graduação, Guilherme, Patrícia, Raquel, Flávia, Adriana, Priscila, Luciana, Ingrid, Karina, Danilo, Patrícia Garani, Luciana Maia, Andrea, e aos estagiários Rafael, Leandro, Janine, Joseane e Juliana pelo convívio agradável e harmonioso, pelo companheirismo e, acima de tudo, respeito. Agradeço a vocês por todos os momentos que passamos juntos...

À Prof. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva (Dpto. de Clínica Infantil e Odontologia Preventiva e Social), ao Prof. Dr. Fernando Mandarino (Dpto. de Odontologia Restauradora), e ao Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro (Depto. de Materiais Dentários e Prótese) pela amizade, incentivo e oportunidades no desenvolvimento de pesquisas junto a seus respectivos departamentos.

Aos meus familiares, aos demais pós-graduandos de outros programas, especialmente à Sandra Sato pela inestimável ajuda na análise estatística, a TODOS os amigos de dentro e fora dos portões da USP, Germana, Annelissa e Priscila Nóbrega pelo auxílio na parte experimental desenvolvida no Biotério, à turma da bike...

À diretoria e demais professores e funcionários da FORP-USP pela sua disponibilidade e atenção que diretamente contribuem para o bom andamento do nosso dia a dia.

À Helbo Photodynamic Systems por fornecer o sistema de *laser* e seus componentes que muito contribuiu para a realização de nossos estudos.

À FAPESP, pelos recursos financeiros na forma de minha bolsa de doutorado (05/60775-0) e auxílio pesquisa (05/60775-0), os quais possibilitaram a realização desta tese.

Sumário

1. Resumo	17
2. Introdução	19
3. Objetivos	27
4. Material e métodos	29
4.1. Animais de experimentação	29
4.2. Protocolo de indução de doença periodontal.....	29
4.3. Tratamentos	30
4.3.1. Terapia antimicrobiana fotodinâmica	30
4.3.2. Raspagem e alisamento radicular	32
4.3.3. Raspagem e alisamento radicular associado à terapia antimicrobiana fotodinâmica	32
4.4. Coleta das amostras de tecido periodontal.....	32
4.5. Extração de RNA e transcrição reversa.....	33
4.6. Reações de RealTime PCR.....	34
4.7. Quantificação da carga bacteriana total	35
4.8. Coleta de biofilme microbiano subgengival	37
4.9. Determinação dos microrganismos orais (técnica de hibridização DNA-DNA)....	37
4.10. Hibridização das membranas com as sondas de DNA.....	38
4.11. Sondas de DNA.....	38
4.12. Detecção das espécies.....	39
4.13. Análise estatística.....	40

5. Resultados	41
5.1. Resultados clínicos	41
5.2. Resultados para expressão gênica	41
5.2.1. Expressão de TNF- α	41
5.2.2. Expressão de MMP-1	43
5.2.3. Expressão de IL-6	45
5.2.4. Expressão de IL-10	47
5.2.5. Expressão de RANKL	49
5.2.6. Expressão de OPG	51
5.2.7. Quantificação da carga bacteriana total	53
5.3. Resultados microbiológicos	55
5.3.1. Comparação entre os tratamentos	55
5.3.2. Comparação entre os tempos de avaliação	55
5.3.3. Quantificação do <i>pool</i> bacteriano	56
 6. Discussão	 63
 7. Conclusão	 73
 8. Referências bibliográficas	 75
 9. Anexos	 87
9.1. Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa Animal	87
9.2. Artigo 1: Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part I: Cytokine pattern	88
9.3. Artigo 2: Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part II: Microbiological results	107

1. Resumo

Objetivo: Alternativas para o tratamento da doença periodontal necessitam ser testadas e uma opção viável parece ser o uso da terapia antimicrobiana fotodinâmica. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da terapia antimicrobiana fotodinâmica através das alterações no perfil microbiológico e no padrão de citocinas após o tratamento da doença periodontal induzida por ligaduras em cães.

Métodos: Para tanto, foi induzida doença periodontal através da colocação de ligaduras em torno dos pré-molares mandibulares bilaterais em oito cães. Após a indução da doença os sítios foram aleatoriamente tratados através de raspagem e alisamento radicular (RAR) com instrumentos manuais, terapia antimicrobiana fotodinâmica (TAF) com a utilização de uma fonte de luz *laser* associada a um fotosensibilizador, ou através da combinação das terapias. Para a análise da resposta dos sítios frente aos tratamentos, diferentes tempos experimentais foram utilizados (*baseline*, uma, três e quatro semanas) onde foram coletadas amostras de placa dentobacteriana subgengival e a contagem de 40 espécies microbianas foi determinada através da técnica de hibridização DNA-DNA. Além disso, amostras de tecidos periodontais foram removidas e a expressão gênica de diferentes citocinas (TNF- α , RANKL, OPG, MMP-1, IL-6 e IL-10) foi determinada pela técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real. Os dados foram analisados através dos testes de equações de estimação generalizadas (EEG) e análise da variância (ANOVA) com um nível de significância de 0,05.

Resultados: Os dados demonstraram uma redução dos níveis da maioria das espécies bacterianas monitoradas após uma semana para todos os tratamentos realizados ($P < 0,001$), no entanto, um aumento na contagem média de *P. intermedia* ($P < 0,01$), *P. nigrescens* ($P < 0,001$) e *T. forsythia* ($P < 0,05$) foi observado para os sítios tratados por TAF e por RAR + TAF. Após quatro semanas foi observada uma possível recolonização de *P. gingivalis* e *T. denticola*, para todos os tratamentos testados ($P < 0,001$). A contagem média de *T. forsythia* manteve-se elevada durante o curso do estudo, especialmente para TAF e RAR + TAF. Adicionalmente foi observada uma notável redução da contagem média de *A.*

actinomycescomitans para o grupo TAF ($P < 0,001$). Em relação ao perfil das citocinas avaliadas, os resultados foram similares para todos os tratamentos testados. O fator tempo foi considerado estatisticamente significativo independente do tratamento realizado ($P < 0,001$) e não foi observada influência dos tratamentos sobre os resultados ($P > 0,05$). Foi observada uma redução progressiva na expressão das citocinas durante os períodos de observação, entretanto entre os períodos de três e quatro semanas não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Conclusões: De acordo com o modelo experimental utilizado neste estudo os dados sugerem que os tratamentos testados afetaram diferentemente as espécies bacterianas monitoradas e apresentaram um efeito similar na expressão das citocinas avaliadas.

Palavras chave: Doenças periodontais/terapia, terapia fotodinâmica, laser, fotoquimioterapia, agentes fotosensibilizadores

2. Introdução

As doenças periodontais inflamatórias são consideradas alterações dos tecidos de revestimento e sustentação dos órgãos dentais e têm sua etiopatogenia relacionada ao biofilme microbiano aderido à superfície dental (GENCO 1992, KINANE & LAPPIN 2001). Em termos epidemiológicos, as diferentes modalidades de doenças periodontais atingem praticamente a totalidade da população, sendo a doença óssea mais prevalente em humanos e importante causa de perda dental entre adultos.

Mesmo em condições clínicas de saúde, os tecidos periodontais estão em confronto contínuo com microrganismos potencialmente patogênicos, e até certo ponto, convivem de maneira eficaz com estas agressões. Porém, na ausência ou na falta de efetividade das medidas de controle de placa dentobacteriana, começam a ocorrer alterações no microambiente do biofilme. Dessa forma, os tecidos periodontais do hospedeiro se encontram em íntima associação com uma crescente diversidade e quantidade de produtos bacterianos no sulco gengival, surgindo então sinais clínicos de doença (GENCO 1992, KINANE & LAPPIN 2001, GEMMEL & SEYMOUR 2004). Embora a presença de microrganismos periodontopatogênicos seja fundamental para o início do desenvolvimento da doença, tem se mostrado que a amplificação e progressão desse processo são altamente dependentes da resposta inflamatória e imunológica gerada pelo hospedeiro frente às bactérias ou aos seus produtos (KINANE & LAPPIN 2001, TENG 2003, GEMMEL & SEYMOUR 2004).

Embora tal resposta supostamente proteja o hospedeiro da invasão microbiana em larga escala, a relativa inacessibilidade dos leucócitos e de agentes antimicrobianos aos microrganismos presentes no sulco gengival, somada à proteção conferida por sua organização na forma de biofilme microbiano, inviabilizam a eliminação dos agentes infecciosos (EBERSOLE & TAUBMAN 1994, PAGE 1998, EBERSOLE *et al.* 2001, SOCRANSKY & HAFFAJEE 2002, SBORDONE & BORTOLAIA 2003). Além disso, acredita-se que a presença de diversos microrganismos com grande capacidade de invasão tecidual nos tecidos

periodontais propicie acesso a sua disseminação pelo organismo. De fato, estudos têm demonstrado que pacientes com doença periodontal apresentam uma marcante resposta sistêmica, a qual é controlada após o tratamento periodontal (SLADE *et al.* 2000, NOACK *et al.* 2001, D'AIUTO *et al.* 2004). Tal resposta supostamente estaria envolvida na alteração da saúde sistêmica apresentada pelos pacientes com doença periodontal.

Controvérsias à parte, um fato concreto é que a permanência de um foco infeccioso em íntima associação aos tecidos periodontais leva a manutenção de uma reação inflamatória crônica local. Tal resposta leva a destruição tecidual através de mecanismos que incluem a produção de enzimas envolvidas na degradação de tecido conjuntivo e da expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos (BAKER 2000, GRAVES & COCHRAN 2003, TENG *et al.* 2003). Dentre as proteases envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular, estão as metaloproteases de matriz (MMPs), as quais desempenham tal papel tanto em processos fisiológicos como patológicos. As MMPs são uma família de proteases cuja atividade é dependente de zinco e/ou cálcio, e são divididas em quatro subclasses com base na especificidade de seus substratos: collagenases, como a MMP-1 ou collagenase intersticial ativa contra colágeno fibrilar; gelatinases, também chamadas de collagenases do tipo IV (A ou MMP-2, e B ou MMP-9) que apresentam alta atividade contra colágeno desnaturado; estromalisinas, que degradam componentes de natureza não colágena presentes na matriz extracelular; e metaloproteases de membrana (BIRKEDAL-HANSEN *et al.* 1993). A ativação das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas chamado de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), capazes de inibir praticamente todos os membros da família das MMPs de forma não específica (BAKER 2002). Em condições fisiológicas, os TIMPs estão em balanço com as MMPs, sendo a matriz extracelular remodelada e forma extremamente controlada.

Diversas MMPs são identificadas em tecidos periodontais (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-8, MMP-13, MT-1MMP) (TERVAHARTIALA *et al.* 2000, EJEIL *et al.* 2003, CESAR NETO *et al.* 2004), sendo encontradas em baixos níveis em tecidos normais, e em altas concentrações nos tecidos inflamados (KINANE *et al.* 2003). Dessa forma acredita-se que MMPs e TIMPs estejam envolvidos na remodelação fisiológica dos tecidos periodontais assim como na

destruição tecidual vista nas doenças periodontais (REDDY *et al.* 2003). Além da destruição do tecido conjuntivo, a reabsorção óssea alveolar é um evento chave na etiopatogenia das doenças periodontais. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre a remodelação óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. O RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B), seu receptor celular RANK (receptor de ativação do fator nuclear κ B), e osteoprotegerina (OPG), que atua como receptor antagonista de RANKL foram recentemente identificados como componentes moleculares dos sistemas de remodelação óssea. A ligação de RANKL a RANK, expresso nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulatório para sua diferenciação e posterior ativação. Os efeitos de RANKL são regulados pela OPG, que inibe a reabsorção óssea impedindo a interação entre RANK e RANKL (TEITELBAUM 2000). Assim como previamente descrito para o sistema MMPs/TIMPs, alterações no balanço da expressão de RANKL e OPG estão relacionadas como componente chave na patogênese de diversas patologias ósseas (ROMAS *et al.* 2002). Com relação às doenças periodontais, estudos têm demonstrado que níveis elevados de RANKL são encontrados no fluido crevicular gengival e nos tecidos periodontais em condições de doença. Tais estudos também sugerem que o balanço entre RANKL e OPG supostamente determina a atividade da doença (TENG 2000, CROTTI *et al.* 2003, GARLET *et al.* 2004).

Tendo em vista o potencial envolvimento dos sistemas MMPS/TIMPS e RANKL/OPG na patogênese da doença periodontal, se torna importante o conhecimento dos fatores potencialmente envolvidos na regulação de tais fatores no microambiente periodontal. Diversos estudos têm sugerido que a produção de diversas citocinas pró e antiinflamatórias nos tecidos periodontais seria um fator relevante para a determinação do curso e/ou severidade da doença, provavelmente regulando o equilíbrio entre MMPs e TIMPs, e entre RANKL e OPG (UKAI *et al.* 2001, TENG 2002, GARLET *et al.* 2003, GEMMEL & SEYMOUR 2004, GARLET *et al.* 2004). Contudo, o papel individual das diversas citocinas potencialmente envolvidas na patogênese da doença periodontal, os mecanismos moleculares envolvidos em sua função e sua relevância para a progressão da doença são pouco conhecidos.

Provavelmente o conhecimento mais estabelecido com relação à patogênese das doenças periodontais esteja relacionado ao papel das citocinas inflamatórias clássicas, dentre as quais se destaca o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (GENGO 1992, BAKER 2000, KINANE & LAPPIN 2001). O TNF- α age em diversos passos nos mecanismos de recrutamento de leucócitos, induzindo o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e em leucócitos; e estimulando a produção local de quimiocinas, que por sua vez, atuam na manutenção e/ou amplificação da reação inflamatória local (OFFENBACHER *et al.* 1989, GRAVES & JIANG 1995). Além disso, o TNF- α participa diretamente da estimulação da imunidade inata e da atividade bactericida de fagócitos (DINARELLO 2000). Dessa forma, o TNF- α apresenta importante papel na resistência a infecções por diversos patógenos (GRAVES *et al.* 2000). Com relação às doenças periodontais, o TNF- α tem sido identificado em altos níveis em lesões periodontais (GRAVES & COCHRAN 2003). Em modelos experimentais de doença periodontal, o TNF- α está envolvido na migração de leucócitos aos tecidos periodontais, na reabsorção óssea alveolar e na perda de inserção conjuntiva (ASSUMA *et al.* 1998, GRAVES *et al.* 1998, DELIMA *et al.* 2001, GRAVES *et al.* 2001). Contudo, apesar da clara demonstração da relação causa-efeito de TNF- α na patogênese da doença periodontal experimental, os mecanismos moleculares pelos quais tal citocina modula a resposta inflamatória e a severidade da doença não são conhecidos. Além disso, o potencial papel de TNF- α no controle da infecção periodontal permanece incógnito. Uma das possíveis vias de regulação da resposta inflamatória nas doenças periodontais seria a produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (ou T *helper*, Th), que atuariam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais, e desta forma, determinando a atividade ou latência das doenças periodontais (TENG 2003). As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1, que consiste predominantemente de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, ou um padrão do tipo Th2, com características antiinflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral. Tal polarização é determinada por citocinas típicas de cada padrão, envolvendo a participação de quimiocinas e tipos celulares característicos, e determina o prognóstico e curso de diversas doenças infecciosas, inflamatórias e autoimunes (JANKOVIC *et al.* 2001).

Além disso, é importante estabelecer os fatores que podem quebrar a homeostase dos tecidos conjuntivo e ósseo na doença periodontal. Mediadores inflamatórios como

as prostaglandinas (PGE₂) e interferon gama (IFN-γ), têm sido descritos como possíveis reguladores da atividade osteoclastogênica e da expressão das MMPs (HARRIS *et al.* 2002). O efeito reverso é exercido pelas citocinas Th2, como as interleucinas (IL), IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 (HARRIS *et al.* 2002). Mais recentemente tem sido sugerido que em lesões periodontais o balanço entre as citocinas Th1 e Th2 gera uma resposta imunoinflamatória mista, tornando-se um fator relevante no prognóstico da doença periodontal (SEYMOUR & GEMMEL 2001, TAUBMAN & KAWAI 2001, UKAI *et al.* 2001, TENG 2002, GARLET *et al.* 2003).

É geralmente aceito que a remoção mecânica dos contaminantes através da raspagem e alisamento radicular (RAR) com instrumentos manuais constitui a terapia convencional para o tratamento da doença periodontal e uma série de estudos demonstraram melhorias significativas nos parâmetros clínicos e microbiológicos após a terapia periodontal não-cirúrgica (BADERSTEN *et al.* 1987, GREENSTEIN 2000). Com o intuito de aumentar a eficácia dos procedimentos de descontaminação da superfície radicular, instrumentos sônicos e ultra-sônicos foram introduzidos em periodontia. Porém, estudos demonstraram resultados clínicos comparáveis quando da utilização da instrumentação mecânica, sônica ou ultra-sônica (RAMFJORD *et al.* 1987).

Além da terapia mecânica convencional não-cirúrgica e cirúrgica, vários agentes coadjuvantes anti-infecciosos estão disponíveis. Estes incluem a utilização de diferentes anti-sépticos e antimicrobianos (BOLLEN & QUIRYNEN 1996, GREENSTEIN 2000, LOESCHE & GROSSMAN 2001, SIGUSH *et al.* 2001, SLOTS 2002). Embora estas abordagens mecânicas e químicas normalmente resultem em significativa melhora clínica, a completa remoção de espécies bacterianas e seus produtos da superfície dental é ainda muito difícil de ser alcançada. Isto se deve especialmente à estrutura do biofilme microbiano que confere notável resistência aos microrganismos (NICHOLS *et al.* 1989, HOYLE *et al.* 1990, FERES *et al.* 2001). Além disso, quanto ao uso de antimicrobianos sistêmicos, existe uma maior preocupação relacionada ao desenvolvimento de resistência bacteriana (PALLASCH 2003).

Apesar do fato de que o tratamento periodontal não-cirúrgico resulte em significativa melhora clínica na grande maioria dos casos, nenhuma das técnicas atualmente disponíveis são previsíveis na completa eliminação do cálculo e

principalmente das bactérias responsáveis pela perpetuação da doença periodontal (GREENSTEIN 1992, MOORE *et al.* 1986, BADERSTEN *et al.* 1987). Estas limitações poderiam ser atribuídas a vários fatores, tais como a complexa anatomia radicular dos dentes (RAMFJORD *et al.* 1987), a invasão de patógenos periodontais nos tecidos moles (RENVERT *et al.* 1990, TAKAMATSU *et al.* 1999) ou a possível recolonização de bolsas periodontais por microrganismos oriundos de outros sítios ou nichos orais infectados (PETERSILKA *et al.* 2002, FUJISE *et al.* 2006).

Mais recentemente, alternativas que venham oferecer a possibilidade eficaz de remoção das bactérias periodontais da superfície radicular, com um mínimo de danos para a saúde sistêmica do hospedeiro estão sendo estudadas. Neste cenário, a terapia antimicrobiana fotodinâmica (TAF) tem sido sugerida como uma nova e promissora abordagem para o tratamento periodontal (de OLIVEIRA *et al.* 2007). A TAF também é chamada de fotosensitização letal, fototerapia ou fotoquimioterapia e foi introduzida no campo da medicina em 1904, sendo definida como a erradicação de células alvo através da utilização de um fotosensitizador e uma fonte de luz com comprimento de onda apropriado (VON TAPPEINER). O mecanismo de ação se dá quando o agente fotosensitizante absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato neste caso o oxigênio, o fotosensitizador, ao retornar ao seu estado natural, transfere a energia ao substrato, formando compostos extremamente reativos e de vida curta como o oxigênio singleto, que pode provocar sérios danos aos microrganismos via oxidação irreversível de componentes celulares. Vários estudos relataram danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular (ROBERTSON *et al.* 2009, SASNAUSKIENE *et al.* 2009, LU *et al.* 2008).

