UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de CTBMF e Periodontia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

MARIANA SALES DE MELO SOARES

**Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações
múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no
tratamento da periodontite crônica em fumantes**

PG.PERIO
FOP-USP

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

MARIANA SALES DE MELO SOARES

Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com aplicações múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica em fumantes

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2018**

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

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Soares, Mariana Sales de Melo.

Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com aplicações múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica em fumantes. Ribeirão Preto, 2018.

71 p. : il.

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

Orientador: Novaes Jr, Arthur Belém

1. Terapia fotodinâmica. 2. Periodontite Crônica. 3. fumantes.

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na unidade que aloja o programa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SOARES, M.S.M.

Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com aplicações múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica em fumantes

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

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos Meus Pais **Gilberto** e **Vera**, por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos e ao meu noivo **Robson** que esteve presente em todos os momentos, participando e colaborando para que tudo desse certo. Obrigada pela paciência e apoio. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar minhas escolhas e por me proporcionar saúde para que eu pudesse concluir mais uma etapa na minha vida.

À minha **Família**, meus pais, minha avó, tios e primos, meu noivo, por todo amor conferido a mim e incentivo ao meu crescimento profissional. Em especial à Meus irmãos, Nathália e Joca. Obrigada pelo carinho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**, pela oportunidade e confiança para realizar este trabalho e por toda contribuição durante o estudo, sempre presente e com soluções para meus questionamentos. Muito obrigada.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Michel Reis Messora** pela contribuição indispensável, por suas críticas construtivas e pelo incentivo de argumentações baseadas evidências científicas.

À **Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/ USP) que contribuiu com a análise imunológica deste trabalho.

À **Profa. Dra. Luciene Figueiredo (UnG)** por sua contribuição na análise microbiológica juntamente com a bióloga **Izilvania Barreto**, pela disponibilidade e atenção dada.

À **Caroline Fontanari** técnica do Laboratório da FCFRP/USP que se disponibilizou em me ajudar no processamento imunológico das amostras. Obrigada pela paciência e dedicação.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Periodontia, na pessoa do **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pela confiança e todo ensinamento transmitido.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Periodontia, **Daniela Bazan Palioto Bulle**, **Mário Taba Jr.** e **Márcio Fernando de Moraes Grisi**, por incentivarem e contribuírem para minha formação acadêmica. Obrigada por todo o conhecimento transmitido.

A **Milla**, **Fabíola** e **Roger** pela cooperação indispensável durante a execução deste trabalho. Obrigada pela paciência e atenção.

Aos meus amigos **Paula, Cris, Nicolly, Natacha, Delmondes, Mandetta, Kelly, Felipe, Felipe (crazy), Umberto, Gustavo, Marcos, Paty, Renata, Pedro, Carla, Milena, Jéssica, Luiz, Danilo** e todos que compartilharam dessa caminhada ao meu lado, sempre com palavras de conforto para que eu continuasse seguindo em frente, e a todos os amigos de Ribeirão Preto, que me acolheram com carinho.

Aos amigos de Maceió, que mesmo distante, sempre incentivaram o meu sucesso profissional.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP-USP, Dulce, Bel e Dani, pela atenção e disposição.

Aos funcionários Dani, Joana, Zé, Verinha e Roberta, que sempre estavam disponíveis para colaboração nas disciplinas clínicas.

Aos **Pacientes**, indispensáveis para realização do estudo, meu agradecimento pela paciência e disponibilidade.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, por proporcionar a estrutura necessária para minha formação profissional durante todos esses anos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

Carl G. Jung

RESUMO

SOARES, M.S.M. **Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com aplicações múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica em fumantes**. 2018. 98p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2018.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de repetidas aplicações da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes fumantes. Foram selecionados 20 indivíduos fumantes com diagnóstico clínico de periodontite crônica. O estudo foi do tipo boca dividida, sendo um lado utilizado a TFDa associada à raspagem e alisamento radicular (RAR) e no outro apenas RAR. Foi utilizado laser com 660nm de comprimento de onda associada ao fotossensibilizador fenotiazida e as aplicações foram realizadas em 4 episódios (dias 0, 2, 7 e 14). Todos os pacientes foram acompanhados por 90 dias. As avaliações clínicas de índice de placa (IP), profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), sangramento à sondagem (SS) e sangramento marginal (SM) foram realizadas no baseline, 0, 30 e 90 dias após a execução do tratamento. Foi realizada análise microbiológica para contagem de 40 espécies bacterianas da amostra subgengival da placa bacteriana (*Checkerboard DNA-DNA hybridization*). Níveis das citocinas do fluido crevicular gengival foram avaliados (Interleucina-1 β , Interleucina-10 e Fator de Necrose Tumoral α). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Em geral não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$) nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos 90 dias após o tratamento. O tratamento periodontal com RAR + TFDa em múltiplos episódios não promoveu benefícios adicionais à RAR no tratamento não cirúrgico da periodontite crônica em fumantes sem o uso de antibióticos sistêmicos.