Esta modalidade terapêutica foi originalmente desenvolvida para o tratamento de neoplasias, porém vários microrganismos, inclusive espécies encontradas na cavidade oral, podem ser eliminados conforme demonstrado em modelos experimentais desenvolvidos *in vitro* (SPIKES 1986, MALIK *et al.* 1990, WILSON *et al.* 1992, WAINWRIGHT, 1998). Além disso, alguns fatores de virulência como lipopolissacarídeos e proteases, podem ser reduzidos através da fotosensitização (KÖMERIK *et al.* 2000). A utilização do *laser* de baixa intensidade permite diferenciar os tecidos do hospedeiro das bactérias pela administração de fotosensitizadores, os quais se unem aos microrganismos alvo. O fotosensitizador é um composto capaz

de absorver luz de um determinado comprimento de onda e transformar em energia útil (SHARMAN *et al.* 1999). Existem diferentes famílias de fotosensibilizadores e podem ser classificados de acordo com o comprimento de onda capaz de realizar sua ativação. Os fotosensibilizadores ativados com 400-500nm apresentam pouca penetração nos tecidos (PROFIO & DOIRON 1987), por outro lado os fotosensibilizadores da família das fenotiazinas, como o azul de toluidina e azul de metileno os quais são fotoativados pela luz com comprimento de onda que varia de 620-700nm, parecem ser os mais indicados para tratamento de infecções periodontais por apresentarem um maior poder de penetração (KÖMERIK *et al.* 2002, QIN *et al.* 2008, de ALMEIDA *et al.* 2008). Cada componente é inofensivo, por si só, mas quando combinados, são capazes de produzir agentes citotóxicos letais, os quais podem destruir seletivamente células alvo (SHARMAN *et al.* 1999). A TAF deve ser hábil em preencher o mais importante papel de um agente terapêutico - a capacidade de destruir microrganismos responsáveis pela doença sem causar danos aos tecidos. Estudos desenvolvidos em modelos experimentais utilizando o modelo animal e humano demonstram que a fotosensibilização letal pode suprimir microrganismos (LAWS *et al.* 1985), e seu uso em diversas condições infecciosas pode ser preconizado (SPIKES 1986, MALIK *et al.* 1990, BEDWELL *et al.* 1990).

Visando facilitar o estudo de novos protocolos terapêuticos, modelos experimentais em animais têm sido utilizados com sucesso, uma vez que um número maior de variáveis pode ser controlado, possibilitando a análise individual de fatores da resposta do hospedeiro, assim como o papel de diferentes periodontopatógenos (GENCO *et al.* 1998). O modelo experimental utilizando cães apresenta vantagens como a ocorrência natural da doença periodontal em determinadas espécies, com prevalência e características comparáveis à doença periodontal em humanos (KORTEGAARD *et al.* 2008), além da suscetibilidade à indução de periodontite experimental (SHIBUTANI *et al.* 1997).

Em conjunto, características peculiares da doença periodontal como a anatomia da região periodontal e a diversidade de microrganismos presentes no biofilme microbiano, constituem um verdadeiro desafio aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Portanto, o sucesso da terapia periodontal deve ser baseado na supressão das bactérias periodontopatogênicas e na redução dos sinais inflamatórios.

3. Objetivos

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da terapia antimicrobiana fotodinâmica, associada ou não ao procedimento de raspagem e alisamento radicular como adjuvante para o tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida por ligaduras em cães.

4. Material e Métodos

4.1. Animais de experimentação: Foram utilizados oito cães adultos jovens com peso médio de 30kg. Os animais apresentavam maxila e mandíbula intacta, oclusão atraumática, ausência de lesões bucais virais ou fúngicas e apresentavam boa saúde geral sem envolvimento sistêmico determinado por um médico veterinário, após a realização do exame clínico. Duas semanas antes do início do experimento, os cães receberam tratamentos antiparasitários, complexos polivitamínicos e vacinas e foram monitorados durante todo o curso do experimento por um veterinário. No decorrer do protocolo experimental os animais foram alimentados normalmente com ração e água, sendo que apenas nos dias de experimentação os animais tinham sua alimentação suspensa por 12 horas. Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia, consistindo de sedação através de uma associação de cloridrato de xilazina (5,0mg/kg) e cloridrato de cetamina (15mg/kg), e posteriormente anestesiados com 1ml/kg de tiopentato de sódio (20mg/kg de tiopentato de sódio diluído em 50ml de soro fisiológico). O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (Anexo 9.1).

4.2. Protocolo de indução de doença periodontal: Os procedimentos foram realizados por quadrante em cada cão, nas áreas do segundo ao quarto pré-molar mandibular bilateralmente. A doença periodontal foi induzida através de ligaduras de acordo com a técnica proposta por SCHLIEPHAKE & KRACHT (1997), que consistiu na elevação de um retalho de espessura total e colocação de fio de sutura não absorvível (fio de seda 3-0) em defeitos intra-ósseos criados cirurgicamente, de aproximadamente 1,0mm de profundidade em torno de cada pré-molar (figura 1), após os retalhos foram reposicionados e suturados (figura 2). Os animais foram examinados semanalmente para observação da evolução do quadro inflamatório. Após oito semanas de indução da doença as ligaduras foram removidas, entretanto o tecido granulomatoso não foi curetado e as superfícies radiculares não foram raspadas. A instalação da doença periodontal foi confirmada pela presença visível de placa dentobacteriana, cálculo e sinais clínicos de inflamação além da perda óssea alveolar evidenciada através do exame radiográfico (figuras 3 e 4).

Figura 1: Ligaduras posicionadas em torno dos pré-molares mandibulares

Figura 2: Retalho suturado

Figura 3: Aspecto clínico após 8 semanas de indução de doença periodontal

Figura 4: Radiografia periapical evidenciando perda óssea alveolar

4.3. Tratamentos: Após a constatação do estabelecimento da periodontite através de exame clínico e radiográfico foi realizado o tratamento da doença através das seguintes modalidades:

- Grupo experimental 1: terapia antimicrobiana fotodinâmica (TAF);
- Grupo experimental 2: raspagem e alisamento radicular (RAR);
- Grupo experimental 3: raspagem e alisamento radicular associado à terapia antimicrobiana fotodinâmica (RAR + TAF);

A definição de qual sítio no hemiarco (segundo pré-molar, terceiro pré-molar ou quarto pré-molar mandibulares), que recebeu o tratamento correspondente foi realizada aleatoriamente.

4.3.1. Terapia antimicrobiana fotodinâmica: Após a escolha do elemento dental a ser tratado, foi realizada a raspagem supragengival, em seguida, as bolsas periodontais foram irrigadas com água destilada, após foi aplicado o fotosensibilizador

a base de cloridrato de fenotiazina na concentração de 10mg/ml (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems Grieskirchen, Áustria) (figura 5-B) a partir do fundo da bolsa até a margem gengival (figura 6), deixando agir por 1 minuto. Posteriormente, foram removidos os excessos, incluindo a irrigação da bolsa periodontal, com água destilada. Em seguida a área corada foi irradiada com um *laser* de diodo (Helbo Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems Grieskirchen, Áustria) (figura 5-A), com um comprimento de onda de 660nm e poder máximo de $60\text{mW}/\text{cm}^2$, através da fibra óptica (figuras 5-C e 7) com diâmetro de 0,6mm (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems Grieskirchen, Áustria) por 10 segundos. O tratamento foi realizado nos seis sítios por dente totalizando 1 minuto de tratamento.

Figura 5A-C: A terapia antimicrobiana fotodinâmica foi realizada através de: **(A)** *laser* de diodo com comprimento de onda de 660nm, **(B)** agente fotosensitizador a base de cloridrato de fenotiazina, **(C)** fibra óptica

Figura 6: Fotosensitizador aplicado partindo do fundo da bolsa em direção coronal

Figura 7: Irradiação da área corada através da fibra óptica

4.3.2. Raspagem e alisamento radicular: Após a escolha do dente a ser tratado foi realizada a raspagem e alisamento radicular das superfícies radiculares (figura 8) com curetas de Gracey 3/4, 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA).

Figura 8: Raspagem e alisamento radicular realizada através de instrumentos manuais

4.3.3. Raspagem e alisamento radicular associado à terapia antimicrobiana fotodinâmica: No elemento dental remanescente foi realizada a raspagem e alisamento das superfícies radiculares com curetas de Gracey, posteriormente foi realizada a terapia antimicrobiana fotodinâmica como descrito anteriormente.

Os tempos de avaliação selecionados para a coleta das amostras de tecido periodontal e de placa dentobacteriana subgingival foram: zero hora ou *baseline* (antes da realização dos tratamentos), uma semana, três semanas e quatro semanas após os tratamentos, com dois cães para cada período de avaliação.

4.4. Coleta das amostras de tecido periodontal. Para a extração de RNA e posterior análise da expressão gênica foram coletadas amostras compostas pelo tecido gengival vestibular dos pré-molares mandibulares bilaterais como ilustram as figuras 9 e 10. Para sua remoção foram realizadas duas incisões uma distal e outra mesial, partindo da margem gengival no centro da face vestibular, medindo aproximadamente 5,0mm de largura e estendendo-se até à junção muco-gengival, em seguida, uma terceira incisão horizontal era realizada apicalmente, unindo as duas outras incisões. O fragmento foi removido com o auxílio de um descolador de Molt. Posteriormente as margens de onde foi removido o tecido foram dissecadas, aproximadas e suturadas. As amostras eram então divididas em três partes no sentido cérvico-apical (figura 11) e dois fragmentos eram transferidos para dois microtubos contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (figura

12), e armazenadas a -70°C para a análise de expressão gênica das citocinas avaliadas. O terceiro fragmento era transferido para um microtubo contendo água de mili-Q (figura 13) e armazenado a -70°C , para a posterior análise da carga bacteriana total presente nos tecidos periodontais.

Figura 9: Região onde foram removidas as amostras de tecido periodontal

Figura 10: Tecido periodontal removido

Figura 11: Tecido periodontal dividido para o processamento das diferentes análises

Figuras 12 e 13: Tecido periodontal armazenado para diferentes análises

4.5. Extração de RNA e transcrição reversa. A extração do RNA total foi realizada com a utilização do reagente Trizol, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Brevemente, após a coleta de cada amostra, estas eram transferidas para um microtubo contendo o reagente Trizol (na proporção de 1,0ml de reagente para cada 1,0mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1,0ml da suspensão foi adicionado 0,2ml de clorofórmio, sendo as amostras centrifugadas a 12000rpm por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, submetido à agitação em aparelho tipo vórtex e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram

centrifugados a 12000rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 100%, sendo então seco à temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel filtro. As amostras de RNA foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de RNase, sendo então armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 5,0µl foi utilizada para determinar a concentração de RNA/µl nas amostras através de espectrofotometria em 260nm (GeneQuant, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através reação de transcrição reversa, (Superscript II – Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando 2,5ng de RNA e tendo como o volume final de reação 20µl.

4.6. Reações de RealTime PCR. A expressão de citocinas assim como a quantificação de carga bacteriana total no tecido periodontal, foi analisada através de reações de RealTime PCR, utilizando o sistema *TaqMan* em termociclador (MiniOpticon, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). *Primers* e sondas adequadas para tais alvos foram sintetizados através de um *software* específico (Primer Express, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e se encontram descritos, assim como a temperatura de anelamento (tA) na tabela 1. Para as reações de RealTime PCR foram utilizados 12,5µl de um reagente (TaqMan Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que contém o fluoróforo repórter; a enzima polimerase *AmpliTaq Gold*; DNTPs; e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados, 2,5ng de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 4,0µl de água de mili-Q tratada com DEPC, e 0,1µg de cada *primer*. A reação de amplificação compreendeu basicamente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Previamente, as reações de RealTime PCR foram otimizadas com relação as concentrações ideais de cada par de *primers* e temperatura de anelamento, de modo a maximizar a eficiência e a especificidade de amplificação. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e quantifica as amostras através da análise do nível de fluorescência decorrente da amplificação durante o curso da reação. Os valores de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar) foram considerados, sendo este ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras atinge um nível pré-estabelecido (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. As mesmas amostras foram submetidas a reações para detecção de RNA mensageiro

para a β -actina, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação; assim como os níveis de expressão de β -actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra isenta de DNA (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados. Para as reações de RealTime PCR, foram utilizadas independentemente amostras de cDNA proveniente do RNA extraído do tecido periodontal de 2 animais (6 amostras por animal, duas para cada tratamento realizado) para cada tempo experimental (zero hora, uma semana, três semanas e quatro semanas) após a realização dos tratamentos. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP, da expressão de mRNA para o gene alvo.

4.7. Quantificação da carga bacteriana total. Para a quantificação da carga bacteriana total, o DNA genômico foi extraído dos tecidos periodontais como previamente descrito (TROMBONE *et al.* 2009). Foi utilizado o sistema *TaqMan* em termociclador (MiniOpticon, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O DNA bacteriano foi utilizado juntamente com o reagente *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a quantificação da carga bacteriana total foram empregadas reações de RealTime PCR, nas quais foram utilizados 12,5 μ l do reagente *TaqMan Master Mix* e sonda/*primers* para RNA ribossomal 16S (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) 5,0ng de DNA bacteriano, 4,0 μ l de água de mili-Q tratada com DEPC, e 0,2 μ g de cada *primer* (as seqüências dos *primers* e sondas estão descritas na tabela 1). A reação compreendeu basicamente 2 minutos a 50°C e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os resultados foram analisados com base no valor Ct (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), como previamente descrito. Assim como descrito para as análise de expressão gênica, as reações de RealTime PCR para a quantificação de carga bacteriana total foram otimizadas com relação às concentrações ideais de cada par de *primers* e temperatura de anelamento, de modo a maximizar a eficiência e a especificidade de amplificação. Para as reações de RealTime PCR, foram utilizadas independentemente amostras de DNA proveniente do tecido periodontal de 2 animais (6 amostras por animal, duas para cada tratamento realizado) para cada tempo experimental (zero hora, uma semana, três semanas e quatro semanas) após a realização dos tratamentos. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP, da expressão do DNA alvo.

Tabela 1: Seqüência dos *primers* e propriedade das reações.

Gene Alvo	Seqüência das sondas	tA (°C)
TNF	TCTCGAACCCCAAGTGACAAG	56
	GGAGCTGCCCCTCAGCTT	
	CAGTAGCTCATGTTGTAGCAAACCCC	
IL-6	CCTGGTGATGGCTACTGCTTTC	55
	TGGCATCATCCTTGGAATCTC	
	CTACCCCGGGACCCCTGGC	
IL-10	TCGGAGATGATCCAGTTTTACTT	58
	CTTGATGTCTGGGTCGTGGTT	
	AGGAGGTGATGCCCCGGGC	
MMP-1	CGGCCACTCCTTAGGTCTTG	58
	CGTGTAGGTGTAGATGGGAAACAT	
	CACTCCAAGGACCCGGGAGCACT	
RANKL	GCGTCGCCCTGTTCTCTA	56
	TGCAGTGAGTGTCATCTTCTGATATT	
	TTCAGGGCTCAGATGGATCCTAAT	
OPG	GCACAGCAAAGCGGAAGACT	56
	TGTGCCACAGGTCCGTGTAG	
	TGTGTGTCCCTTGTCCTCAACC	
16S rRNA gene	CCATGAAGTCGGAATCGCTAG	58
	GCTTGACGGGCGGTGT	
	TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG	

4.8. Coleta de biofilme microbiano subgengival. Foram coletadas dos sítios tratados, amostras de biofilme microbiano subgengival da seguinte maneira: após a remoção cuidadosa da placa dentobacteriana supragengival presente, foi realizado o isolamento relativo do campo com rolos de algodão estéril para não haver interferência da saliva, posteriormente com uma cureta estéril foi coletado uma amostra de biofilme microbiano subgengival em um único golpe, partindo do fundo da bolsa até a superfície (figura 14). As amostras foram armazenadas em microtubos estéreis contendo 150µl de TE (10nM Tris-HCl, 1,0mM EDTA, pH 7,6) em seguida foi acrescido 100µl de 0,5M de NaOH (figura 15). As amostras foram estocadas em refrigeradores a -20°C para posterior análise bacteriana através da técnica de hibridização DNA-DNA *checkerboard*. Esta técnica permitiu identificar a presença e a contagem média de 40 espécies microbianas.

Figura 14: Coleta de biofilme dentobacteriano subgengival em um único golpe partindo do fundo da bolsa

Figura 15: Amostra de biofilme microbiano armazenada em microtubos estéreis contendo a solução tampão

4.9. Determinação dos microrganismos orais (técnica de Hibridização DNA-DNA) (SOCRANSKY *et al.* 1994). As suspensões foram fervidas em banho-maria por 5 minutos e em seguidas neutralizadas pela adição de 0,8ml de 5,0M de acetato de amônia. Com isso, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução. Cada suspensão de placa contendo DNA livre foi depositada nas fendas do *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e o DNA concentrado na membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). A membrana foi removida do aparato e o DNA depositado foi então fixado na mesma por aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos. As duas últimas canaletas do *Minislot* abrigaram os controles, contendo uma mistura das espécies de microrganismos que foram investigados pelas sondas

de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas. As cepas de referência (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) para o desenvolvimento das sondas de DNA estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA

Actinomyces		<i>Campylobacter rectus</i>	33238
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860	<i>Campylobacter showae</i>	51146
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Eubacterium nodatum</i>	33099
<i>Actinomyces naeslundii</i> genospecies 1	12104	<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp.	25586
<i>Actinomyces naeslundii</i> genospecies 2	43146	<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. polymorphum	10953
		<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. vincentii	49256
Complexo Roxo		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Peptostreptococcus micra</i>	33270
<i>Veillonella parvula</i>	10790	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
		<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
Complexo Amarelo		<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558		
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Complexo Vermelho	
<i>Streptococcus mitis</i>	49456	<i>Tannerella forsythia</i>	43037
<i>Streptococcus oralis</i>	35037	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	<i>Treponema denticola</i>	B1
Complexo Verde		Outras espécies	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> a	43718	<i>Gemella morbillorum</i>	27824
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> b	29523	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Propionibacterium acnes</i> I and II	11827 + 11828
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
		<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
Complexo Laranja		<i>Treponema socranskii</i>	D40DR2
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271

4.10. Hibridização das membranas com as sondas de DNA. Após a fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 hora em uma solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 x solução salina citrada (SSC) (1 x SSC = 150mM NaCl, 15M de citrato de sódio, pH 7,0), 25mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do *Miniblotter 45* (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às canaletas do *Miniblotter*. O *Miniblotter* contém 45 canaletas que servem cada uma para a colocação de uma sonda de DNA.

4.11. Sondas de DNA. As sondas de DNA foram confeccionadas usando o *Random Primer Digoxigenin Labeling Kit* (Boehringer GmbH, Ingelheim, Alemanha), como descrito por FEINBERG & VOGELSTEIN (1983). Sondas de DNA específicas para 40 espécies foram usadas nesse estudo. Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação com diferentes tipos de doenças e saúde periodontal (TANNER,

1992). Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura padrão contendo as espécies investigadas, em uma concentração de 10^4 células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas fosse semelhante. Cada canaleta do *Miniblotter 45* foi preenchida com 130 μ l de uma determinada sonda, contida em uma solução de hibridização (45% formamida, 5 x SSC, 25mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0.2mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20ng/ml de sonda de DNA). As sondas hibridizadas foram dispostas perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais. O aparato, contendo as membranas, foi colocado dentro de uma embalagem plástica para evitar a desidratação das mesmas. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu a 42°C, durante um período mínimo de 20 horas.

4.12. Detecção das espécies. Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter* e lavadas por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 20 minutos, a 65°C, em uma solução adstringente [0,1 x (SSC), 0,1% dodecilsulfato de sódio (SDS)], a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora em uma solução contendo 0,1M ácido maleico, 3,0M NaCl, 0,2M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0 e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer GmbH, Ingelheim, Alemanha), em uma diluição de 1/25,000 (ENGLER-BLUM *et al.* 1993). As membranas foram lavadas com uma solução de 0,1M ácido maleico, 3,0M NaCl, 0,2M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0 duas vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1M Tris HCl, 0,1M NaCl, 50mM MgCl₂, pH 9,5. Em seguida, as membranas foram incubadas em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina (CDP-Star, Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra), por 45 minutos a 37°C. Finalmente, as membranas foram colocadas em um cassete sob um filme radiográfico 18 x 24cm (Agfa Gevaert NV, Mortsel, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos, e revelados logo em seguida pelo método convencional de soluções reveladora/ fixadora e temperatura/tempo.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e “cego” para as variáveis testadas da seguinte forma: cada sinal

produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois padrões contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número zero será registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivalerá a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivalerá a 10^5 células; 3, entre 10^5 e 10^6 células; 4 a 10^6 células e 5, mais de 10^6 células. Estes registros serão utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas. Foi coletado biofilme microbiano subgengival em quatro diferentes tempos: zero hora, ou seja, anteriormente a realização dos tratamentos, uma semana, três semanas e quatro semanas após a realização dos tratamentos. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP, da contagem bacteriana $\times 10^5$.

4.13. Análise estatística. Para a análise dos dados microbiológicos 40 variáveis dependentes (contagem média de microorganismos avaliados) e dois fatores de variação (tratamentos e tempos) foram estudados. Por meio da análise descritiva, apresentaram-se as médias e desvios padrão para cada variável em função dos fatores. A influência dos tratamentos e tempos sobre os resultados foi averiguada por meio de equações de estimação generalizadas (EEG).