Palavras-chave: Periodontite crônica; Terapia fotodinâmica antimicrobiana; Fotossensibilização; fotoquimioterapia; fumantes.

ABSTRACT

SOARES, M.S.M. **Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy in multiples episodes as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in smokers.** 2018. 98p. Thesis (Doctor) – Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2018.

The aim of this study was to investigate the additional influence of multiple applications of antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) in smokers without use of systemic antibiotics. Twenty smokers with chronic periodontitis were treated in a split-mouth design study with aPDT adjunct to Scaling and Root Planing (SRP) or SRP only. aPDT was performed by using a laser light source with 660 nm wavelength associated with a photosensitizer. The applications were performed in four episodes (at days 0, 2, 7 and 14). All patients were monitored for 90 days. Plaque index, probing depth, clinical attachment level, bleeding on probing and marginal bleeding were performed at baseline, 0, 30 and 90 days after the SRP. Counts of 40 subgingival species in plaque samples were monitored (*Checkerboard DNA-DNA hybridization*). Gingival crevicular fluid and subgingival plaque samples were collected (Interleukin 1 β ; Interleukin 10 e Tumor necrosis factor). Data obtained were statistically analyzed. aPDT as an adjunct to SRP did not demonstrate statistically significant advantages on clinical parameters when compared with SRP alone. In general no statistic significant differences between groups were observed ($p < 0.05$). Levels of anti-inflammatory cytokines and bacterial species were comparable in both groups at day 90 after treatment. Periodontal treatment with SRP + aPDT in multiples episodes was not able to improve results in the non-surgical treatment of chronic periodontitis in smokers when compared SRP alone, without the use of systemic antibiotics.

Keywords: Chronic Periodontitis; Antimicrobial Photodynamic Therapy; Photosensitizing; photochemotherapy; smokers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento do estudo	25
Figura 2. Lado teste selecionado aleatoriamente; B) Aplicação do fotosensibilizador (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems) na concentração de 10mg/ML; C) Irrigação com soro fisiológico para remoção do excesso do fotosensibilizador; D) Ativação do laser diodo em 6 pontos por elemento dentário (660nm, 70mw, 10s por ponto) com ponta de fibra óptica de 0,6mm de diâmetro (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems).	34
Figura 3. Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo.	38
Figura 4. Concentração de cotinina na saliva e número de cigarros consumidos por dia no baseline.	39
Figura 5. Média e desvio padrão dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α (pg/mg) nos grupos teste e controle no baseline, dia 14, dia 30 e dia 90 após a raspagem e alisamento radicular para bolsas moderadas (A,C e E) e profundas (B, D e F). $p < 0,05$ quando comparado ao baseline, Teste de <i>Kruskal Wallis</i> ; (†) Diferença estatisticamente significativa entre grupos no mesmo tempo experimental, Teste de <i>Wilcoxon</i>	43
Figura 6. Média da contagem das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival nos diferentes tempos experimentais e nos grupos controle e teste. (*) Diferenças significantes entre tempos intra-grupo ($p < 0,05$). Teste de <i>Wilcoxon</i>	45
Figura 7. Gráficos em pizza com as proporções medias de cada complexo microbiano no baseline, dia 0, dia 30 e Dia 90 após o tratamento no grupo teste e controle. As cores representam os diferentes complexos microbianos (Socransky et al., 1998). (*) Diferenças significantes quando comparado com o baseline, teste de <i>Kruskal Wallis</i> . (†) Diferença significativa entre grupos no mesmo tempo experimental. Teste de <i>Wilcoxon</i> ($p < 0.05$).	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica <i>DNA-DNA Checkerboard Hybridization</i>	31
Tabela 2. Características demográficas dos pacientes; DP= Desvio Padrão.....	39
Tabela 3. PS e NCI no grupo teste e controle nos diferentes tempos e resultados das comparações intra e inter-grupos.	40
Tabela 4. Frequência absoluta e relative para SM, SS, IP nos grupos teste e controle e resultado das comparações intragrupo (Teste de <i>Fisher's</i>) e intergrupos (Teste de <i>Friedman</i>).	41
Tabela 5. Bolsas residuais e número de pacientes com necessidade de cirurgia de acesso 90 dias após o tratamento (%). Teste de <i>Fisher</i>	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
<i>Ec</i>	<i>Eikenella Corrodens</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>Fn</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	Grama
g/mL	Grama/mililitro
IC	Intervalo de confiança
IGg	Imunoglobulina G
IHO	Instrução de higiene oral
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IP	Índice de Placa
J/cm ²	Joule/centímetro ao quadrado
mg/mL	Miligramas/mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mW	Miliwatt
NAM	Ácido N-acetil murâmico
NCI	Nível clínico de inserção
ng/dL	Nanograma/decilitro