Para a análise dos dados de expressão gênica seis variáveis dependentes (citocinas avaliadas) e dois fatores de variação (tratamentos e tempos) foram estudados. Por meio da análise descritiva, apresentaram-se as médias e desvios padrão para cada variável em função dos fatores. A influência dos tratamentos e tempos sobre os resultados, bem como sua interação, foi averiguada por meio de análise de variância (ANOVA) mista para dois fatores. Quando relevante, o teste HSD de Tukey foi empregado para comparação entre pares.

Todos os testes utilizados obedeceram a um nível de significância de 0,05 e foram realizados por meio de um programa estatístico específico (SPSS 15.0.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5. Resultados

5.1. Resultados clínicos. A indução da doença periodontal através de ligaduras ocorreu sem intercorrências e resultou em acúmulo de placa dentobacteriana, inflamação gengival, sangramento à sondagem e perda óssea alveolar verificada através de exame radiográfico. Após a realização dos tratamentos nenhuma complicação foi observada, como o desenvolvimento de abscessos ou sinais de infecção. Durante o período experimental os cães ganharam peso e não desenvolveram nenhum sinal ou sintoma de doenças.

5.2. Resultados para expressão gênica: Os resultados para as citocinas avaliadas TNF- α , MMP-1, IL-6, IL-10, RANKL, OPG serão descritos a seguir.

5.2.1. Expressão de TNF- α . A figura 16 demonstra a expressão de TNF- α em relação aos tempos de observação e tratamentos realizados, uma redução progressiva na expressão de TNF- α pode ser observada no decorrer dos períodos de avaliação (tabela 3). Não foi observado influência dos tratamentos sobre os resultados encontrados ($P = 0,089$). Além disso, o fator tempo foi considerado estatisticamente significativo independente do tratamento realizado ($P < 0,001$) (tabela 4). A expressão de TNF- α foi gradativamente sendo reduzida ao longo dos períodos de observação independente dos tratamentos, e entre os tempos de três e quatro semanas não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Figura 16: Resultados médios para TNF- α em função dos tempos, independente do tratamento. As barras de erro representam os intervalos de confiança a 95%. Valores marcados com * não possuem diferença significante entre si (teste HSD de Tukey).

Tabela 3: Resultados médios (e desvios padrão) para TNF- α , de acordo com os diferentes tratamentos e tempos.

Tempo (semanas)	TAF	RAR	RAR + TAF
0 (Inicial)	7,4 (1,1)	6,7 (1,3)	6,6 (0,7)
1	4,6 (1,2)	4,4 (1,2)	4,1 (1,1)
3	1,0 (0,7)	0,9 (0,1)	0,8 (0,4)
4	0,4 (0,3)	0,3 (0,3)	0,2 (0,2)

Tabela 4: ANOVA para TNF- α .

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Intra indivíduos</i>					
Tratamento	1,21	2	0,61	2,68	0,089
Tratamento X Tempo	0,66	6	0,11	0,48	0,814
Resíduo	5,43	24	0,23		
<i>Entre indivíduos</i>					
Tempo	346,92	3	115,64	70,61	<0,001*
Resíduo	19,65	12	1,64		

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

5.2.2. Expressão de MMP-1. A figura 17 e a tabela 5 demonstram os resultados para a expressão de MMP-1 em relação aos tempos de observação e tratamentos realizados. Houve uma redução significativa na expressão de MMP-1; inicialmente a expressão encontrada foi de $10,3 \pm 1,6$ (TAF); $10,5 \pm 0,8$ (RAR) e $10,1 \pm 0,8$ (RAR + TAF), no tempo de avaliação de uma semana a expressão foi reduzida para $3,0 \pm 0,7$ (TAF); $3,2 \pm 0,5$ (RAR) e $2,7 \pm 1,0$ (RAR + TAF). Não foi observado influência dos tratamentos sobre os resultados encontrados ($P = 0,480$). O fator tempo se mostrou estatisticamente significativo independente do tratamento realizado ($P < 0,001$) (tabela 6). Foi observada uma redução gradual na expressão de MMP-1 ao longo dos períodos de avaliação não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tempos finais de três e quatro semanas ($P > 0,05$).

Figura 17: Resultados médios para MMP-1 em função dos tempos, independente do tratamento. As barras de erro representam os intervalos de confiança a 95%. Valores marcados com * não possuem diferença significante entre si (teste HSD de Tukey).

Tabela 5: Resultados médios (e desvios padrão) para MMP-1, de acordo com os diferentes tratamentos e tempos.

Tempo (semanas)	TAF	RAR	RAR + TAF
0 (Inicial)	10,3 (1,6)	10,5 (0,8)	10,1 (0,8)
1	3,0 (0,7)	3,2 (0,5)	2,7 (1,00)
3	1,1 (0,1)	1,1 (0,3)	1,0 (0,1)
4	0,4 (0,2)	0,5 (0,3)	0,3 (0,1)

Tabela 6: ANOVA para MMP-1.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Intra indivíduos</i>					
Tratamento	0,61	2	0,31	0,76	0,480
Tratamento X Tempo	0,25	6	0,04	0,10	0,995
Resíduo	9,68	24	0,40		
<i>Entre indivíduos</i>					
Tempo	744,40	3	248,13	395,21	<0,001*
Resíduo	7,53	12	0,63		

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

5.2.3. Expressão de IL-6. A figura 18 e a tabela 7 demonstram os resultados encontrados para a expressão de IL-6 em relação aos tempos de observação e tratamentos realizados. No tempo zero foi observada uma expressão para IL-6 de $9,5 \pm 1,4$ (TAF); $9,3 \pm 1,1$ (RAR) e $8,9 \pm 1,0$ (RAR + TAF), no tempo de avaliação de uma semana a expressão foi reduzida para $3,9 \pm 1,0$ (TAF); $5,0 \pm 1,4$ (RAR) e $3,8 \pm 0,7$ (RAR + TAF). No período de avaliação de três semanas as terapias testadas levaram à mesma expressão de IL-6 (0,7) ($P > 0,05$), o mesmo foi observado no período de avaliação de quatro semanas onde a expressão de IL-6 foi nula (0,0) ($P > 0,05$). Não foi observado influência dos tratamentos sobre os resultados encontrados ($P = 0,168$). O fator tempo se mostrou estatisticamente significativo independente do tratamento realizado ($P < 0,001$) (tabela 8).

Figura 18: Resultados médios para IL-6 em função dos tempos, independente do tratamento. As barras de erro representam os intervalos de confiança a 95%. Valores marcados com * não possuem diferença significante entre si (teste HSD de Tukey).

Tabela 7: Resultados médios (e desvios padrão) para IL-6, de acordo com os diferentes tratamentos e tempos.

Tempo (semanas)	TAF	RAR	RAR + TAF
0 (Inicial)	9,5 (1,4)	9,3 (1,1)	8,9 (1,0)
1	3,9 (1,0)	5,0 (1,4)	3,8 (0,7)
3	0,7 (0,6)	0,7 (0,5)	0,7 (0,7)
4	0,0 (0,1)	0,0 (0,1)	0,0 (0,0)

Tabela 8: ANOVA para IL-6.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Intra indivíduos</i>					
Tratamento	1,51	2	0,75	1,92	0,168
Tratamento X Tempo	3,18	6	0,53	1,35	0,274
Resíduo	9,41	24	0,39		
<i>Entre indivíduos</i>					
Tempo	640,05	3	213,35	158,26	<0,001*
Resíduo	16,18	12	1,35		

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

5.2.4. Expressão de IL-10. A figura 19 e a tabela 9 demonstram os resultados encontrados para a expressão de IL-10 em relação aos tempos de observação e tratamentos realizados. O fator tempo se mostrou estatisticamente significativo independente do tratamento realizado ($P < 0,001$) (tabela 10), entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tempos de avaliação inicial e de uma semana ($P > 0,05$) e entre os períodos de observação tardios de três e quatro semanas ($P > 0,05$), avaliada pelo teste HSD de Tukey. Não foi observado influência dos tratamentos sobre os resultados encontrados ($P = 0,137$).

Figura 19: Resultados médios para IL-10 em função dos tempos, independente do tratamento. As barras de erro representam os intervalos de confiança a 95%. Valores marcados com símbolos iguais († ou *) não possuem diferença significativa entre si (teste HSD de Tukey).

Tabela 9: Resultados médios (e desvios padrão) para IL-10, de acordo com os diferentes tratamentos e tempos.

Tempo (semanas)	TAF	RAR	RAR + TAF
0 (Inicial)	6,7 (1,1)	6,4 (0,8)	6,2 (1,0)
1	5,8 (2,5)	5,6 (2,5)	4,7 (1,7)
3	2,4 (0,5)	2,2 (0,7)	2,1 (0,4)
4	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,1 (0,0)

Tabela 10: ANOVA para IL-10.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Intra indivíduos</i>					
Tratamento	1,86	2	0,93	2,17	0,137
Tratamento X Tempo	1,51	6	0,25	0,58	0,739
Resíduo	10,33	24	0,43		
<i>Entre indivíduos</i>					
Tempo	299,07	3	99,69	25,40	<0,001*
Resíduo	47,09	12	3,92		

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

5.2.5. Expressão de RANKL. A figura 20 e a tabela 11 demonstram os resultados encontrados para a expressão de RANKL em relação aos tempos de observação e tratamentos realizados. Houve uma redução significativa na expressão de RANKL, inicialmente a expressão foi de $10,9 \pm 1,2$ (TAF); $10,9 \pm 1,6$ (RAR) e $10,2 \pm 1,0$ (RAR + TAF), no tempo de avaliação de uma semana a expressão foi consideravelmente reduzida para $1,8 \pm 0,4$ (TAF); $1,8 \pm 0,4$ (RAR) e $1,7 \pm 0,2$ (RAR + TAF), e continuou sendo reduzida nos períodos tardios de observação, sendo que não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os períodos de três e quatro semanas ($P > 0,05$). Ainda, não foi detectada influência dos tratamentos sobre os resultados encontrados ($P = 0,079$). Adicionalmente, o fator tempo se mostrou estatisticamente significativo independente do tratamento realizado ($P < 0,001$) (tabela 12).

Figura 20: Resultados médios para RANKL em função dos tempos, independente do tratamento. As barras de erro representam os intervalos de confiança a 95%. Valores marcados com * não possuem diferença significativa entre si (teste HSD de Tukey).

Tabela 11: Resultados médios (e desvios padrão) para RANKL, de acordo com os diferentes tratamentos e tempos.

Tempo (semanas)	TAF	RAR	RAR + TAF
0 (Inicial)	10,9 (1,2)	10,9 (1,6)	10,2 (1,0)
1	1,8 (0,4)	1,8 (0,4)	1,7 (0,2)
3	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)
4	0,1 (0,1)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)

Tabela 12: ANOVA para RANKL.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Intra indivíduos[§]</i>					
Tratamento	0,55	1	0,55	3,69	0,079
Tratamento X Tempo	0,94	3	0,31	2,08	0,157
Resíduo	1,80	12	0,15		
<i>Entre indivíduos</i>					
Tempo	918,93	3	306,31	257,47	<0,001*
Resíduo	14,28	12	1,19		

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

[§] Ajustado conforme a violação da premissa de esfericidade

5.2.6. Expressão de OPG. A figura 21 e a tabela 13 demonstram os resultados encontrados para a expressão gênica de OPG em relação aos tempos de observação e tratamentos realizados. Inicialmente a expressão foi de $7,3 \pm 1,1$ (TAF); $6,7 \pm 0,3$ (RAR) e $6,5 \pm 0,9$ (RAR + TAF), após uma semana a expressão foi reduzida discretamente para $5,0 \pm 0,2$ (TAF); $4,9 \pm 0,5$ (RAR) e $4,4 \pm 0,3$ (RAR + TAF), posteriormente houve uma maior redução no período de três semanas $0,3 \pm 0,0$ (TAF); $0,4 \pm 0,1$ (RAR) e $0,2 \pm 0,1$ (RAR + TAF), e a expressão permaneceu estável ao final de quatro semanas, sem diferenças estatisticamente significantes ($P > 0,05$). Não foi observado influência dos tratamentos sobre os resultados encontrados ($P = 0,081$). Adicionalmente, o fator tempo se mostrou estatisticamente significativo independente do tratamento realizado ($P < 0,001$) (tabela 14).

Figura 21: Resultados médios para o OPG em função dos tempos, independente do tratamento. As barras de erro representam os intervalos de confiança a 95%. Valores marcados com * não possuem diferença significativa entre si (teste HSD de Tukey).

Tabela 13: Resultados médios (e desvios padrão) para OPG, de acordo com os diferentes tratamentos e tempos.

Tempo (semanas)	TAF	RAR	RAR + TAF
0 (Inicial)	7,3 (1,1)	6,7 (0,3)	6,5 (0,9)
1	5,0 (0,2)	4,9 (0,5)	4,4 (0,3)
3	0,3 (0,0)	0,4 (0,1)	0,2 (0,1)
4	0,3 (0,0)	0,3 (0,1)	0,2 (0,1)

Tabela 14: ANOVA para OPG

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Intra indivíduos[§]</i>					
Tratamento	1,21	1	1,21	3,62	0,081
Tratamento X Tempo	1,19	3	0,40	1,18	0,357
Resíduo	4,02	12	0,34		
<i>Entre indivíduos</i>					
Tempo	385,52	3	128,51	431,67	<0,001*
Resíduo	3,57	12	0,30		

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

[§] Ajustado conforme a violação da premissa de esfericidade.

5.2.7. Quantificação da carga bacteriana total. A figura 22 e a tabela 15 demonstram os resultados obtidos para a quantificação da carga bacteriana total em relação aos tempos de observação e tratamentos realizados. Em relação aos períodos de observação a quantificação da carga bacteriana total seguiu o mesmo padrão das citocinas avaliadas, onde foi observada uma redução progressiva durante os períodos de observação ($P < 0,001$) (tabela 16), sendo que a após o período de três semanas houve uma estabilização nos valores encontrados ($P > 0,05$), avaliada pelo teste HSD de Tukey. Não foi observado influência dos tratamentos sobre os resultados encontrados ($P = 0,777$).

Figura 22: Resultados médios para carga bacteriana total em função dos tempos, independente do grupo. As barras de erro representam os intervalos de confiança a 95%. Valores marcados com * não possuem diferença significativa entre si (teste HSD de Tukey).

Tabela 15: Resultados médios (e desvios padrão) para carga bacteriana total, de acordo com os diferentes tratamentos e tempos.

Tempo (semanas)	TAF	RAR	RAR + TAF
0 (Inicial)	9,4 (1,4)	10,9 (1,9)	10,7 (2,1)
1	3,3 (0,6)	2,4 (0,5)	1,7 (0,4)
3	0,5 (0,1)	0,4 (0,2)	0,3 (0,1)
4	0,4 (0,1)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)

Tabela 16: ANOVA para carga bacteriana total.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Intra indivíduos</i>					
Tratamento	0,59	2	0,29	0,26	0,777
Tratamento X Tempo	10,78	6	1,80	1,56	0,201
Resíduo	27,58	24	1,15		
<i>Entre indivíduos</i>					
Tempo	812,50	3	270,83	556,45	<0,001*
Resíduo	5,84	12	0,49		

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

5.3. Resultados microbiológicos. Os resultados microbiológicos completos estão apresentados na tabela 17 e na figura 23 e podem ser resumidos da seguinte maneira:

5.3.1 Comparação entre os tratamentos. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos RAR, TAF e RAR + TAF, em 25 das 40 espécies bacterianas investigadas. *A. gerencseriae*, *A. odontolyticus*, *S. gordonii*, *C. sputigena*, *T. forsythia*, *T. socranskii* ($P < 0,05$); *A. israelii*, *A. naeslundii* 1, *P. intermedia*, *T. denticola*, *E. saburreum* ($P < 0,01$); *A. naeslundii* 2, *V. parvula*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nuc. ss polymorphum*, *F. periodonticum*, *P. micra*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*, *P. gingivalis*, *G. morbillorum* e *S. anginosus* ($P < 0,001$).

5.3.2 Comparação entre os tempos de avaliação. Entre os períodos de avaliação (*baseline*, uma semana, três semanas e quatro semanas) foram observadas diferenças estatisticamente significantes em 37 das 40 espécies bacterianas avaliadas. *C. gracilis* ($P < 0,05$); *L. buccalis*, *N. mucosa* ($P < 0,01$); *A. gerencseriae*,

A. israelii, *A. naeslundii* 1, *A. naeslundii* 2, *A. odontolyticus*, *V. parvula*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nuc. ss nucleatum*, *F. nuc. ss polymorphum*, *F. nuc. ss vincentii*, *F. periodonticum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *E. saburreum*, *G. morbillorum*, *P. acnes*, *P. melaninogenica*, *S. anginosus*, *S. noxia* e *T. socranskii* ($P < 0,001$).

No *baseline* todas as bactérias avaliadas foram detectadas em diferentes níveis como pode ser observado na tabela 17. Após uma semana da realização da realização das terapias houve uma redução em grande parte das espécies avaliadas para todos os tratamentos realizados ($P < 0,001$), entretanto nesse período de observação foi verificado um aumento na contagem média de *P. intermedia* ($P < 0,01$), *P. nigrescens* ($P < 0,001$) e *T. forsythia* ($P < 0,05$), para os grupos TAF e RAR + TAF. Por outro lado, o período de observação entre a primeira e a terceira semana foi caracterizado por uma oscilação na contagem média bacteriana. É importante salientar que o grupo dos *Actinomyces* e bactérias pertencentes ao complexo “roxo” e “amarelo” permaneceram em níveis baixos durante este período. Após quatro semanas a contagem média bacteriana permaneceu em níveis reduzidos, enfatizando a redução observada para *P. intermedia* e *P. nigrescens* ($P < 0,001$) quando comparada as valores encontrados após uma semana da realização das terapias. Particularmente, após quatro semanas notou-se uma possível recolonização de *P. gingivalis* e *T. denticola* ($P < 0,001$) para todas as modalidades testadas, sendo mais visível para TAF (*P. gingivalis*) e RAR + TAF (*T. denticola*). Outro aspecto importante foi a contagem observada para *T. forsythia*, a qual permaneceu elevada durante todo o período de observação, especialmente para os grupos TAF e RAR + TAF. Cabe ainda salientar a visível redução na contagem média de *A. actinomycetemcomitans* para o grupo TAF ($P < 0,001$).

5.3.3. Quantificação do *pool bacteriano*. Em relação à análise do *pool bacteriano* (figura 24), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, entretanto quando comparados os tempos de avaliação, foram encontradas diferenças significantes entre os valores do *baseline* e de uma semana e quatro semanas após os tratamentos. Para os outros pares de comparação não foi observada diferenças significantes.