Nm	Nanômetros
PC	Periodontite Crônica
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PA	Periodontite Agressiva
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pg/mL	Picograma/mililitro
Pg/mg	Picograma/ miligrama
PHO	Programa de higiene oral
PS	Profundidade de Sondagem
RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
RNA	Ácido ribonucleico
SS	Sangramento à sondagem
SSC	Solução salina citratada
Td	<i>Treponema denticola</i>
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TLR	Receptores Toll-like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TPnC	Terapia Periodontal não Cirúrgica
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
UNG	Universidade de Guarulhos
W/cm ²	Watt/centímetro ao quadrado
μ g	Micrograma
μ g/mL	Micrograma/mililitro
μ L	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcento
>	Maior
<	Menor
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
CO_2	Dióxido de Carbono
G	Unidade de Aceleração
H	Hidrogênio
HCL	Ácido Clorídrico
M	Concentração molar
n	Tamanho da amostra
N	Nitrogênio
R	Coeficiente de correlação
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NA_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
p	Probabilidade de significância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2 PROPOSIÇÃO	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Consentimento para a pesquisa	24
3.2 Cálculo do tamanho da amostra	24
3.3 Seleção dos pacientes	24
3.4 Delineamento do estudo	25
3.5 Monitoramento Clínico	26
3.6 Calibração do examinador	26
3.7 Monitoramento imunológico	26
3.8 Análise da Cotinina salivar	27
3.9 Monitoramento microbiológico.....	28
3.9.1 <i>Cepas bacterianas e condições de crescimento</i>	29
3.9.2 <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	30
3.10 Variáveis de resultados	32
3.11 Terapia Periodontal Não Cirúrgica	32
3.12 Protocolo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)	33
3.13 Análise estatística dos dados obtidos	34
3.13.1 Parâmetros Clínicos.....	35
3.13.2 Parâmetros Imunológicos.....	35
3.13.3 Parâmetros microbiológicos	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Monitoramento Clínico	40
4.2 Monitoramento Imunológico	42
4.3 Monitoramento Microbiológico	44
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	52

REFERÊNCIAS 54

ANEXOS 66

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 67

Anexo B – Certificado de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa 70

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A Doença Periodontal (DP) é uma doença polimicrobiana resultante de uma interação complexa entre os micro-organismos do biofilme dental e a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (Haffajee e Socransky, 1994; Kornman, 2008; Bartold e Van Dyke, 2013). Entre as formas da DP, a periodontite crônica é caracterizada pela perda de inserção progressiva, formação da bolsa, perda de tecido conjuntivo e osso alveolar (Kinane *et al.*, 2017).

A alta ocorrência e gravidade da DP esta relacionada a fatores de risco como o tabagismo, que apresenta evidências substanciais do seu efeito prejudicial na saúde periodontal (Gelskey, 1999; Bergstrom, 2006; Corraini *et al.*, 2008; Genco e Borgnakke, 2013; Zeng *et al.*, 2014). Um levantamento epidemiológico estimou a proporção de indivíduos com DP atribuída ao tabagismo, observando-se que o hábito de fumar pode ser responsável por mais da metade dos casos de periodontite entre adultos nos Estados Unidos com Odds Ratio (OD) de 3.9 (Tomar e Asma, 2000). A importância do tabagismo como fator de risco para DP é fundamentada por vários fatores: I) consistência dos resultados de vários estudos; II) Força da associação; III) associação de dose-resposta; IV) sequência temporal do fumo e DP e V) Plausibilidade biológica (Genco e Borgnakke, 2013).

Indivíduos fumantes são mais propensos a bolsas periodontais profundas, perda de inserção, perda óssea e elevado número de bactérias patogênicas (Johnson e Hill, 2004; Ryder, 2007). Essas condições são atribuídas às alterações na defesa inata contra patógenos, modulação da resposta imune adaptativa e ao estresse oxidativo nos tecidos provocado pelo hábito de fumar (Lee *et al.*, 2012). Existem diversos mecanismos pelos quais a modulação induzida por componentes do cigarro facilita a colonização e infecção crônica na cavidade oral.

Estudos demonstraram que as células epiteliais gengivais humanas incubadas com extrato do cigarro produzem substancialmente menos peptídeos antimicrobianos quando ativados com receptores Toll-like (TLR) (Mahanonda *et al.*, 2009), dessa forma esses componentes do cigarro podem modificar a expressão, distribuição e ativação local dos receptores TLR, promovendo um ambiente permissivo para inflamação crônica (Beklen *et al.*, 2008; Pace *et al.*, 2008). Outro estudo que avaliou os efeitos sistêmicos do cigarro, demonstrou que o hábito de fumar diminui a concentração de anticorpos IgG₂, comprometendo a função dos neutrófilos e consequentemente a fagocitose de bactérias (Fredriksson *et al.*, 1999). A nicotina também pode aumentar a degranulação dos

neutrófilos, tornando-os mais sensíveis ao desafio bacteriano (Soder *et al.*, 1999; Genco e Borgnakke., 2013).

Estudos identificaram alterações na microflora oral de fumantes, com aumento significativo na quantidade de micro-organismos como *P gingivalis* (Pg), *A actinomycetemcomitans* (Aa) e *T forsythia* (Tf) quando comparados a indivíduos não fumantes (Guglielmetti *et al.*, 2014). Devido à reduzida capacidade em combater esses micro-organismos, a resposta ao tratamento periodontal convencional é menos favorável, apresentando resultados pouco promissores após determinados procedimentos periodontais (Johnson e Hill, 2004; Heasman *et al.*, 2006; Güntsch *et al.*, 2006).

Ensaio clínicos que avaliaram o tratamento mecânico em fumantes, direcionados a alterações microbiológicas, relataram uma maior dificuldade em afetar os patógenos subgingivais e mantê-los sob controle nesses indivíduos (van der Velden *et al.*, 2003; Mascarenhas *et al.*, 2005; Grossi *et al.*, 2007). Esses fatores devem ser considerados nos casos de recorrência da doença e insucesso do tratamento periodontal (Bergstrom, 2004; Johnson e Guthmiller, 2007).

O tratamento da periodontite está focado na eliminação da infecção com protocolos de tratamento baseados em terapias anti-infecciosas (Haffajee e Socransky, 1994). O objetivo da terapia periodontal é a melhora dos parâmetros clínicos de profundidade de sondagem (PD), sangramento à sondagem (SS) e ganho de nível de inserção (NCI). Estes resultados são alcançados quando os níveis, proporções e percentuais de sítios colonizados por diferentes patógenos periodontais são efetivamente reduzidos após a RAR, e uma nova comunidade microbiana com maiores proporções de micro-organismos compatíveis com a saúde periodontal é estabelecida na cavidade oral (Socransky e Haffajee 2005; Teles *et al.* 2006).

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é a terapia mais comumente utilizada para a DP, no entanto, este processo pode não conduzir as alterações microbiológicas necessárias para a manutenção da estabilidade em longo prazo dos benefícios clínicos obtidos inicialmente (Cugini *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005). Apesar da melhora dos parâmetros clínicos, a terapia mecânica não remove inteiramente os micro-organismos do biofilme dental pela capacidade de invasão dos patógenos para o tecido mole adjacente, cemento e nos túbulos dentinários, especialmente em casos de bolsas periodontais profundas

(Adriaens *et al.*, 1988; Sbordone *et al.*, 1990; Doungudomdacha *et al.*, 2001; Socransky, Haffajee, 2002; Umeda *et al.*, 2004).

Um estudo de revisão sistemática observou que a diferença média de redução na PS, entre fumantes e não fumantes é de 0,43 mm após terapia periodontal não cirúrgica (TPnC), em favor dos não fumantes, sugerindo que esses indivíduos necessitam de terapias adicionais a RAR com objetivo de eliminar os depósitos bacterianos remanescentes (Teles *et al.*, 2006) e melhorar resultados clínicos e microbiológicos (Labriola *et al.*, 2005).