Tabela 17: Os valores representam a média±DP da contagem bacteriana x10⁵

Bacteria	Tratamento	Tempos experimentais			
		Baseline	1 semana	3 semanas	4 semanas
<i>A. gerencseriae</i> *	RAR ¹	3.56±0.92	0.45±0.30	0.83±0.43	0.76±0.39
	TAF ^{1,2}	3.25±1.13	A 0.50±0.30	B 0.28±0.09	B 0.44±0.30
	RAR+TAF ²	2.75±0.93	0.20±0.09	0.21±0.08	0.76±0.39
<i>A. israelii</i> **	RAR ¹	4.70±1.10	1.33±0.46	1.59±0.36	0.90±0.38
	TAF ²	3.83±1.34	A 0.88±0.43	B 0.28±0.10	B 0.54±0.31
	RAR+TAF ^{1,2}	9.14±5.92	0.72±0.39	0.64±0.36	0.71±0.45
<i>A. naeslundii</i> 1 **	RAR ¹	2.63±0.82	0.51±0.36	0.72±0.40	0.73±0.40
	TAF ^{1,2}	2.38±0.75	A 0.51±0.31	B 0.34±0.13	B 0.09±0.07
	RAR+TAF ²	2.63±0.82	0.25±0.13	0.28±0.09	0.15±0.08
<i>A. naeslundii</i> 2 ***	RAR ¹	16.57±8.19	1.14±0.43	2.14±0.87	1.70±0.63
	TAF ²	10.44±6.48	A 1.13±0.62	B 1.27±0.47	B 0.83±0.60
	RAR+TAF ²	10.63±6.08	0.94±0.35	1.41±0.63	1.20±0.65
<i>A. odontolyticus</i> *	RAR ¹	2.19±0.61	0.44±0.31	0.77±0.39	0.39±0.31
	TAF ^{1,2}	2.33±0.84	A 0.38±0.31	B 0.38±0.16	B 0.38±0.31
	RAR+TAF ²	1.82±0.62	0.14±0.08	0.26±0.09	0.25±0.13
<i>V. parvula</i> ***	RAR ¹	15.63±8.13	0.76±0.44	1.09±0.64	0.57±0.37
	TAF ^{1,2}	10.00±6.53	A 0.76±0.39	B 0.15±0.08	B 0.39±0.37
	RAR+TAF ²	9.69±6.22	0.51±0.31	0.21±0.10	0.77±0.61
<i>S. gordonii</i> *	RAR ¹	0.95±0.58	0.00±0.00	0.09±0.07	0.13±0.08
	TAF ²	1.46±0.93	A 0.63±0.41	B 0.16±0.09	A,B 0.01±0.01
	RAR+TAF ^{1,2}	0.83±0.30	0.07±0.06	0.21±0.08	0.08±0.06
<i>S. intermedius</i>	RAR	1.84±0.60	0.08±0.06	0.28±0.09	0.14±0.08
	TAF	1.37±0.79	A 0.13±0.08	B 0.22±0.13	B 0.14±0.08
	RAR+TAF	1.03±0.39	0.10±0.06	0.17±0.12	0.39±0.31
<i>S. mitis</i>	RAR	1.33±0.66	0.13±0.08	0.28±0.09	0.70±0.40
	TAF	1.26±0.64	A 0.63±0.41	A 0.33±0.13	A 0.07±0.06
	RAR+TAF	1.76±0.77	0.45±0.30	0.15±0.08	0.14±0.08
<i>S. oralis</i> ***	RAR ¹	0.84±0.43	0.01±0.01	0.16±0.08	0.14±0.08
	TAF ¹	7.09±6.23	A 0.07±0.06	B 0.04±0.02	B 0.01±0.01
	RAR+TAF ²	0.69±0.35	0.01±0.01	0.07±0.06	0.08±0.06
<i>S. sanguinis</i> ***	RAR ¹	3.31±0.90	0.08±0.06	1.08±0.47	0.95±0.46
	TAF ¹	2.94±0.97	A 0.39±0.31	B,C 0.53±0.31	B 0.39±0.31
	RAR+TAF ²	1.95±0.64	0.14±0.08	0.27±0.13	0.51±0.31
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	RAR	0.76±0.61	0.01±0.01	0.08±0.06	0.32±0.31
	TAF	0.44±0.31	A 0.06±0.06	B 0.15±0.12	C 0.01±0.01
	RAR+TAF	0.46±0.30	0.00±0.00	0.14±0.08	0.32±0.31
<i>C. gingivalis</i>	RAR	0.46±0.30	0.32±0.31	1.08±0.47	0.70±0.40
	TAF	0.78±0.49	A 0.38±0.31	A 1.14±0.55	A 0.33±0.31
	RAR+TAF	0.59±0.30	0.34±0.31	1.02±0.44	0.39±0.31
<i>C. ochracea</i>	RAR	1.84±0.61	0.13±0.08	1.02±0.44	0.39±0.31
	TAF	1.95±0.60	A 0.38±0.31	B 0.58±0.29	B 0.45±0.30
	RAR+TAF	1.38±0.44	0.14±0.08	0.47±0.37	0.46±0.31
<i>C. sputigena</i> *	RAR ¹	1.03±0.44	0.07±0.06	0.09±0.07	0.44±0.30
	TAF ^{1,2}	0.77±0.44	A 0.31±0.31	A,B 0.02±0.01	B 0.06±0.06
	RAR+TAF ²	1.71±0.66	0.06±0.06	0.08±0.06	0.08±0.06
<i>E. corrodens</i>	RAR	1.19±0.50	0.07±0.06	0.65±0.40	0.70±0.40
	TAF	0.89±0.43	A 0.31±0.31	A 0.38±0.15	A 0.32±0.31
	RAR+TAF	1.52±0.62	0.14±0.08	0.20±0.09	0.33±0.31
<i>C. gracilis</i>	RAR	1.45±0.69	0.08±0.06	0.15±0.08	0.39±0.31
	TAF	0.85±0.47	A 0.32±0.31	B 0.10±0.07	A,B 0.13±0.09
	RAR+TAF	1.21±0.50	0.07±0.06	0.46±0.37	0.69±0.45
<i>C. rectus</i>	RAR	0.87±0.42	0.09±0.06	0.66±0.41	0.39±0.31
	TAF	1.54±0.43	A 0.07±0.06	B 0.16±0.12	C 0.02±0.01
	RAR+TAF	1.29±0.42	0.03±0.01	0.45±0.30	0.34±0.31
<i>C. showae</i> ***	RAR ¹	6.72±6.19	0.32±0.31	0.70±0.45	0.38±0.31
	TAF ²	1.45±0.65	A 0.31±0.31	B 0.26±0.14	B 0.00±0.00
	RAR+TAF ²	1.22±0.44	0.19±0.09	0.25±0.09	0.31±0.31
<i>E. nodatum</i> ***	RAR ^{1,2}	0.97±0.59	0.03±0.01	0.09±0.06	0.33±0.31
	TAF ¹	1.21±0.64	A 0.14±0.08	B 0.12±0.06	B,C 0.08±0.07
	RAR+TAF ²	1.10±0.42	0.01±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01
<i>F. nuc. ss. nucleatum</i>	RAR	8.15±6.35	0.63±0.41	1.01±0.65	0.69±0.40
	TAF	2.66±1.01	A 1.07±0.64	B 0.34±0.31	B 0.32±0.31
	RAR+TAF	1.28±0.47	0.51±0.30	0.77±0.62	1.00±0.65

Tabela 17: Continuação

Bacteria	Tratamento	Tempos experimentais						
		Baseline		1 semana		3 semanas	4 semanas	
<i>E. nodatum</i> ***	RAR ^{1,2}	0.97±0.59		0.03±0.01		0.09±0.06	0.33±0.31	
	TAF ¹	1.21±0.64	A	0.14±0.08	B	0.12±0.06	0.08±0.07	C
	RAR+TAF ²	1.10±0.42		0.01±0.01		0.04±0.01	0.02±0.01	
<i>F. nuc. ss. nucleatum</i>	RAR	8.15±6.35		0.63±0.41		1.01±0.65	0.69±0.40	
	TAF	2.66±1.01	A	1.07±0.64	B	0.34±0.31	0.32±0.31	B
	RAR+TAF	1.28±0.47		0.51±0.30		0.77±0.62	1.00±0.65	
<i>F. nuc. ss. Polymorphum</i> ***	RAR ¹	2.92±0.96		0.01±0.01		6.28±6.25	0.33±0.31	
	RAR+TAF ²	9.21±5.91	A	0.71±0.62	B,C	0.03±0.02	0.01±0.01	C
	RAR+TAF ²	1.73±0.71		0.09±0.06		0.10±0.06	0.33±0.31	
<i>F. nuc. ss. vicentii</i>	RAR	3.06±0.89		0.20±0.09		1.08±0.42	0.44±0.31	
	TAF	8.69±6.66	A	0.77±0.61	B	0.33±0.13	0.13±0.08	B
	RAR+TAF	3.13±1.01		0.69±0.40		0.19±0.09	0.69±0.45	
<i>F. periodonticum</i> ***	RAR ¹	1.64±0.80		0.38±0.31		6.64±6.20	0.71±0.62	
	TAF ¹	8.26±6.71	A	6.44±6.22	B	0.34±0.31	0.08±0.06	C
	RAR+TAF ²	2.14±0.63		0.94±0.46		0.66±0.41	0.20±0.09	
<i>P. micra</i> ***	RAR ^{1,2}	0.83±0.44		0.02±0.01		0.83±0.60	0.08±0.06	
	TAF ¹	7.64±6.79	A	0.94±0.66	B	0.16±0.09	0.07±0.06	C
	RAR+TAF ²	1.21±0.61		0.13±0.08		0.02±0.01	0.03±0.01	
<i>P. intermedia</i> **	RAR ¹	7.34±6.13		0.71±0.68		6.46±6.29	0.64±0.62	
	TAF ²	2.09±0.74	A,B	6.70±6.26	A,B	0.59±0.31	0.33±0.31	B
	RAR+TAF ^{1,2}	2.36±0.71		7.63±6.10		6.65±6.55	0.71±0.68	
<i>P. nigrescens</i> ***	RAR ¹	7.79±6.76		0.51±0.30		6.64±6.27	0.70±0.62	
	TAF ²	1.96±0.57	A,B	6.46±6.22	A,B	0.79±0.44	0.33±0.31	B
	RAR+TAF ²	1.77±0.60		8.13±6.04		1.04±0.92	0.71±0.68	
<i>S. constellatus</i> ***	RAR ¹	0.15±0.08		0.00±0.00		0.07±0.06	0.00±0.00	
	TAF ²	1.47±0.83	A	0.06±0.06	B	0.04±0.02	0.00±0.00	D
	RAR+TAF ^{1,2}	0.79±0.61		0.00±0.00		0.01±0.01	0.00±0.00	
<i>T. forsythia</i> *	RAR ^{1,2}	9.75±6.15		8.44±6.70		13.14±8.60	6.69±6.19	
	TAF ¹	4.21±0.93	A,B	10.01±6.55	A,B	20.09±13.24	7.33±6.82	B
	RAR+TAF ²	3.45±0.81		7.84±6.07		18.89±13.12	6.64±6.55	
<i>P. gingivalis</i> ***	RAR ¹	15.00±7.99		1.14±0.63		19.40±13.03	7.69±6.08	
	TAF ²	15.57±7.87	A	7.71±6.16	B	20.46±13.17	19.39±13.06	A,B
	RAR+TAF ^{1,2}	9.58±5.80		1.96±0.89		13.03±8.40	7.53±6.79	
<i>T. denticola</i> **	RAR ¹	14.20±12.26		1.01±0.44		1.40±0.84	6.33±6.24	
	TAF ²	2.01±0.72	A	0.84±0.60	B	1.01±0.45	6.33±6.24	A
	RAR+TAF ^{1,2}	2.14±0.56		0.82±0.38		0.33±0.13	6.34±6.24	
<i>E. saburreum</i> **	RAR ¹	0.13±0.08		0.00±0.00		0.13±0.08	0.31±0.31	
	TAF ^{1,2}	1.38±0.95	A	0.32±0.31	A,B	0.07±0.06	0.00±0.00	B
	RAR+TAF ²	0.76±0.39		0.06±0.06		0.01±0.01	0.00±0.00	
<i>G. morbillorum</i> ***	RAR ¹	0.28±0.13		0.01±0.01		0.04±0.01	0.34±0.31	
	TAF ²	1.07±0.67	A	0.31±0.31	B	0.01±0.01	0.00±0.00	B
	RAR+TAF ²	1.19±0.62		0.06±0.06		0.13±0.08	0.38±0.31	
<i>L. bucallis</i>	RAR	1.35±0.65		0.08±0.06		0.41±0.31	0.64±0.41	
	TAF	0.78±0.44	A	0.31±0.31	A,B	0.03±0.01	0.08±0.06	A,B
	RAR+TAF	0.84±0.44		0.08±0.06		0.08±0.06	0.14±0.08	
<i>N. mucosa</i>	RAR	2.07±0.59		0.94±0.41		0.78±0.44	1.02±0.64	
	TAF	2.39±1.05	A	1.31±0.60	A,B	1.14±0.66	0.76±0.39	B
	RAR+TAF	2.01±0.77		0.78±0.39		1.09±0.63	0.77±0.44	
<i>P. acnes</i>	RAR	1.40±0.64		0.08±0.06		0.26±0.09	0.20±0.09	
	TAF	1.76±0.67	A	0.13±0.08	B	0.28±0.10	0.13±0.12	B
	RAR+TAF	2.76±0.98		0.13±0.09		0.15±0.08	0.25±0.13	
<i>P. melaninogenica</i>	RAR	1.14±0.46		0.08±0.06		1.01±0.49	0.44±0.30	
	TAF	1.51±0.65	A	0.38±0.31	A,B	1.19±0.53	0.14±0.08	B
	RAR+TAF	1.51±0.61		0.51±0.30		0.70±0.40	0.14±0.08	
<i>S. anginosus</i> ***	RAR ¹	0.55±0.30		0.00±0.00		0.34±0.32	0.08±0.06	
	TAF ²	1.54±0.89	A	0.06±0.06	B	0.41±0.30	0.32±0.31	C
	RAR+TAF ¹	0.98±0.34		0.01±0.01		0.33±0.31	0.01±0.01	

Tabela 17: Continuação

Bacteria	Tratamento	Tempos experimentais						
		Baseline		1 semana		3 semanas	4 semanas	
<i>S. noxia</i>	RAR	0.89±0.42		0.09±0.06		0.77±0.40	0.39±0.31	
	TAF	1.01±0.45	A	0.45±0.30	B	1.08±0.43	0.14±0.08	B
	RAR+TAF	1.07±0.45		0.40±0.31		0.40±0.31	0.13±0.09	
<i>T. socranskii</i> *	RAR ¹	3.19±1.03		0.71±0.39		0.51±0.30	0.44±0.31	
	TAF ²	4.69±1.45	A	0.08±0.06	B,C	0.13±0.08	0.94±0.66	A,B
	RAR+TAF ²	3.76±1.16		0.41±0.30		0.02±0.01	1.33±0.94	
Pool bacteriano	RAR ¹	3.77±0.98		0.53±0.28		2.02±1.28	0.98±0.70	
	TAF ¹	3.40±1.32	A	1.33±1.04	B	1.38±0.76	1.04±0.71	A,B
	RAR+TAF ¹	2.45±0.42		0.89±0.53		1.29±0.78	0.88±0.65	

Bactérias com diferenças estatisticamente significantes estão apontadas com * e neste caso, números diferentes foram utilizados para demonstrar diferenças entre os tratamentos (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$). Letras diferentes indicam que os tempos relacionados às bactérias, independente do tratamento realizado apresentou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Figura 23: Contagem média ($\times 10^5$) das bactérias avaliadas nos tempos baseline, uma, três e quatro semanas. Diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos estão indicados com a letra “A” ($P < 0,05$) e diferenças entre os tempos estão indicados com * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Figura 24: Contagem média ($\times 10^5$) do “pool” bacteriano nos tempos *baseline*, uma, três e quatro semanas relacionados aos tratamentos realizados

6. Discussão

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da TAF como adjuvante para o tratamento da doença periodontal induzida por ligaduras em cães, através da análise de parâmetros bioquímicos e microbiológicos. Os cães foram tratados através de RAR, TAF ou através da combinação dos tratamentos e para esta investigação *in vivo* optamos por estabelecer um modelo de doença periodontal mais natural do que se optássemos pela indução de doença através da inoculação de cepas bacterianas, além disso, o tratamento realizado nestas condições se aproxima mais da realidade clínica.

De acordo com os dados obtidos no *baseline* relatando a presença das 40 bactérias avaliadas em diferentes níveis, além das características clínicas e radiográficas observadas, podemos afirmar que o modelo escolhido para o estabelecimento da doença periodontal foi adequado. Os resultados do presente estudo demonstram que os tratamentos testados podem levar a melhoras estatisticamente significantes nos parâmetros avaliados, adicionalmente a observação de que a reparação após a realização dos tratamentos ocorreu sem complicações indica que a terapia periodontal não-cirúrgica realizada através da TAF foi bem tolerada pelos animais.

As doenças periodontais inflamatórias são alterações crônicas dos tecidos de revestimento e suporte dos órgãos dentais, cuja etiopatogenia é dependente da presença de bactérias periodontopatogênicas. Apesar da presença de microrganismos ser fundamental para o início do desenvolvimento da doença, a amplificação e progressão desse processo é altamente dependente da resposta inflamatória e imunológica gerada pelo hospedeiro frente às bactérias ou a seus produtos. Tradicionalmente o sucesso da terapia periodontal é baseado na completa supressão dos microrganismos responsáveis pela instalação e perpetuação da doença e na redução dos sinais inflamatórios. A terapia convencional estabelecida para o tratamento da doença periodontal consiste basicamente na realização da raspagem e alisamento radicular associado ou não a agentes antimicrobianos, esta forma de tratamento é capaz de reduzir a carga bacteriana e atingir um excelente

efeito terapêutico na maioria dos casos (BADERSTEN *et al.* 1987, BERKSTEIN *et al.* 1987, KILLOY 1998). Porém, não existe um critério clínico mensurável, suportado pela literatura, que defina o que constitui uma superfície radicular suficientemente lisa (MOORE *et al.* 1886, BADERSTEN *et al.* 1987, GREENSTEIN 1992).

Entretanto, o sucesso da terapia convencional pode não ser totalmente alcançado em alguns casos, principalmente quando relacionado à total eliminação de depósitos bacterianos, ou seus produtos, em áreas profundas de bolsas periodontais e em regiões de complexa morfologia radicular, como na região das bifurcações, invaginações e concavidades (WASSERMAN & HIRSCHFELD, 1998). Além disso, o aumento na prevalência de resistência bacteriana aos antimicrobianos pode influenciar a eficácia da terapia convencional (SLOTS & RAMS 1990, WALKER 1996). Após a introdução do conceito de biofilme microbiano isso se tornou evidente, uma vez que essa comunidade contém uma variedade de microrganismos agregados, embebidos em uma matriz de polímeros com origem bacteriana e salivar (XIMÉNEZ-FYVIE *et al.* 2000) tornando as bactérias menos acessíveis ao efeito dos antimicrobianos devido à proteção conferida por esta matriz (MEISEL & KOCHER 2005).

Para contornar esses problemas, métodos alternativos se fazem necessários, com o desenvolvimento da tecnologia do *laser* e sua aplicação no campo da medicina com resultados promissores, passou a despertar considerável atenção por parte da comunidade científica voltada para suas possíveis aplicações na odontologia. Uma série de sistemas de *laser* como o CO₂ (TUCKER *et al.* 1996) e Óxido de Ítrio e Alumínio dopado com Neodímio (Nd:YAG) (ROMANOS 1994) foram introduzidos no tratamento da doença periodontal. Entretanto, devido à densidade de energia liberada levaram a efeitos negativos, como a cavitação da superfície radicular (ISRAEL *et al.* 1997). Ainda, o *laser* de Óxido de Ítrio e Alumínio dopado com Érbio (Er:YAG) (AOKI *et al.*, 1994, ANDO *et al.* 1996) e o *laser* de diodo (MORITZ *et al.* 1997) se mostraram capazes de reduzir bactérias de maneira eficiente, causando menos efeitos térmicos quando comparados ao *laser* de Nd:YAG e CO₂. Outra abordagem em potencial para evitar os indesejáveis efeitos térmicos dos raios *laser* de alta intensidade é a utilização de um *laser* de baixa intensidade com comprimento de onda dentro do espectro da luz visível associado a um agente

fotosensitizador específico, processo este conhecido por terapia antimicrobiana fotodinâmica.

O objetivo deste estudo foi o de testar estratégias diferentes para o tratamento da doença periodontal e a escolha destes tratamentos foi realizada devido aos seus diferentes mecanismos de ação sobre a microbiota e assim poderíamos esperar um efeito sinérgico. A RAR foi empregada com o intuito de reduzir fisicamente os depósitos localizados sobre as superfícies dentárias e nas bolsas periodontais, e a TAF, devido a sua natureza não invasiva, e habilidade na redução de microrganismos pela alteração na membrana celular mediada pela liberação de oxigênio singleto (OCHSNER 1997).

Para a TAF obter sucesso, é essencial a escolha de um agente fotosensitizador adequado que possibilite grande absorção de luz no comprimento de onda utilizado, além de apresentar capacidade bactericida (PFITZNER *et al.* 2004, HAMBLIN & HASAN 2004). Além disso, o fotosensitizador selecionado deve apresentar a capacidade de penetração na membrana celular de bactérias Gram-negativas. Devido à complexidade de sua membrana celular (formada por três camadas: uma interna semelhante a das células humanas, uma intermediária composta por peptidoglicanas e uma terceira mais externa formada por fosfolípidos internamente e por lipopolissacarídeos externamente), que muitas vezes pode inibir a atuação de antimicrobianos, anti-sépticos e corantes. Apenas componentes relativamente hidrofílicos e de baixo peso molecular tem habilidade de se difundir através da membrana. O fotosensitizador a base de fenotiazina utilizado neste estudo apresenta essas características, por outro lado essa resistência observada não ocorre nas bactérias Gram-positivas pela grande permeabilidade oferecida por sua parede celular (JORI *et al.* 2006).

Diferentes agentes fotosensitizantes podem ser associados ao *laser*, mas cada um apresenta aplicações diferentes, dependendo da absorção e do comprimento de onda. A maioria dos fotosensitizadores encontrados na literatura são os derivados da hematoporfirina (620-650nm), os derivados da fenotiazina, como o azul de toluidina e azul de metileno (620-700nm), agentes fitoterápicos (550-700nm) e ftalocianinas (660-700nm) (MINNOCK *et al.* 1996, SIGUSCH *et al.* 2005, MEISEL & KOCHER 2005). Estudos utilizando diferentes desenhos experimentais

demonstraram a eficácia da TAF associada a fotosensibilizadores derivados da fenotiazina na redução de patógenos periodontais (WILSON *et al.* 1993, MINNOCK *et al.* 1996, BHATTI *et al.* 1997, CHAN & LAI 2003, KÖMERIK *et al.* 2003, PFITZNER *et al.* 2004, WILSON 2004).

O efeito do procedimento de raspagem e alisamento radicular sobre a microbiota subgengival tem sido investigado e descrito na literatura (MOUSQUE`S *et al.* 1980, HAFFAJEE *et al.* 1997, PETERSILKA *et al.* 2002, UMEDA *et al.* 2004). Existe um consenso que este procedimento além de melhorar as condições clínicas, reduz a carga bacteriana e leva ao estabelecimento de uma microbiota subgengival mais compatível com os níveis encontrados em sítios periodontalmente saudáveis. Em relação à carga bacteriana total nossos resultados demonstraram uma considerável redução nos valores para os tratamentos testados. Nas amostras de tecido periodontal removidas antes da realização dos tratamentos (*baseline*), os valores encontrados foram de $9,4 \pm 1,4$ (TFA), $10,9 \pm 1,9$ (RAR) e $10,7 \pm 2,1$ (RAR + TFA), após uma semana houve uma grande redução nos valores, sendo mais evidente para a associação RAR + TFA ($1,7 \pm 0,4$), quando comparado a RAR ($2,4 \pm 0,5$) e a TFA ($3,3 \pm 0,6$). Já nos tempos experimentais de três e quatro semanas os tratamentos levaram a uma redução similar na carga bacteriana não sendo observada diferença estatisticamente significativa. Estes resultados podem indicar que após a terceira semana ocorreu uma estabilização na carga bacteriana presente e esta manteve-se estável até o final do estudo. Estes resultados foram confirmados pelos dados obtidos através da análise microbiológica do *pool* bacteriano onde o mesmo padrão de redução foi observado (figura 24).

Entretanto, existem informações conflitantes relacionadas à capacidade do procedimento de raspagem e alisamento radicular erradicar ou suprimir importantes periodontopatógenos, especialmente o *A. actinomycetemcomitans*, o qual foi identificado em bolsas periodontais após a realização da terapia periodontal não-cirúrgica (TAKAMATSUO *et al.* 1999). Nossos resultados corroboram este achado em relação à RAR, por outro lado, a TAF se mostrou mais efetiva em reduzir, entre outras espécies a contagem média de *A. actinomycetemcomitans*, este resultado pode estar relacionado à habilidade do fotosensibilizador em penetrar a barreira epitelial e o tecido conjuntivo (BHATTI *et al.* 1997) assim como é característica peculiar desse microrganismo.

De acordo com nossos resultados, os tratamentos realizados aparentam atuar sobre diferentes espécies bacterianas e muito embora os resultados indiquem uma redução bacteriana considerável, estes níveis podem não ser suficientes para afirmar que se obteve uma estabilidade periodontal, devido à elevada contagem média de microrganismos pertencentes ao “complexo vermelho”, responsáveis em grande parte pela etiologia da doença periodontal (HAFFAJEE & SOCRANSKY 1994), observada após quatro semanas especialmente para os sítios tratados pela TAF. Pode-se especular que neste período de observação o microambiente subgingival ainda não tenha se restabelecido completamente.

A recolonização bacteriana no microambiente subgingival ocorre mesmo após os procedimentos de raspagem e alisamento radicular e esta condição sugere que a realização da terapia periodontal de suporte deve ser conduzida com o intuito de prevenir um retorno ao nível pré-tratamento dos patógenos periodontais (MOUSQUE`S *et al.* 1980). De acordo com os resultados obtidos observamos uma possível recolonização de *P. gingivalis* e *T. denticola*, para todas as modalidades testadas, sendo mais pronunciada para TAF (*P. gingivalis*) e RAR + TAF (*T. denticola*). A terapia antimicrobiana fotodinâmica pode vir a ser empregada nos casos de terapia periodontal de suporte, pois além de atuar sobre o biofilme microbiano não há necessidade de remoção adicional de tecido dentário pela re-instrumentação, com isso o paciente pode relatar uma menor hipersensibilidade dentinária.

Uma grande variedade de espécies bacterianas relacionadas ao estabelecimento da doença periodontal foram reduzidas pela TAF (KÖMERIK *et al.* 2003, MATEVSKI *et al.* 2003), contudo, estudos prévios tiveram seu foco voltado para o efeito bactericida da TAF em culturas isoladas de microrganismos (WILSON *et al.* 1995, CHAN & LAI 2003, ZANIN *et al.* 2005), o que difere muito da situação encontrada na cavidade oral, onde inúmeras espécies bacterianas formam um complexo ecossistema. Portanto, a resposta da TAF em uma comunidade bacteriana *in vivo* pode ser muito diferente daquela observada *in vitro* em muitos aspectos, como taxa de crescimento, atividade metabólica e expressão gênica (COSTERTON *et al.* 1999, PASTER *et al.* 2001). Por outro lado, em estudos experimentais muitos aspectos relacionados à TAF foram elucidados, porém os animais utilizados nesses estudos apresentam taxas metabólicas maiores que a dos seres humanos, além disso, nos

estudos em animais mais parâmetros podem ser padronizados e mantidos constantes, diferentemente de um estudo clínico, portanto deve-se ter cautela em transpor resultados obtidos no modelo experimental desenvolvido em animais para os seres humanos.

Conforme mencionado anteriormente, resultados de estudos *in vitro* demonstraram que a TAF pode ser efetiva na redução bacteriana (SARKAR & WILSON 1993, BHATTI *et al.* 1997, HASS *et al.* 1997, KÖMERIK *et al.* 2000, USACHEVA *et al.* 2001, KÖMERIK *et al.* 2001, NUSSBAUM *et al.* 2002), porém apenas alguns estudos demonstraram que os periodontopatógenos podem ser efetivamente suprimidos através da TAF (HASS *et al.* 2000, KÖMERIK *et al.* 2002, SHIBLI *et al.* 2003, HAYEK *et al.* 2005). Em um estudo recente (QYN *et al.* 2008), no qual foi realizado tratamento da doença periodontal em ratos, utilizando um fotosensibilizador a base de azul de toluidina associado a um *laser* de diodo com comprimento de onda de 635nm, demonstrou que a TAF comparada a RAR pode causar uma redução significativa de bactérias periodontopatogênicas além de eliminar sinais clínicos de inflamação. Ainda, estudos clínicos controlados desenvolvidos recentemente em humanos demonstraram os efeitos benéficos da TAF no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal, esses estudos evidenciaram que a TAF aplicada isoladamente se equivale ao procedimento de RAR na redução dos parâmetros clínicos avaliados (ANDERSEN *et al.* 2007, de OLIVEIRA *et al.* 2007).

Além do perfil microbiano, o padrão da expressão de citocinas pode ser considerado de extrema valia quando se estuda os processos relacionados à destruição periodontal (GRAVES 2008). Segundo o modelo atual utilizado para descrever a etiopatogenia da doença periodontal, sabe-se que os produtos bacterianos estimulam células epiteliais, endoteliais e fibroblastos a secretar quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que por sua vez ativam a infiltração leucocitária para os tecidos periodontais (SILVA *et al.* 2007). Dando seqüência a esse processo os monócitos e os macrófagos são recrutados e passam a secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias e imuno-regulatórias (GRAVES 2008). A presença de bactérias como *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *A. actinomycetemcomitans* estão associadas com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TROMBONE *et al.* 2009, FERREIRA *et al.* 2008), classicamente

conexas ao recrutamento e ativação de monócitos, linfócitos T e destruição periodontal (GRAVES 2008). De fato, as citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6 estão associadas à destruição periodontal e podem atuar como reguladores da expressão de MMPs e RANKL (GARLET *et al.* 2007, GRAVES 2008). Enquanto o RANKL pode ser considerado o principal fator envolvido na ativação e diferenciação de osteoclastos, as enzimas proteolíticas como a MMP-1, uma potente collagenase, desempenha um papel crítico na degradação do tecido conjuntivo durante a formação de bolsas periodontais (REPECKE *et al.* 2009).

Uma das principais citocinas envolvidas na patogênese da doença periodontal é o TNF- α , a qual se encontra presente em elevados níveis no fluido crevicular gengival e em tecidos periodontais de sítios doentes. O início de um processo inflamatório através da produção do fator de necrose tumoral pode estimular a produção de mediadores secundários incluindo quimiocinas responsáveis em parte, pela amplificação do processo inflamatório (JIANG *et al.* 1999). Estudos utilizando o modelo experimental de doença periodontal em ratos e primatas demonstraram o importante papel do TNF- α relacionado à reabsorção óssea e destruição do tecido conjuntivo (GRAVES *et al.* 1998, GRAVES & COCHRAN 2003). Nossos resultados confirmam o papel destrutivo atribuído ao TNF- α pela intensa expressão gênica encontrada nos tecidos periodontais removidos previamente a realização dos tratamentos. Após a realização das terapias a intensidade de expressão do TNF- α foi gradualmente sendo reduzida durante o período experimental, independente do tratamento realizado. Semelhante ao papel do TNF- α , a IL-6 também possui habilidade para induzir reabsorção óssea além de desempenhar função regulatória nas doenças periodontais (ISHIMI *et al.* 1990, OKADA *et al.* 1998, BAKER *et al.* 1999, KIRKWOOD & ROSSA Jr. 2009). Similarmente ao ocorrido com o TNF- α , nossos dados demonstraram forte intensidade de expressão gênica para a IL-6 previamente aos tratamentos e no decorrer do período de observação sua intensidade foi gradativamente sendo reduzida. Nossos resultados estão de acordo com os dados publicados em estudos que demonstraram elevados níveis de IL-6 presentes no fluido crevicular gengival de bolsas periodontais comparados aos sítios controle (GEIVELIS *et al.* 1993, GUILLOT *et al.* 1995, LIN *et al.* 2005).

O aumento na expressão gênica de MMPs em tecidos afetados pela doença periodontal parece ser um consenso na literatura e pode estar correlacionado a

destruição de tecidos gengivais e até mesmo destruição óssea os quais correspondem aos sinais clínicos da doença periodontal (BIRKEDAL-HANSEN 1993, AIBA *et al.* 1996, INGMAN *et al.* 1996, RAMAMURTHY *et al.* 2002). Por outro lado, estudos em animais demonstraram que a inibição de MMPs resulta em uma doença periodontal menos severa (RAMAMURTHY *et al.* 2002). Somado a destruição da matriz extracelular pelas MMPs a reabsorção do osso alveolar conduzida pelos osteoclastos é outro evento chave na patogênese da doença periodontal. Tendo em vista esta observação, nós examinamos a expressão de fatores osteoclastogênicos como o RANKL e seu inibidor, OPG. A expressão de RANKL foi mais evidente que a de OPG nas amostras de tecido removidas anteriormente a realização dos tratamentos, após uma semana a expressão de OPG permaneceu elevada, enquanto a expressão de RANKL foi reduzida consideravelmente, nos períodos da terceira e quarta semanas o equilíbrio RANKL/OPG foi atingido. Como o RANKL está intimamente associado à reabsorção óssea (TEITELBAUM 2000, GARLET *et al.* 2004, MENEZES *et al.* 2008) e a OPG associada a redução da reabsorção óssea (TENG *et al.* 2000), os nossos resultados sugerem que a elevada expressão de OPG encontrada nos tecidos removidos após uma semana da realização dos tratamentos, pode em parte, controlar a reabsorção óssea conduzida pelo RANKL, atenuando a progressão da doença periodontal.

O prognóstico da doença periodontal pode ser determinado por níveis relativos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, demonstrando assim um padrão misto de resposta imune estabelecido na doença periodontal (UKAI *et al.* 2001, TENG 2002, GARLET *et al.* 2003), sugerindo que o equilíbrio gerado pela resposta do hospedeiro pode vir a controlar a infecção reduzindo assim os danos aos tecidos (TAUBMAN & KAWAI 2001, GARLET *et al.* 2003). De acordo com esta possibilidade, nossos resultados mostraram uma concomitante expressão de TNF- α e IL-10 nas amostras de tecido removidas anteriormente aos tratamentos e muito embora, a expressão de MMP-1 e RANKL podem indicar a progressão da doença, o aumento na intensidade de expressão da OPG, possivelmente induzida pela IL-10, pode ser responsável em parte pelo controle da destruição tecidual.

As citocinas avaliadas neste estudo são componentes integrais da resposta do hospedeiro frente à infecção periodontal e essas moléculas são importantes mediadores fisiológicos no microambiente periodontal, atuando na saúde e em

processos patogênicos. O objetivo terapêutico do tratamento periodontal pode ser alcançado pela manutenção do equilíbrio fisiológico da rede de citocinas e a TAF pode influenciar de maneira positiva esta estabilização devido ao seu potencial na redução de fatores de virulência como as proteases e os lipopolisacarídeos ainda nas fases iniciais da cascata imunológica (KÖMERIK *et al.* 2000).

No presente estudo a TFA apresentou um efeito terapêutico similar ao obtido pelo procedimento de RAR nos parâmetros bioquímicos avaliados. Numericamente, os resultados foram um pouco superiores para a associação das terapias, entretanto não foi observada significância estatística. Talvez o protocolo estabelecido para o tratamento das formas crônicas de doença periodontal já esteja estabelecido e embasado pela literatura, porém em determinadas situações clínicas é esperado que a TFA apresente superioridade em relação à terapia mecânica convencional; por exemplo, em alguns sítios específicos como as bifurcações, concavidades e invaginações profundas onde a instrumentação adequada se torna limitada pela dificuldade de acesso a estas regiões (WASSERMAN & HIRSCHFELD 1998). Por outro lado a TFA não parece ser afetada por essa limitação devido à natureza de sua aplicação baseada na ação de um fotosensibilizador e luz para irradiação, portanto sendo capaz de atingir esses sítios de difícil acesso. Considerando que a TAF não é uma terapia mecânica e devido à baixa presença de cálculo, as periodontites agressivas (de OLIVEIRA *et al.* 2007) e pacientes de manutenção periodontal podem se beneficiar da utilização da TAF (LULIC *et al.* 2009, CHONDROS *et al.* 2009). Somado a isso o tempo utilizado para a realização do tratamento é reduzido, a destruição bacteriana é atingida em poucos segundos, não havendo necessidade de anestesia e ainda elimina-se o desenvolvimento de resistência bacteriana pela natureza do procedimento.

Quando interpretamos os resultados microbiológicos obtidos com a TAF, os possíveis efeitos da aplicação do fotosensibilizador somente devem ser considerados, além disso, devemos enfatizar que existem dados limitados provenientes de estudos clínicos controlados comparando a TAF combinada com a RAR, TAF e RAR isolados ou ainda a aplicação do fotosensibilizador isolado. Além disso, a frequência de aplicações da TAF pode ser considerada na interpretação dos resultados obtidos neste estudo, pois o fabricante sugere que a terapia deva ser realizada semanalmente por quatro a seis semanas com o intuito de potencializar o efeito

antimicrobiano. Neste estudo utilizamos apenas uma aplicação para não adicionar variáveis na análise o que poderia influenciar os resultados obtidos. Futuros estudos são necessários para elucidar se múltiplas aplicações da TAF podem melhorar os resultados desta promissora alternativa terapêutica.

7. Conclusão

De acordo com as condições experimentais utilizadas neste estudo nossos dados sugerem que os tratamentos empregados promoveram redução na inflamação com efeitos similares na expressão das citocinas avaliadas e redução das espécies bacterianas monitoradas. Concluiu-se que a terapia antimicrobiana fotodinâmica tem ação antibacteriana e reduz o processo inflamatório induzido pela periodontite experimental.

8. Referências Bibliográficas

1. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:338-355.
2. Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 2001;59:154-160. Review.
3. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004;35:21-41. Review.
4. Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:237-252. Review.
5. Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:112-141. Review.
6. Page RC. Periodontal diseases: a new paradigm. *J Dent Educ* 1998;62:812-821. Review.
7. Ebersole JL, Cappelli D, Holt SC. Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? *Acta Odontol Scand* 2001;59:161-1666. Review.
8. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002;28:12-55.
9. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 2003;7:181-188.
10. Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, Heiss G, Pankow JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. *J Dent Res* 2000;79:49-57.
11. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001;72:1221-1227.
12. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 2004;83:156-160.
13. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect* 2000;2:1181-1192. Review.
14. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401. Review.
15. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250. Review.

16. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;1:115:3719-3727. Review.
17. Tervahartiala T, Pirilä E, Ceponis A, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 2000;79:1969-1977.
18. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol* 2003;74:188-195.
19. César Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H Jr, Sallum EA, Nociti FH Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol* 2004;75:995-1000.
20. Kinane DF, Darby IB, Said S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontol Res* 2003;38:400-404.
21. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:12-37. Review.
22. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;1;289:1504-1508. Review.
23. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002;30:340-346. Review.
24. Teng YT, Nguyen H, Gao X, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:59-67.
25. Crotti TN, Ahern MJ, Lange K, et al. Variability of RANKL and osteoprotegerin staining in synovial tissue from patients with active rheumatoid arthritis: quantification using color video image analysis. *J Rheumatol* 2003;30:2319-2324.
26. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31:671-679.
27. Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-gamma and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol* 2001;46:901-908.
28. Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun* 2002;70:5269-5273.

29. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2003;38:210-217.
30. Offenbacher S, Odle BM, Braswell LD, et al. Changes in cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in *Macaca mulatta*. *J Periodontal Res* 1989;24:63-74.
31. Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6:109-118. Review.
32. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118:503-508. Review.
33. Graves DT, Chen CP, Douville C, Jiang Y. Interleukin-1 receptor signaling rather than that of tumor necrosis factor is critical in protecting the host from the severe consequences of a polymicrobe anaerobic infection. *Infect Immun* 2000;68:4746-4751.
34. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:403-409.
35. Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol* 1998;69:1419-1425.
36. Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves DT. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001;28:233-240.
37. Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, et al. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res* 2001;80:1875-1879.
38. Jankovic D, Sher A, Yap G. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Opin Immunol* 2001;13:403-409. Review.
39. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23, 144-150.
40. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand* 2001;59:167-173. Review.
41. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:125-135. Review.
42. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. 4-year observations of basic periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1987;14:438-444.

43. Greenstein G. Non-surgical periodontal therapy in 2000. A literature review. *J Am Dent Assoc* 2000;131:1580-1592.
44. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, et al. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-452.
45. Bollen CM, Quirynen M. Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol* 1996;67:1143-1158.
46. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit of chronic infection: Diagnosis and treatment. *Clin Microb Rev* 2001;14:727-752.
47. Sigusch B, Beier M, Klinger G, Pfister W, Glockmann E. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progression periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:275-283.
48. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontol Res* 2002;37:389-398.
49. Nichols WW, Evans MJ, Slack MPE, Walmsley HL. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1989;135:1291-1303.
50. Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemoth* 1990;26:1-6.
51. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol* 2001;28:597-609.
52. Pallasch TJ. Antibiotic resistance. *Dent Clin North Am* 2003;47:623-639.
53. Greenstein G. Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: A review. *J Periodontol* 1992;63:118-130.
54. 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.
55. Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990;17:345-350.
56. Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999;70:574-580.
57. Petersilka GJ, Ehmke B, Flemming TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 2002; 28:56-71.

58. Fujise O, Miura M, Hamachi T, Maeda K. Risk of *Porphyromonas gingivalis* recolonization during the early period of periodontal maintenance in initially severe periodontitis sites. *J Periodontol* 2006;77:1333-1339.
59. 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.
60. Von Tappeiner HJA. On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes (in German). *Deutsch Arch Klin Medizin* 1904;39:427-487.
61. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* 2009;17;96:1-8.
62. Sasnauskiene A, Kadziauskas J, Vezelyte N, Jonusiene V, Kirveliene V. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis* 2009;14:276-286
63. Lu Y, Jiao R, Chen X, Zhong J, Ji J, Shen P. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa cell. *J Cell Biochem* 2008;15;105:1451-1460.
64. Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol* 1986;43:691-699. Review.
65. 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. Review.
66. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992;25:77-81.
67. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28. Review.
68. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72:676-680.
69. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999;4:507-517.
70. Profio AE, Doiron DR. Transport of light in tissue in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1987;46:591-599.
71. Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci* 2002;17:86-92.

72. 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 Periodontol Res*. 2008;43:162-167.
73. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008;79:2156-2165.
74. Laws ER, Wharen RE, Anderson RE. Photodynamic therapy of brain tumors. In: *Photodynamic therapy of tumors and other diseases*. G. Jori, C.A Perria (eds). p. 311-316, Padova: Edizione Libreria Progetto, 1995.
75. Bedwell J, Holton J, Vaira D, MacRobert AJ, Bown SG. In vitro killing of *Helicobacter pylori* with photodynamic therapy. *Lancet*. 1990;335:1287.
76. Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Ann Periodontol* 1998;3:288-302. Review.
77. Kortegaard HE, Eriksen T, Baelum V. Periodontal disease in research beagle dogs - an epidemiological study. *J Small Anim Pract* 2008;49:610-616.
78. Shibutani T, Murahashi Y, Tsukada E, Iwayama Y, Heersche JN. Experimentally induced periodontitis in beagle dogs causes rapid increases in osteoclastic resorption of alveolar bone. *J Periodontol* 1997;68:385-391.
79. Schliephake H, Kracht D. Vertical ridge augmentation using polylactic membranes in conjunction with immediate implants in periodontally compromised extraction sites: an experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:325-334.
80. Trombone AP, Cardoso CR, Repeke CE, et al. Tumor necrosis factor- α -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor- α in diseased periodontal tissues. *J Periodontol Res* 2009;44:598-608.
81. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-792.
82. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132:6-13.
83. Tanner A. Microbial etiology of periodontal diseases. Where are we? Where are we going? *Curr Opin Dent* 1992;2:12-24. Review.
84. Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ^{32}P -based hybridizations. *Anal Biochem* 1993;1;210:235-244.
85. Berkstein S, Reiff RL, McKinney JF, Killoy WJ. Supragingival root surface removal during maintenance procedures utilizing an air-powder abrasive system or hand scaling. An in vitro study. *J Periodontol* 1987;58:327-330.

86. Killoy WJ. Chemical treatment of periodontitis: local delivery of antimicrobials. *Int Dent J* 1998;48:305-315. Review.
87. Wasserman B, Hirschfeld I. The relationship of initial clinical parameters to the long-term response in 112 cases of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998;15:38-42.
88. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* 1990;17:479-493.
89. Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000* 1996;10:79-88.
90. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:722-732.
91. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005;13;79:159-170. Review.
92. Tucker D, Cobb CM, Rapley JW, Killoy WJ. Morphologic changes following in vitro CO₂ laser treatment of calculus laden root surfaces. *Lasers Surg Med* 1996;18:150-156.
93. Romanos GE. Clinical applications of the Nd:YAG laser in oral soft tissue surgery and periodontology. *J Clin Laser Med Surg* 1994;12:103-108.
94. Israel M, Cobb CM, Rossmann JA, Spencer P. The effects of CO₂, Nd:YAG and Er:YAG lasers with and without surface coolant on tooth root surfaces. An in vitro study. *J Clin Periodontol* 1997;24:595-602.
95. Aoki A, Ando Y, Watanabe H, Ishikawa I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an erbium:YAG laser. *J Periodontol* 1994;65:1097-1106.
96. Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium:YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med* 1996;19:190-200.
97. Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15:33-37.
98. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1997;39:1-18.
99. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343-1349.
100. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-450.
101. Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: State of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006;25:505-519.

102. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic watersoluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol Biol B* 1996;32:159–164.

103. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamictherapy oninflammatorysigns and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76:1100-1105.

104. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:182–187.

105. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol* 1997;65:1026-1031.

106. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-55.

107. Kömerik 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.

108. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:412-418.

109. Mousque`s T, Listgarten M, Phillips R. Effect of scaling and root planning on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Periodontal Res* 1980;15:144-151.

110. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent R L, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:324-334.

111. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of non-surgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* 2004; 36:98-120.

112. Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999;70:574-580.

113. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111. Review.

114. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res* 2003;38:428-435.

115. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol* 1995;78:569-574.
116. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:324-330.
117. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–1322.
118. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-3783.
119. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 1993;28:204–210.
120. Haas R, Dörtbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:249-254.
121. Usacheva M, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29:165-173.
122. Nussbaum E, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630, 660, 810 and 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:325-333.
123. Haas R, Baron M, Dortbudak O, Watzek G. Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: Preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15:374-382.
124. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced periimplantitis: A preliminary study in dogs. *J Oral Sci* 2003;45:17-23.
125. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* 2005;76:1275-1281.
126. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007;18:34-38.
127. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;79(8 Suppl):1585-1591. Review.
128. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86:306-319. Review.
129. Ferreira SB Jr, Trombone AP, Repeke CE, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex

periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1 β in diseased periodontal tissues. *Infect Immun* 2008;76:3725-3734.

130. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 2007;147:128-138.

131. Repeke CE, Trombone AP, Ferreira SB Jr, et al. Strong and persistent microbial and inflammatory stimuli overcome the genetic predisposition to higher matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression: a mechanistic explanation for the lack of association of MMP1-1607 single-nucleotide polymorphism genotypes with MMP-1 expression in chronic periodontitis lesions. *J Clin Periodontol* 2009;36:726-738.

132. Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun* 1999;67:2125-2130.

133. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145:3297-3303.

138. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:248-266. Review.

134. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999;67:2804-2809.

135. Kirkwood KL, Rossa C Jr. The potential of p38 MAPK inhibitors to modulate periodontal infections. *Curr Drug Metab* 2009;10:55-67. Review.

136. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64:980-983.

137. Guillot JL, Pollock SM, Johnson RB. Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *J Periodontol* 1995;66:667-672.

138. Lin SJ, Chen YL, Kuo MY, Li CL, Lu HK. Measurement of gp130 cytokines oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine* 2005;30:160-167.

139. Aiba T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci* 1996;104:562-569.

140. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-1132.

141. Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol* 2002;73:726-734.

142. Menezes R, Garlet TP, Trombone AP, et al. The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod* 2008;34:1480-1484.
143. Teng YT, Nguyen H, Gao X, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:59-67.
144. Lulic M, Leiggener Görög 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.
145. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009;24:681-688.

9.2. Artigo 1: Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part I: Cytokine pattern.

Journal of Periodontology

Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part I: Cytokine pattern.

Journal:	Journal of Periodontology
Manuscript ID:	JOP-09-0585
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	20-Oct-2009
Complete List of Authors:	Novaes Jr, Arthur; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo. Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology oliveira, rafael; School of Dentistry of Ribeirao Preto, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology Garlet, Gustavo; University of São Paulo, Department of Biological Sciences; University of São Paulo, Department of Biological Sciences Taba, Mario; School of Dentistry of Ribeirao Preto, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology de Souza, Raphael; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo,, Department of Dental Materials and Prostheses Souza, Sergio; School of Dentistry of Ribeirao Preto, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology Palioto, Daniela B.; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology Grisi, Marcio; School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology
Key Words:	Experimental periodontitis, Laser(s), Gene expression

Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part I: Cytokine pattern.

Rafael R. de Oliveira, Graduate Student of Periodontology¹

Arthur B. Novaes Júnior, Chairman of Periodontology^{*}

Gustavo P. Garlet, Professor of Histology²

Mário Taba Júnior, Professor of Periodontology^{*}

Raphael Freitas de Souza, Professor of Prosthodontics³

Sérgio L. S. de Souza, Professor of Periodontology^{*}

Daniela B. Palioto, Professor of Periodontology^{*}

Márcio F.M. Grisi, Professor of Periodontology^{*}

Correspondence:

Arthur Belém Novaes Jr. (novaesjr@forp.usp.br) fax number: (+55)16-36024788

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café s/n, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

The diode laser, photosensitizer, and fiber optic applicator used in this study were donated by Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria, also this study was in part supported by FAPESP (Grant # 2005/05600774-3 and 2005/60775-0). The authors report no conflicts of interest related to this study

Short running title: aPDT and induced periodontitis: Cytokine pattern

This paper contains 5 figures and 1 table Word count: 3877

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

² Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

³ Department of Dental Materials and Prostheses, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ABSTRACT

Background: Cytokine profiles are of considerable value when studying disease course during treatment. The aim of this study was to investigate cytokine expression and total bacterial load in gingival biopsies of dogs, after treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), scaling and root planing (SRP) or scaling and root planning combined with antimicrobial photodynamic therapy (SRP+aPDT), in different times of evaluation.

Methods: Periodontal disease was induced by placing ligatures around the mandibular premolars bilaterally in 8 dogs during 8 weeks. The dogs were randomly treated with aPDT using a laser source associated with a photosensitizer, SRP with hand instruments or with the association of treatments. Gingival biopsies were removed in 0, 1, 3 and 4 weeks with two dogs for each time and the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), matrix metalloproteinase (MMP-1), interleukin (IL) 6, IL-10 and total bacterial load by analysis of 16S rRNA gene sequence through quantitative polymerase chain reaction.

Results: The results were similar for treatments and it was observed a reduction in the expression of cytokines and bacterial load through the periods of evaluation. The time factor was considered statistically significant regardless the treatment performed ($P < 0.001$) and no influence of treatments over the results was observed ($P > 0.05$). Also, a decrease in the expression of evaluated cytokines in the periods of 1 to 3 weeks was noted, in later periods no significance was observed ($P > 0.05$).

Conclusions: Our data suggest that SRP, aPDT and SRP+aPDT have similar effects on the expression of cytokines evaluated and total bacterial load in the treatment of ligature-induced periodontitis.

Key Words: Cytokines; periodontal diseases/therapy; photochemotherapy, photosensitizing agents, animal studies

Key findings for the table of contents: The treatments tested have similar effects on the expression of cytokines evaluated

INTRODUCTION

The current understanding of the pathogenesis of periodontal disease suggests that putative periodontopathogens trigger chronic inflammatory and immune responses that are thought to determine the clinical outcome of the disease. Periodontal disease is characterized by an intense inflammatory infiltrate associated with irreversible loss of alveolar bone and/or connective tissue attachment in the periodontium, which ultimately results in the loss of teeth. This tissue breakdown is thought to be the result of activation of host cells by inflammatory mediators, such as arachidonic acid metabolites, cytokines and enzymes. These factors in turn trigger the resorption of alveolar bone and the generation of proteases that degrade extracellular matrix (ECM), resulting in tissue destruction.¹⁻³

Among host proteases that target the ECM, matrix metalloproteinases (MMPs) play a role in both degradation and remodeling of periodontal tissues matrix proteins during different physiologic and pathological processes.⁴ MMPs comprise four major subclasses based on their substrate specificity and sequence homology: collagenases such as MMP-1 or interstitial collagenase are active against fibrillar collagen; gelatinases, also called type IV collagenases (A or MMP-2 and B or MMP-9), which present high activity against denaturated collagens; stromelysins, which degrade non-collagen components of ECM; and membrane-type MMPs.⁵

In addition to the destruction of connective tissue, alveolar bone loss is a key event in periodontal disease. The integrity of bone tissues depends on maintaining a delicate equilibrium between bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts. The major regulatory mechanism of osteoclasts activity is driven by some members of the TNF family of receptors RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) and osteoprotegerin (OPG), and the ligand RANKL.^{6,7}

It is also important to establish the factors that regulate the breakdown of homeostasis of connective and osseous tissue that takes place in periodontal disease. Inflammatory mediators, such as prostaglandins (PGE₂), IL-1 and TNF- α , and the Th1-type cytokine IFN- γ , have been described as positive regulators of osteoclastogenesis and of expression of MMPs.⁷⁻⁹ The reverse effect is exerted by the Th2-type cytokines such as IL-4, IL-6 IL-10 and IL-13.^{7,8,10} It has been suggested that, in periodontal lesions, the balance between the expression of Th1- and Th2-type cytokines and chemokines in a mixed inflammatory immune response is a relevant factor for the outcome of disease.^{3,11-14}

It's generally accepted that mechanical removal of contaminants comprises the conventional treatment for periodontitis and numerous studies reported significant improvements in clinical and microbial parameters following non-surgical periodontal therapy.¹⁵⁻¹⁸ To further enhance the effectiveness of scaling and root planing (SRP), power-driven instruments, such as sonic and ultrasonic devices, have been introduced. Studies demonstrated comparable clinical results following sonic or ultrasonic and manual instrumentation.¹⁹⁻²⁰ Despite the fact that non-surgical periodontal treatment may result in significant clinical improvements in the great majority of cases, none of the currently available instrumentation techniques are predictable in the complete elimination of subgingival bacteria and calculus.²¹⁻²³ These limitations could be attributed to several factors, such as the complex anatomy of teeth, invasion of periodontal pathogens into the surrounding soft tissues or possible recolonization of periodontal pockets from other diseased sites or intraoral niches.^{24,25}

More recently, alternatives which might offer the possibility of efficient removal of periodontal bacteria from the hard tissue surfaces with minimum damage to the systemic health are being sought. In this scenario, the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been suggested as a promising new approach for periodontal treatment. aPDT is also called photoradiation therapy, phototherapy or photochemotherapy was introduced in the medical field in 1904 as the light induced inactivation of cells, microorganisms or molecules.²⁶ aPDT involves the combination of visible light, usually through the use of diode laser and a photosensitizer. The photosensitizer is a compound capable of absorbing light of a specific wavelength and transforming into useful energy.²⁷ Each factor is harmless by itself, but when combined they can produced lethal cytotoxic agents that can selectively destroy target cells.²⁷

The action mechanism of this treatment has been described.²⁸ In brief, upon illumination, the photosensitizer is excited from the ground state to the triplet state. The longer lifetime of the triplet state enables the interaction of the excited photosensitizer with the surrounding molecules, and it is generally accepted that the generation of the cytotoxic species produced during aPDT occurs while in this state.²⁷ The cytotoxic product, generally O₂, cannot migrate >0.02μm after this formation, making it ideal for the local application of aPDT without endangering distant molecules, cells or organs.²⁸

Therefore, the aim of this study was to investigate the pattern of cytokine expression and total bacterial load in different times of evaluation from gingival biopsies of dogs, after treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), scaling and root planing (SRP) or scaling and root planing associated with antimicrobial photodynamic therapy (SRP+aPDT).

MATERIAL AND METHODS

The study protocol was reviewed and approved by the Institution's Animal Research Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo on December 5, 2005 (protocol 05.1.1038.53.9). Eight young adult male mongrel dogs (15 kg) were used. They had intact maxillae and mandibles, were in good general health and had no viral or fungal oral lesions. All procedures were performed under proper sedation and anesthesia consisting of thiopental (1 ml/kg; 20 mg/kg thiopental diluted in 50 ml saline).

Periodontal Disease Induction Phase

A full-thickness flap was raised in the region of the 4 mandibular premolars and a shallow notch was placed on the mesial and distal surfaces of each tooth with a ½ round bur to act as a retentive groove for the ligature. Doubled ligatures of 3.0 silk sutures were tied around the premolars bilaterally of each dog (figure 1). The flaps were repositioned and sutured with absorbable 4-0 sutures. The dogs were fed with a plaque-promoting diet of water-moistened dog chow. The ligatures were checked weekly and missing ligatures were replaced immediately. The experimental periodontitis was induced for 8 weeks and confirmed by clinical and radiographic examination (figures 2 and 3).

Non-Surgical Treatments

At the beginning of the treatment phase the 6 teeth (3 of each side) were randomly divided into 3 treatment groups with 2 dogs for each experimental time of 0 (before treatment), 1, 3 and 4 weeks for the removal of gingival biopsies.

The mechanical subgingival instrumentation (SRP group) was performed using hand instruments (Gracey curettes⁴ No. 3/4, 5/6, 7/8, 11/12 and 13/14). For the aPDT group, a diode laser⁵ was selected with a wavelength of 660nm and a maximum power of 60mW/cm² was employed together with a phenothiazine photosensitizer⁶ in a concentration of 10mg/ml. The photosensitizer was applied (figure 4) by placing the applicator at the bottom of the periodontal pocket and was continuously deposited in a coronal direction for 1

⁴ Hu-Friedy, Chicago, IL.

⁵ Helbo Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria.

⁶ Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems.

minute, followed by copious irrigation with distilled water in order to remove any excess. In sequence, the pocket was exposed to the laser light using the fiber optic applicator⁷ (figure), with a diameter of 0.6mm for 10 seconds. The treatment was done in 6 sites per tooth. For the SRP+aPDT group the subgingival instrumentation was performed and after, the same protocol for the aPDT group was employed.

Gingival Biopsies

Biopsies of gingival tissue measuring approximately 3mm x 5mm (comprising junctional epithelium, gingival crevicular epithelium, and connective gingival tissue) were obtained from the middle buccal site of each tooth, after, the wound was sutured with absorbable 5-0 sutures. The samples were then divided in half in the cervico-apical direction, and a fragment was transferred to a microtube containing Trizol⁸ and stored at -70° C for analysis of cytokines expression. The remaining fragment was transferred to a microtube containing milli-Q water and stored at -70° C for subsequent analysis of bacterial load in periodontal tissues.

Real-Time PCR reactions – mRNA analysis and bacterial quantification through 16S rRNA gene expression

The extraction of total RNA from periodontal tissues samples and the cDNA synthesis were accomplished as previously described.¹⁴ RealTime-PCR mRNA analysis were performed in a MiniOpticon system⁹, using specific TaqMan primers and probes¹⁰ (Table 1), and 2.5ng of cDNA in each reaction. Negative controls without cDNA and without the primer/probe sets were also performed. Calculations for determining the relative levels of gene expression were made from duplicate measurements of the target gene, with normalization to β -actin in the sample, using the cycle threshold (Ct) method and the $2^{-\Delta Ct}$ equation, as previously described.³⁰

In order to allow the quantification of total bacterial load the bacterial DNAs were extracted from periodontal tissue samples by DNA Purification System¹¹. RealTime-PCR DNA analyses were performed in a MiniOpticon system¹² using specific primers and probes, (Table 1), and 5ng of DNA in each reaction. The positivity to bacteria detection in each

⁷ Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems.

⁸ Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA.

⁹ Bio-Rad, Hercules, CA.

¹⁰ Applied Biosystems, Foster City, CA.

¹¹ Promega Madison, WI.

¹² Bio-Rad, Hercules, CA.

sample was determined based on the comparison with positive and negative controls, similar to previously described³¹ and the values obtained with the Ct were subsequently normalized by tissue weight. The sensibility range of bacteria detection of RealTime-PCR assay was of 10^1 bacteria.

Statistical Analysis

In this study, seven variables and two factors of variation (treatment and time) were studied. Through descriptive analysis mean and standard deviations for each variable depending on factors were presented. This analysis was complemented by graphs containing the confidence intervals for the levels of variation of the factor "time".

The influence of treatment and time on the results, and their interaction was investigated by analysis of variance (ANOVA) mixed to two factors. Where relevant, the test of Tukey HSD was used for comparison between pairs. All tests followed a significance level of 0.05, and were performed using a software package¹³ for all calculations.

Results

Clinical Results

The induction of periodontitis with ligatures proceeded without complications and resulted in the accumulation of plaque and increases in gingival inflammation, bleeding upon probing and loss of alveolar bone through radiographic analysis. After the treatment no complication was observed, as the development of abscesses or signs of infection. During the experimental period the dogs gained weight and did not develop any sign or symptom of illness.

Quantitative analysis of cytokines mRNA expression

The complete results for the intensity of the expression of mRNA of the following cytokines TNF- α , MMP-1, IL-6, IL-10, RANKL, and OPG are presented in figure 4. The results were similar for the treatments performed and it was observed a reduction in the expression of cytokines through the periods of evaluation. The time factor was considered statistically significant regardless the treatment performed ($P < 0.001$). For the TNF- α , MMP-1, IL-6, RANKL and OPG was observed a decrease in the expression in the periods of 1 to 3 weeks. In later periods (3 to 4 weeks) no statistical significance was observed ($P > 0.05$). Additionally, there was no influence of treatments on the results ($P > 0.05$), this empirical evidence confirmed that there was no interaction between time and treatments. The IL-10 showed a

¹³ SPSS version 16.0.0, SPSS, Chicago, IL.

different pattern of reduction, no statistically significant difference was observed between the initial time and 1 week ($P > 0.05$) and between the later periods of observation (3 and 4 weeks) ($P > 0.05$), evaluated by HSD Tukey test.

Quantification of total bacterial load

Figure 5 shows the results for the quantification of total bacterial load regarding to time and treatments performed. Regarding to the periods of observation a progressive reduction of the total bacterial load was observed, following the same pattern of the reduction of the cytokines evaluated ($P < 0.001$) and after the period of 3 weeks a stabilization of the values occurred ($P > 0.05$), evaluated by the Tukey HSD test. There was no influence of treatments on the results ($P = 0.777$).

DISCUSSION

The present study was designed to test the applicability of aPDT as an alternative for the treatment of ligature-induced periodontitis through the evaluation of the intensity of cytokine expression and total bacterial load in gingival biopsies. The results demonstrated that non-surgical periodontal treatment with aPDT, SRP or with the association of both therapies may lead to a progressive and significant reduction in the cytokines evaluated. There was a constant reduction in the expression of cytokines analyzed at the different time points evaluated, although no statistical significant differences between the treatments were observed. In addition, the observation that the postoperative healing was uneventful throughout the study period indicates that non-surgical periodontal treatment with aPDT was well tolerated by the animals.

It has been clearly demonstrated that periodontitis is an infectious disease^{32,33} and a current model for treating periodontitis is based on the elimination of infection. Although several authors consider mechanical therapy of the root surface as a basic prerequisite for long-term treatment success²¹⁻²³, there are no specific measurable clinical criteria in the literature that define what constitutes a sufficiently root planed surface. In addition, traditional SRP (without access flaps) is often difficult and time-consuming due to intricate and unfavorable root morphology.²⁴ Given that periodontal debridement and/or SRP require a significant skill level, time, and endurance, it seems appropriate to develop a technique that address these issues while achieving clinical treatment goals and maintaining a high level of efficiency.

The effect of SRP on the subgingival microflora has been investigated as described in recent reviews.¹⁵⁻¹⁸ There is general agreement that this procedure in addition to improving clinical parameters reduces the microbial load and results in a shift towards a more health compatible microflora.³⁴ Regarding total bacterial load our results demonstrated a considerable reduction for all treatments tested, in the biopsies removed before treatments the data for aPDT was 9.4 ± 1.4 , for the SRP was 10.9 ± 1.9 and for the SRP+aPDT was 10.7 ± 2.1 , after one week a great reduction was achieved been more pronounced for the SRP+aPDT group (1.7 ± 0.4) compared to SRP (2.4 ± 0.5) and to aPDT (3.3 ± 0.6). In later periods (3 and 4 weeks) the treatments leads to a similar reduction in bacterial load and no statistical differences were observed. The results may indicate that after 3 weeks a stabilization of total bacterial load was achieved and remained stable through the end of the study. However, there are conflicting reports about the ability of SRP to completely eradicate or suppress important periodontal pathogens. *Tannerella forsythia* and especially *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* have been shown to remain in periodontal pockets after non surgical therapy.³³⁻³⁶ Bacterial recolonization or regrowth in the subgingival environment is anticipated after SRP, even shortly after treatment and it is suggested that in order to prevent a return to pretreatment levels of pathogens regularly performed supportive periodontal therapy is essential.¹⁷ This may also be the case with the use of aPDT.

Cytokine patterns are of considerable importance when studying periodontal tissue destruction.³⁷ It is known that bacterial products initially stimulate resident cells such as epithelial and endothelial cells and fibroblasts to secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines, which are thought to trigger leukocyte infiltration into periodontal tissues.³⁸ In sequence, monocytes/macrophages and distinct lymphocytes subsets are activated and secrete a series of pro-inflammatory and immune-regulatory cytokines.³⁷ The presence of invasive bacteria, such as the classic periodontopathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* have been associated with increased production of pro-inflammatory cytokines^{31,39}, classically associated to the recruitment and activation of the monocyte/T lymphocyte axis, and to tissue destruction.³⁷

One of the cytokines involved in the pathogenesis of periodontal disease is TNF- α , which is present at high levels in both gingival crevicular fluid and periodontal tissues of diseased sites. Moreover, the initiation of an inflammatory process through the production

of TNF would stimulate the production of secondary mediators including chemokines or cyclooxygenase products which, in turn, would amplify the degree of inflammation.⁴¹ Studies in rats and primates clearly demonstrated that TNF- α plays a central role in the inflammatory reaction, in the alveolar bone resorption and in the loss of connective tissue attachment in experimental periodontal diseases.^{42,43} Our results confirmed the destructive role attributed to TNF- α , the strong messages of TNF- α in periodontal tissues were observed before treatments. After treatments the intensity of expression of TNF- α was gradually being reduced over the period of observation regardless of the treatments performed, additionally, between times of 3 and 4 weeks no statistical significant difference was observed ($P > 0.05$). Similarly to TNF- α , IL-6 also present the ability to induce bone resorption, both by itself and in conjunction with other bone-resorbing agents and has been ascribed with regulatory functions in periodontal diseases.⁴⁴⁻⁴⁷ Likely with occur with TNF- α , our data demonstrates strong messages of IL-6 prior to treatments and the intensity of expression was progressively been reduced over the period of observation. Our results are in accordance with studies that demonstrated elevated IL-6 levels in gingival crevicular fluid of periodontal pockets compared with control samples.⁴⁸⁻⁵⁰

Indeed, pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6, have been associated to periodontal tissue destruction as positive regulators of MMPs and RANKL expression.^{37,40,47} While RANKL is the main factor involved in osteoclast differentiation and activation, proteolytic enzymes such as MMP-1, a potent collagenase, plays a critical role in degrading connective tissue at the site of inflammation during formation of periodontal pockets.⁹ Increased expression of MMPs in diseased periodontal tissues seems to be the consensus in the literature and is thought to account for the destruction of soft and even bone that results in some of the clinical symptoms of periodontal diseases.^{4,51,52} Indeed, in animal models the inhibition of MMPs results in less severe periodontal disease⁵³ and it is proposed as an adjuvant therapy in human disease.⁵⁴ In addition to the destruction of extracellular matrix by MMPs, the alveolar bone resorption driven by osteoclasts is another key feature of periodontal disease. In view of this, we also examined the expression of the osteoclastogenic factors RANKL and its inhibitor, OPG. The expression of RANKL was more evident than OPG in the biopsies before treatments, after 1 week the intensity of expression of OPG still elevated, meanwhile the intensity of expression of RANKL decreases dramatically, in later periods it seems that the balance of RANKL/OPG was reached. As RANKL is closely associated

with bone resorption^{6,10,30} and the blockade of RANKL by OPG leads to a reduction in the loss of alveolar bone⁵⁵, the results suggest that the higher expression of OPG found in the biopsies removed one week after the treatments, could control, at least in part, the alveolar bone loss driven by RANKL, attenuating the progression of the periodontal disease.

Conversely to the destructive pathway that involves TNF- α , regulatory pathways mediated by anti-inflammatory mediators can control or attenuate of periodontal disease development. Indeed, anti-inflammatory cytokines such as IL-10 are widely expressed in diseased periodontal tissues and are associated with lower disease severity.^{10,56} The control of inflammatory signaling can be exerted by the suppressors of cytokine signaling (SOCS), a family of intracellular proteins which downregulate the inflammatory signaling that leads to TNF- α mRNA transcription, which in turn could downregulate downstream pathways under its influence (such as RANKL and MMP-inducing pathways) and interfere with lesion progression.^{57,58} In addition, IL-10 also presents direct protective role towards tissue destruction, interfering in both MMPs and RANK systems.¹⁰ IL-10 characteristically induces the upregulation of TIMPs, which are capable of inhibiting almost every member of the MMP family in a non-specific way. In addition, IL-10 stimulates the production of OPG, which consequently inhibits bone resorption by preventing RANK-RANKL engagement.^{59,60} Concurring, IL-10 modulates the levels of both TIMPs and OPG *in vitro* and *in vivo*.⁶¹⁻⁶⁴

Therefore, periodontal disease outcome can be determined by the relative levels of pro and anti-inflammatory cytokines, and indeed, mixed patterns of immune response is shown to take place in periodontal disease¹²⁻¹⁴, suggesting that the balance of host responses could account for the control of infection with minimal damage to host tissues.^{11,14} In agreement with this possibility, we showed concomitant expression of TNF- α and IL-10 in samples of diseased tissues obtained before treatments. Therefore, the expression of MMP-1 and RANKL may result in tissue destruction and disease progression, while increased expression of OPG, possibly induced by IL-10, could be responsible, at least in part, for the control of the tissue destruction.

Thus, the cytokines evaluated in this study are significant and integral components of the host response to periodontal infection. Additionally, these molecules are important as physiologic mediators in the periodontal environment, serving in both normal processes and as pathogenic mediators. A therapeutic goal in clinical periodontics can be aimed at maintaining a physiological role for cytokines; this may also be the case for aPDT due to its

potential to reduce some key virulence factors, such as lipopolysaccharide and proteases⁶⁵ in the early phases of the immune cascade.

In the present study, aPDT showed a therapeutic effect, regarding the parameters evaluated, similar to that of scaling and root planning alone. Numerically the results were slightly superior for the therapies combined, however no statistical significance was observed. Perhaps, the protocol for treating chronic forms of periodontal disease is well established and leads to satisfactory results, however in aggressive periodontitis^{66,67} or in particular clinical situations, aPDT is expected to have more benefits than conventional therapy, for example, some sites, such as furcations, deep invaginations and concavities in the periodontal area, are difficult to access with hand instruments.⁶⁸ The use of aPDT, however, is not affected by this problem, as it is based on photosensitizer and light irradiation and thus it can easily irradiate those inaccessible places. Another problem with conventional therapy is the increase of bacterial resistance to antibiotics, whereas photodynamic therapy, using reactive oxygen species to kill bacteria in a short time, is highly unlikely to cause bacterial resistance, such as that to antibiotics.⁶⁹⁻⁷¹

In different experimental trials which tested the applicability of aPDT, several aspects have been highlighted⁷²⁻⁷⁵, unfortunately, the animals used in these studies shown metabolic rates that were at least more than twice of that of humans, also in animal studies more parameters can be kept constant than ever possible in a clinical trial, so a very cautious approach to the transfer the results to a human situation has to be made. However, these data can provide important information to understand the mechanisms regarding aPDT.

CONCLUSIONS

Our data suggest that SRP, aPDT and the association of both therapies have similar effects on the expression of cytokines evaluated and total bacterial load in the treatment of ligature-induced periodontitis. Therefore, more detailed, controlled clinical and biochemical research is necessary to determine the effectiveness of aPDT.

ACKNOWLEDGEMENTS

The diode laser, photosensitizer, and fiber optic applicator used in this study were donated by Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria, also this study was in part supported by FAPESP (Grant # 2005/05600774-3 and 2005/60775-0). The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Genco R. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:338–355.
2. Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 2001;59:154-160. Review.
3. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand* 2001;59:167-173. Review.
4. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993; 28:500–510.
5. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997;91:439–442.
6. Teitelbaum, SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289:1504-1508. Review.
7. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2000; 8:147–159.
8. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23:144-150.
9. Repeke CE, Trombone AP, Ferreira SB Jr, et al. Strong and persistent microbial and inflammatory stimuli overcome the genetic predisposition to higher matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression: a mechanistic explanation for the lack of association of MMP1-1607 single-nucleotide polymorphism genotypes with MMP-1 expression in chronic periodontitis lesions. *J Clin Periodontol* 2009;36:726-738.
10. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;3:671-679.
11. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:125-135.
12. Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-g and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol* 2001; 46:901–908.
13. Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*- specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction destruction in vivo. *Infect Immun* 2002;70:5269–5273.
14. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2003;38:210-217.
15. Petersilka GJ, Ehmke B, Flemming TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 2002; 28:56-71.

16. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of non-surgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* 2004; 36:98-120.
17. Mousque`s T, Listgarten M, Phillips R. Effect of scaling and root planning on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Periodontal Res* 1980;15:144-151.
18. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent R L, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:324-334.
19. Tunkel J, Heinecke A, Flemmig TF. A systematic review of efficacy of machine-driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29 Suppl 3:72-81; discussion 90-91.
20. Greenstein G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review. *J Am Dent Assoc* 2000 Nov;131:1580-1592.
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. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. 4-year observations of basic periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1987;14:438-444.
24. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, et al. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-452.
25. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol* 2008;79(8 Suppl):1592-600. Review.
26. Von Tappeiner HJA. On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes (in German). *Deutsch Arch Klin Medizin* 1904;39:427-487.
27. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999;4:507-517.
28. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. (1998). Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:889-905.
29. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991;53:549-553.
30. Menezes R, Garlet TP, Trombone AP, et al. The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod* 2008;34:1480-1484.
31. Trombone AP, Cardoso CR, Repeke CE, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-alpha in diseased periodontal tissues. *J Periodontal Res* 2009;44:598-608.

32. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984;63:412-421.
33. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.
34. Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999;70:574-580.
35. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2595-2601.
36. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343-1349.
37. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;79(8 Suppl):1585-1591. Review.
38. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86:306-319. Review.
39. Ferreira SB Jr, Trombone AP, Repeke CE, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun* 2008;76:3725-3734.
40. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 2007;147:128-138.
41. Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun* 1999;67:2125-2130.
42. Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol* 1998;69:1419-1425.
43. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003 74:391-401. Review.
44. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145:3297-3303.
45. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:248-266. Review.
46. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999;67:2804-2809.

47. Kirkwood KL, Rossa C Jr. The potential of p38 MAPK inhibitors to modulate periodontal infections. *Curr Drug Metab* 2009;10:55-67. Review.
48. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64:980-983.
49. Guillot JL, Pollock SM, Johnson RB. Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *J Periodontol* 1995;66:667-672.
50. Lin SJ, Chen YL, Kuo MY, Li CL, Lu HK. Measurement of gp130 cytokines oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine* 2005;30:160-167.
51. Aiba T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci* 1996;104:562-569.
52. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-1132.
53. Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol* 2002;73:726-734.
54. Novak MJ, Donley TG. Using host response modifiers in the treatment of periodontal disease. *Pract Proced Aesthet Dent* 2002;14:suppl 3-10.
55. Teng YT, Nguyen H, Gao X, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:59-67.
56. Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol* 2001;123:294-300.
57. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008;28:477-487. Review.
58. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W Jr, Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res* 2006;4:580-584.
59. Zhang X, Teng YT. Interleukin-10 inhibits gram-negative-microbe-specific human receptor activator of NF-kappaB ligand-positive CD4+-Th1-cell-associated alveolar bone loss in vivo. *Infect Immun* 2006;74:4927-4931.
60. Saidenberg-Kermanac'h N, Cohen-Solal M, Bessis N, De Vernejoul MC, Boissier MC. Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Joint Bone Spine* 2004;71:9-13. Review.

61. Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, et al. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol* 2008;84:1565-1573.
62. Wise GE, Yao S. Regional differences of expression of bone morphogenetic protein-2 and RANKL in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci* 2006;114:512-516.
63. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004;109:2046-2049.
64. Huang YH, Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:1386-1391.
65. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72:676-680.
66. 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.
67. 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.
68. Wasserman B, Hirschfeld I. The relationship of initial clinical parameters to the long-term response in 112 cases of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998;15:38-42.
69. 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.
70. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:412-418.
71. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28.
72. 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.
73. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008;79:2156-2165.
74. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009;36:219-228.

75. 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.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Full thickness flap raised and double ligatures tied around the mandibular premolars for induction of periodontitis.

Figure 2: Clinical aspect following 8 weeks of plaque accumulation

Figure 3: Radiographic aspect of the teeth after 8 weeks of disease induction. Note the bone loss at the furcations and proximal areas, indicating the presence of periodontal disease.

Figure 4: Quantitative expression of TNF- α , MMP-1, IL-6, IL-10, RANKL and OPG as a function of time regardless the treatment. The results are presented as mean $\pm$ SD of expression of the individual mRNAs, with normalization to β -actin, when compared with the target-internal control using the cycle threshold (Ct) method. The error bars represent the confidence intervals at 95%. Values marked with * or ⁺ do not have significant difference (HSD test of Tukey).

Figure 5: Total bacterial load bacterial as a function of time regardless the treatment. The results are presented as mean $\pm$ SD of expression of the total 16S rRNA gene expression with normalization to periodontal tissue weight, when compared with the target-internal control using the cycle threshold (Ct) method. The sensibility range of bacteria detection of RealTime-PCR assay was of 10¹ bacteria. Values marked with * do not have significant difference (HSD test of Tukey).

9.3. Artigo 2: Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part II: Microbiological results.

Journal of Periodontology

Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part II: Microbiological results.

Journal:	Journal of Periodontology
Manuscript ID:	JOP-09-0586
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	20-Oct-2009
Complete List of Authors:	<p>Novaes Jr, Arthur; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>oliveira, rafael; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Sato, Sandra; Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, Dental Materials and Prosthesis</p> <p>Taba, Mario Jr; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Souza, Sergio; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Palioto, Daniela B.; School of Dentistry of Ribeirao Preto; University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Grisi, Marcio; School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p>
Key Words:	Experimental periodontitis, Laser(s), Microbiology

Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. Part II: Microbiological results.

Rafael R. de Oliveira, Graduate Student of Periodontology¹⁴

Arthur B. Novaes Jr., Chairman of Periodontology *

Sandra Sato, Researcher¹⁵

Mário Taba Jr., Professor of Periodontology *

Sérgio L.S de Souza, Professor of Periodontology *

Daniela B. Palioto, Professor of Periodontology *

Márcio F. M. Grisi, Professor of Periodontology *

Correspondence:

Arthur Belém Novaes Jr. (novaesjr@forp.usp.br) fax number: (+55)16-36024788

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café s/n, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

The diode laser, photosensitizer, and fiber optic applicator were donated by Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria, also this study was in part supported by FAPESP (Grant # 2005/05600774-3 and 2005/60775-0). The authors report no conflicts of interest related to this study

Short running title: aPDT and induced periodontitis: Microbiological results

This paper contains 2 figures and 1 table Word count: 3446

¹⁴ Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

¹⁵ Department of Dental Material and Prostheses, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to investigate the microbiological profile in dogs, after treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), scaling and root planing (SRP) or scaling and root planing plus antimicrobial photodynamic therapy (SRP+aPDT), in different periods of evaluation.

Methods: Periodontal disease was induced by placing 3.0 silk ligatures around the mandibular pre-molars bilaterally during 8 weeks. The dogs were randomly treated with aPDT using a laser source associated with a photosensitizer, SRP with hand instruments or with the association of treatments. Subgingival plaque samples were collected and the counts of 40 subgingival species were determined using checkerboard DNA-DNA hybridization. The data were analyzed using the method of generalized estimating equations (GEE) to test the associations between treatments, evaluated parameters and experimental times ($\alpha=.05$).

Results: Levels of the majority species were reduced one week post therapy for all treatments performed, however, an increase in mean counts of *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *T. forsythia* was observed for aPDT and SRP+aPDT groups. After four weeks a regrowth of *P. gingivalis* and *T. denticola*, was observed for all treatments tested. The mean counts of *T. forsythia* remained high during the course of the study, especially for aPDT and SRP+aPDT groups, also a strikingly reduction of mean counts of *A. actinomycetemcomitans* was observed for the aPDT group.

Conclusions: Our results suggest that SRP, aPDT in a single application and SRP+aPDT affects different bacterial species in the treatment of ligature-induced periodontitis.

Key Words: Periodontal diseases/therapy; photochemotherapy, photosensitizing agents

Key findings for the table of contents: The treatments performed appear to affects different bacterial species.

INTRODUCTION

Periodontitis is an infectious oral disease that leads to the collapse of the supporting structures of the teeth. It is triggered by periodontopathic bacterial species, and tissue destruction is greatly influenced by the local host immune response.¹ It is well known that certain bacterial species are responsible for periodontal tissue breakdown and that the treatment of periodontitis is based on the suppression or elimination of these periodontal pathogens.²

Apart from the conventional mechanical non-surgical and surgical treatment methods, various adjunctive anti-infectious therapeutic possibilities are available. These include the use of different antiseptics and antimicrobials.³⁻⁷ Although these mechanical and chemical approaches normally result in significant clinical improvements, the complete removal of specific bacterial species from the tooth surface is still difficult. In part, this is due to the inherent structure of a mature biofilm which effectively protects the component bacteria from extrinsic influences, such as antimicrobials.⁸⁻¹² In addition, regarding the use of systemic antimicrobials, there is an increased concern about the development of drug resistance.¹¹

Therefore, more recently, alternatives which might offer the possibility of efficient removal of periodontal bacteria from the hard tissue surfaces with minimum damage to the systemic health are being sought. In this scenario, the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been suggested as a promising new approach for periodontal treatment. aPDT is also called photoradiation therapy, phototherapy or photochemotherapy and was introduced in the medical field in 1904 as the light induced inactivation of cells, microorganisms or molecules.¹³ aPDT involves the combination of visible light, usually through the use of diode laser and a photosensitizer. The photosensitizer is a compound capable of absorbing light of a specific wavelength and transforming into useful energy.¹⁴ Each factor is harmless by itself, but when combined they can produce lethal cytotoxic agents that can selectively destroy target cells.¹⁴

The action mechanism of this treatment has been previously described.¹⁵ Briefly, upon illumination, the photosensitizer is excited from the ground state to the triplet state. The longer lifetime of the triplet state enables the interaction of the excited photosensitizer with the surrounding molecules, and it is generally accepted that the generation of the cytotoxic species produced during aPDT occurs while in this state.¹⁴ The cytotoxic product, generally

O₂, cannot migrate >0.02µm after this formation, thus making it ideal for the local application of aPDT without endangering distant molecules, cells or organs.¹⁵

The bactericidal efficacy of aPDT against periodontal pathogens has been demonstrated in a study using a rat model and the results show that toluidine blue-mediated lethal photosensitization of *P. gingivalis* is possible in vivo and that this results in decreased bone loss.¹⁶ Sigush et al.¹⁷ demonstrated, that aPDT using a photosensitizer and a 662nm laser light source advantageous results in reducing the periodontal signs of redness and bleeding on probing in dogs..

Therefore, the aim study was to investigate the microbiological changes in dogs, after treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), scaling and root planing (SRP) or scaling and root planing plus antimicrobial photodynamic therapy (SRP+aPDT), in different periods of observation.

MATERIAL AND METHODS

The study protocol was reviewed and approved by the Institution's Animal Research Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo on December 5, 2005 (protocol 05.1.1038.53.9). Eight young adult male mongrel dogs (15 kg) were used. They had intact maxillae and mandibles, were in good general health and had no viral or fungal oral lesions. All procedures were performed under anesthesia consisting of thiopental (1 ml/kg; 20 mg/kg thiopental diluted in 50 ml saline).

Periodontal Disease Induction Phase

A total flap was raised in the region of the 4 mandibular premolars and a shallow notch was placed on the mesial and distal surfaces of each tooth with a ½ round bur to act as a retentive groove for the ligature. Doubled ligatures of 3.0 silk sutures were tied around the premolars bilaterally of each dog. The flaps were repositioned and sutured with absorbable 4-0 sutures. The dogs were fed with a plaque-promoting diet of water-moistened dog chow. The ligatures were checked weekly and missing ligatures were replaced immediately. The experimental periodontitis was induced for 8 weeks and confirmed by clinical and radiographic examination.

Non-Surgical Treatments

At the beginning of the treatment phase the 6 experimental teeth (3 of each side) were randomly divided into 3 treatment groups. The mechanical subgingival instrumentation

(SRP group) was performed using hand instruments (Gracey curettes¹⁶ No. 3/4, 5/6, 7/8, 11/12 and 13/14). For the aPDT group, a diode laser¹⁷ was selected with a wavelength of 660nm and a maximum power of 60mW/cm² was employed together with a phenothiazine photosensitizer¹⁸ in a concentration of 10mg/ml. The photosensitizer was applied placing the applicator¹⁹ 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 in order to remove any 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 6 sites per tooth. For the SRP+aPDT group the subgingival instrumentation was performed and after, the same protocol used in the aPDT group was employed. During the course of the study, the animals received weekly supragingival ultrasound prophylaxis.

Collection of plaque samples

Subgingival plaque samples were taken at 0 hour (before treatment), 1, 3 and 4 weeks post-therapy from the proximal pockets (mesial and distal) of the selected teeth. Counts of 40 subgingival species were determined in each plaque sample using the checkerboard DNA-DNA hybridization technique.^{18,19} In brief, after removal of supragingival plaque, subgingival biofilm samples were taken using individual sterile curettes from the proximal surface of each selected tooth and placed into separate microtubes containing 0.15ml Tris EDTA buffer (10mm Tris-HCl, 1mm ethylenediaminetetraacetic acid, pH 7.6). Immediately after, 0.10ml of 0.5m NaOH was added to each sample. The samples were boiled for 10 min and neutralized using 0.8ml of 5M ammonium acetate. The released DNA was then placed into the extended slots of a Minislot-30 apparatus²⁰, concentrated onto a 15x15cm positively charged nylon membrane²¹ and fixed to the membrane by baking at 120°C for 20 minutes. The membrane was placed in a Miniblotter 45²² with the lanes of DNA at 90° to the lanes of the device. Digoxigenin-labeled whole genomic DNA probes to 40 subgingival species were hybridized in individual lanes of the Miniblotter. After hybridization, the membranes were washed at high stringency and the DNA probes detected

¹⁶ Hu-Friedy, Chicago, IL.

¹⁷ Helbo Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria

¹⁸ Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems

¹⁹ Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems

²⁰ Immunetics, Cambridge, MA

²¹ Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN

²² Immunetics, Cambridge, MA

using antibody to digoxigenin conjugated with alkaline phosphatase and chemiluminescence detection and converted to absolute counts by comparison with the regression line determined from data from the standards on the same membrane. Failure to detect a signal was recorded as zero. A total of 384 subgingival samples were evaluated for the 8 dogs. The 40 reference strains employed for the development of DNA probes are presented in Table 1. Two lanes in each run contained standards at concentrations of 10^5 and 10^6 cells of each species. The sensitivity of the assay was adjusted to permit detection of 10^4 cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe.

Statistical Analysis

In this study, 41 variables (40 bacterial species and pool of bacteria) and two factors of variation (treatment and time) were studied. Through descriptive analysis mean and standard deviations for each variable depending on factors were presented.

The influence of treatment and time on the results was investigated by analysis using the method of generalized estimating equations (GEE). GEE was employed in place of traditional ANOVA due to the lack of independence among the sites within each animal's mouth. Also GEE method it is proper to the analysis of longitudinal data. All analyses were performed at a 0.05 level of significance. A software package²³ was used for all calculations.

Results

The induction of periodontitis with ligatures proceeded without complications and resulted in the accumulation of plaque and increase in gingival inflammation, bleeding upon probing and loss of alveolar bone through radiographic analysis. After the treatment no complications were observed such as the development of abscesses or signs of acute infection. During the study the dogs gained weight and did not develop any sign or symptom of illnesses. The complete results are presented in table 1 and figure 1 and they can be summarized in the following:

Comparison among treatments:

Significant differences ($p < 0.05$) among the treatments SRP, aPDT and SRP+aPDT were found in 25 of the 40 bacterial species. *A. gerencseriae*, *A. odontolyticus*, *S. gordonii*, *C. sputigena*, *T. forsythia*, *T. socranskii* ($p < 0.05$); *A. israelii*, *A. naeslundii* 1, *P. intermedia*, *T. denticola*, *E. saburreum* ($p < 0.01$); *A. naeslundii* 2, *V. parvula*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *C. showae*, *E.*

²³ SPSS version 16.0.0, SPSS, Chicago, IL

nodatum, *F. nuc. ss polymorphum*, *F. periodonticum*, *P. micros*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*, *P. gingivalis*, *G. morbillorum*, *S. anginosus* ($p < 0.001$).

Comparison among collection intervals:

Among time points (baseline, +1 week, +3 weeks and +4 weeks), significant differences were found in 37 of 40 bacterial species. *C. gracilis* ($p < 0.05$); *L. buccalis*, *N. mucosa* ($p < 0.01$); *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* 1, *A. naeslundii* 2, *A. odontolyticus*, *V. parvula*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nuc. ss nucleatum*, *F. nuc. ss polymorphum*, *F. nuc. ss vincentii*, *F. periodonticum*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *E. saburreum*, *G. morbillorum*, *P. acnes*, *P. melaninogenica*, *S. anginosus*, *S. noxia*, *T. socranskii* ($p < 0.001$).

All 40 bacterial species evaluated were detected at the baseline in different levels as shown in Table 1. Levels of the majority species were reduced one week post therapy for all treatments performed, however, an increase in mean counts of *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *T. forsythia* was observed in this period of observation for aPDT and SRP+aPDT groups. The period from one to three weeks was characterized by an oscillation in the mean counts of bacterial species analyzed, notably, the *Actinomyces* and the members of the “purple” and “yellow” complexes remained at low levels during this time period. After four weeks the mean counts of the majority bacterial species remained low, additionally a reduction in mean counts of *P. intermedia* and *P. nigrescens* was observed when compared with the values found after one week post therapy. In particular, after four weeks a recolonization or regrowth of *P. gingivalis* and *T. denticola*, was observed for all modalities of treatments tested, however more pronounced for the aPDT group (*P. gingivalis*) and for the SRP+aPDT group (*T. denticola*). The mean counts of *T. forsythia* remained high during the course of the study, especially for the aPDT and the SRP+aPDT groups. In addition, a marked reduction of mean counts of *A. actinomycetemcomitans* was observed for the aPDT group.

When the pool of bacteria analysis was performed (figure 2), no statistical significant difference among the treatments was observed, however, regarding the time periods, a statistical significance difference was noted when comparing baseline values with the values of one week and with the values of four weeks. For the other pairs of comparisons made no statistical significant differences were found.

DISCUSSION

The present study is the second part of a research project to evaluate the effect of aPDT on ligature-induced periodontitis and was designed to investigate the microbiological change that occurs in the subgingival microbiota of dogs which were treated with SRP, aPDT or the combination of treatments. To investigate the *in vivo* bactericidal effect of aPDT on the whole bacterial flora, we established a periodontal disease model in dogs caused by a more natural infection rather than by a single specific species of bacteria, and carried out treatment under *in vivo* conditions, simulating clinical situations as closely as possible.

The results of this study showed that all modalities of treatment tested may lead to statistically significant improvements in different bacterial species when comparing experimental time intervals, additionally the observation that the postoperative healing occurred without complications throughout the development of the study, may indicate that non-surgical periodontal treatment with aPDT was well tolerated by the animals.

It has been noticeably demonstrated that periodontitis is an infectious disease^{20,21} and a current concept for treating periodontitis is based on elimination or suppression of the infection. A wide range of bacterial species that could cause periodontal disease have been reported to be reduced by aPDT.^{16,22} However, most previous studies focused on the bactericidal effects of aPDT on pure cultures of bacteria.^{16,22-26} In fact, in the human oral cavity, there are hundreds of bacterial species, which comprise a complex ecosystem. Thus, the response to aPDT of an entire *in vivo* bacterial community may differ greatly from that of their *in vitro* cultured isolates in many aspects, such as growth rate, metabolic activity and gene expression.^{27,28} However, in different experimental trials which tested the applicability of aPDT, several aspects have been highlighted^{17,29-31}, unfortunately, the animals used in these studies shown metabolic rates that were at least more than twice that of humans, also in animal studies more parameters can be kept standardized differently than ever possible in a clinical trial, so a very cautious approach to the transfer of the results to a human situation has to be made.

aPDT consists of the association of a photosensitizer agent and a light source, with the objective of inducing microbial death or even reducing its virulence. Although aPDT is more widely known for its application in the treatments of tumors³², however there is also an interest in its antimicrobial possibilities, as a large number of microorganisms (including oral species) have been reported to be reduced *in vitro* by this approach.³³⁻³⁵ Furthermore, the

potential of some key virulence factors such as lipopolysaccharide and proteases have been shown to be reduced by photosensitization.³⁶

For aPDT to be successful, it is essential to select an effective non-toxic photosensitizer, capable of high absorption in the light length used and to have great bactericidal effectiveness.^{37,38} The photosensitizer must also have the capacity to penetrate the membranes of the bacterial cells; however, penetration of Gram-negative bacteria is difficult, due to the complexity of their outer membrane, which contains lipoproteins and lipopolysaccharides. These charges are part of a complex system that inhibits antibiotics, disinfectants and dyes. It is known that only relatively hydrophilic compounds with low molecular weight succeed in diffusing through this membrane, and phenothiazine was the chosen dye in our research, for its penetration capacity in the membrane, because it is cationic, hydrophilic and has a low molecular weight, that easily passes through the channeled porin in high molecular weight substances. This previously observed resistance does not occur in the Gram-positive bacteria, due to the high peptidoglycan permeability of the cell wall.³⁹

Several kinds of photosensitizers may be associated with lasers, but each will have applicability dependant on the absorption of the light and wave length. The main photosensitizers found in the literature are: hematoporphyrin derivatives (620–650 nm), phenothiazine, like toluidine blue and methylene blue (620–700 nm), cyanine (600–805 nm), phytotherapeutic agents (550–700 nm) and phthalocyanines (660–700 nm).^{17,40,41} Several studies demonstrates the efficacy of photodynamic therapy in reducing periodontal pathogens, when a phenothiazine photosensitizer is associated with low-intensity laser.^{16,37,41-45}

According to our results, it seems that the treatments performed affects different bacterial species, although the overall data indicated bacterial reduction, however the reduced levels of the microbiota were not sufficient to achieve periodontal stability, due the elevated mean counts of the “red complex” members, after four weeks, especially for the aPDT group, perhaps in this period, the subgingival environment don’t reached the bacterial homeostasis. The objective of this study was to test different strategies to deal with induced periodontal disease. The therapies were chosen because they have different mechanisms of action on the microbiota and thus might have additive or even synergistic effects. SRP was employed to physically lower the biomass on the tooth surface and in the periodontal pocket and aPDT

due to its non-invasive nature and ability to eliminate microorganisms causing alteration in membranes and/or plasma membrane proteins and DNA damage mediated by singlet oxygen.⁴⁶ The outcome of SRP on the subgingival microflora has been investigated in several studies^{47,48} and this procedure in addition to improving clinical parameters, reduces the bacterial load and results in a shift towards a more health compatible microflora.^{49,50} Regarding the pool of bacteria analysis, the data of this study confirm the results of our previous research (Part I) which demonstrates through 16S gene expression analysis a progressive reduction of the total bacterial load following the same pattern observed here. However, there are conflicting reports about the capacity of SRP to totally eradicate or suppress important bacteria, such as *A. actinomycetemcomitans* which have been shown to remain in periodontal pockets after non-surgical therapy^{51,52}. Our results corroborate this information regarding SRP, on the other hand, aPDT was more effective in reducing, among other species, mean counts of *A. actinomycetemcomitans*, this may be due to the ability of the photosensitizer to penetrate through the epithelium and connective tissue¹⁶, since it's known that this particular microorganism can infiltrate through the epithelial barrier into the periodontal tissues. It was also probably able to reach the *A. actinomycetemcomitans* inside the biofilm since the results indicate to have practically eliminated this microorganism. Numerous *in vitro* studies^{25,36,43,45,53-56} demonstrated that aPDT is effective for bacterial reduction, but only some studies⁵⁷⁻⁶⁰ showed that periodontopathogenic bacteria can be effectively suppressed *in vivo* by aPDT. A recent experimental *in vivo* study⁶¹ using toluidine blue and a diode laser (635 nm) to treat periodontal disease in rats, concluded that aPDT compared to SRP could cause lethal photoinactivation of periodontal pathogenic bacteria and eliminate inflammatory reactions in the gingiva with no detectable damage. Recent clinical trials in humans demonstrated the beneficial effects of aPDT in non-surgical periodontal treatment.^{62,63} These clinical studies showed that the use of aPDT alone is as effective as SRP.

The conventional treatment of chronic forms of periodontal disease seems to be well established, although in some particular clinical situations such as furcations or intrinsic root morphology sites which are difficult to access with hand instruments, this may also be the case with the use of aPDT. In addition, considering that the aPDT is not truly a mechanical therapy, residual calculus is expected to occur. Due to the lower presence of calculus,

aggressive forms of disease and maintenance patients are more prone to its beneficial antimicrobial effect.

When interpreting the microbiologic outcomes obtained with aPDT, the possible effects due to the application of the photosensitizer itself should be considered. Furthermore, it should be emphasized that there are very limited data from controlled studies comparing aPDT used in conjunction with non-surgical periodontal therapy to aPDT alone, SRP alone, or the photosensitizer alone. Thus, further studies are necessary before any definitive conclusions can be drawn about the possible clinical and microbiological benefits of aPDT used in conjunction with non-surgical therapy. The frequency of the aPDT application is another possible explanation for the results obtained in this study. The manufacturer suggests that aPDT treatment should be performed weekly, for 4 to 6 weeks to enhance the antimicrobial effect, in this study a single episode of aPDT was performed to avoid an additional confounding factor (i.e., frequency of applied treatment), which could influence the results obtained. Future studies are needed to clarify if and to what extent multiple applications of aPDT might enhance the outcome of therapy.

CONCLUSIONS

Under the experimental conditions used in this study, our data suggest that SRP, aPDT in a single application and the association of both therapies affects different bacterial species in the treatment of ligature-induced periodontitis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The diode laser, photosensitizer, and fiber optic applicator used in this study were donated by Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria, also this study was in part supported by FAPESP (Grant # 2005/05600774-3 and 2005/60775-0). The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997;14:216-248.

2. Tanner ACR, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodontol Res* 1984;19:279-291.
3. Bollen CM, Quirynen M. Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol* 1996;67:1143-1158.
4. Greenstein G. Non-surgical periodontal therapy in 2000. A literature review. *J Am Dent Assoc* 2000;131:1580-1592.
5. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit of chronic infection: Diagnosis and treatment. *Clin Microb Rev* 2001;14:727-752.
6. Sigusch B, Beier M, Klinger G, Pfister W, Glockmann E. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progression periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:275-283.
7. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontol Res* 2002;37:389-398.
8. Nichols WW, Evans MJ, Slack MPE, Walmsley HL. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1989;135:1291-1303.
9. Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemoth* 1990;26:1-6.
10. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol* 2001;28:597-609.
11. Pallasch TJ. Antibiotic resistance. *Dent Clin North Am* 2003;47:623-639.
12. Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planning, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. Clinical results. *J Clin Periodontol* 2004;31:1070-1076.
13. Von Tappeiner H, Jodlbauer A. On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes (in German). *Deutsch Arch Klin Medizin* 1904;39:427-87.
14. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999;4:507-517.
15. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. (1998). Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:889-905.
16. Kömerik N, Nakanishi H, Mac Robert 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. 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;76:1100-1115.
18. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994; 17:788-792.
19. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C et al. The use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 352-362.
20. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984;63:412-421.
21. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.
22. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res* 2003;38:428-435.
23. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-55.
24. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol* 1995;78:569-574.
25. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 1993;28:204-210.
26. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:324-330.
27. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-3783.
28. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
29. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008;79:2156-2165.
30. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009;36:219-228.

31. 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.
32. Dougherty TJ, Marcus SL. Photodynamic therapy. *Eur J Cancer* 1992;28:1734-1742.
33. 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.
34. 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.
35. DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and a 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.
36. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol* 2000; 72:676-680.
37. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343-1349.
38. Hamblin MR, Hasant T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-450.
39. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Capellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006;38:468-481.
40. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005;79:159-170.
41. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic watersoluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol Biol B* 1996;32:159-164.
42. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:412-418.
43. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of porphyromonas gingivalis in vitro. *Photochem Photobiol* 1997;65:1026-1031.
44. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:182-187.
45. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-46.

46. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1997;39:1-18.
47. Petersilka GJ, Ehmke B, Flemming TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 2002; 28:56-71.
48. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of non-surgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* 2004; 36:98-120.
49. Mousque`s T, Listgarten M, Phillips R. Effect of scaling and root planning on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Periodontal Res* 1980;15:144-151.
50. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent R L, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:324-334.
51. Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990;17:345-350.
52. Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999;70:574-580.
53. Haas R, Dörtbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:249-254.
54. Usacheva M, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29:165-173.
55. Kömerik N. In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:932-940.
56. Nussbaum E, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630, 660, 810 and 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:325-333.
57. Haas R, Baron M, Dortbudak O, Watzek G. Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: Preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:374-382.
58. Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M. Fluorescence biodistribution and photosensitizing activity of toluidine blue O on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci* 2002;17:86-92.
59. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* 2005;76:1275-1281.

60. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced periimplantitis: A preliminary study in dogs. *J Oral Sci* 2003;45:17-23.
61. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng Q, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontol Res* 2008;43:162-167.
62. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007;18:34-38.
63. 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.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Mean counts ($\times 10^5$) of 40 bacterial species at baseline, 1, 3 and 4 weeks in the animals in each of the three treatment groups. Significant differences among treatments are marked with a letter "A" ($p < 0.05$) and differences over time were marked as * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 2: Mean counts ($\times 10^5$) of the pool of bacteria at baseline, 1, 3 and 4 weeks in the animals in each of the three treatment groups.