Para potencializar os efeitos da RAR, protocolos de terapia mecânica associada a antibióticos sistêmicos, como amoxicilina e metronidazol, têm sido empregados no tratamento de doenças periodontais (Herrera *et al.*, 2002; Haffajee *et al.*, 2003), apresentando benefícios clínicos e biológicos quando associada ao tratamento não cirúrgico em indivíduos tabagistas (Matarazzo *et al.*, 2008). Todavia ainda não há evidências suficientes na literatura para apoiar ou refutar que o uso de antibióticos sistêmicos, adjuvante a RAR, levaria a benefícios adicionais ao tratar a periodontite crônica em fumantes (Angaji *et al.*, 2010; Albandar, 2012). Outros fatores devem ser levados em consideração com relação aos antibióticos, como os efeitos secundários, tais como perturbações gastrointestinais e desenvolvimento de resistência bacteriana que é um problema de saúde pública mundial (van Winkelhoff *et al.*, 2000; Feres *et al.*, 2002; Pallasch, 2003).

No contexto do desenvolvimento de abordagens antimicrobianas alternativas para gerenciar pacientes afetados com periodontite, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem sido investigada como método terapêutico (de Oliveira *et al.*, 2007; Novaes Jr *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2013). Especificamente em indivíduos tabagistas, não há estudos suficientes para afirmar os potenciais benefícios do efeito da TFDa associados a RAR. No entanto, os resultados de alguns estudos demonstram que a TFDa pode ser um tratamento promissor para determinados grupos de indivíduos (Al-Zahrani, Austah, 2011; Queiroz *et al.*, 2013).

A TFDa é baseada no princípio de que uma substância fotoativável, o fotossensibilizador, se liga à célula-alvo, podendo ser ativado por uma luz de comprimento de onda adequado. Com a ação da luz, os radicais livres de oxigênio singleto são formados, produzindo um efeito tóxico resultando na morte celular (Yamada *et al.*, 2004; de Oliveira *et al.*, 2007). Os primeiros relatos sobre as propriedades de absorção de luz e de fluorescência

de vários corantes indicavam que a excitação por luz exerce ação destrutiva em sistemas biológicos. Esse processo, denominado "ação fotodinâmica", foi descrito como um processo no qual a luz depois de ser absorvida por corantes, sensibiliza os organismos por induzir danos celulares (de Oliveira *et al.*, 2007).

Com a utilização da TFDa as bactérias são destruídas em um curto período de tempo (<60 segundos) sem danos aos tecidos adjacentes (Kömerik *et al.*, 2003), e diferentemente dos antibióticos, seria improvável a ocorrência de resistência bacteriana nos indivíduos que se submetem a esse procedimento (de Oliveira *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que micro-organismos patógenos podem ser efetivamente suprimidos pela TFDa (Wilson *et al.*, 1992; Sarkar e Wilson, 1993; Soukos *et al.*, 1998; Pfitzner *et al.*, 2004; de Oliveira *et al.*, 2007). Além disso, também foi observado melhora em todos os parâmetros clínicos periodontais, especialmente na redução do sangramento à sondagem (Andersen *et al.*, 2007; Braun *et al.*, 2008; Christodoulides *et al.*, 2008; Lulic *et al.*, 2009; Takasaki *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2011; Berakdar *et al.*, 2012;) e na porcentagem de sítios com bactérias patogênicas (Theodoro *et al.*, 2012). O potencial de alguns fatores de virulência, como lipopolissacarídeos e proteases, também demonstrou ser reduzido por fotossensibilização (Kömerik *et al.*, 2000).

Os resultados de um estudo que avaliou o tratamento com terapia fotodinâmica associado à raspagem com ultrassom ou apenas ultrassom, relatou que após qualquer um desses tratamentos ocorrem mudanças nos parâmetros clínicos, com melhora durante o período de manutenção (Petelin *et al.*, 2014). Novaes Jr. *et al.* (2012) avaliaram alterações na composição microbiológica subgengival, comparando os tratamentos de RAR e TFDa em pacientes com periodontite agressiva e observaram que os tratamentos afetavam diferentes grupos de bactérias, sendo a TFDa mais eficaz na redução do *Aa*.

A TFDa por não ser um método mecânico deve ser empregada em conjunto com a RAR, evitando a ocorrência de cálculo residual que dificulta a penetração do fotosensibilizador, além da desorganização do biofilme subgengival (Novaes Jr. *et al.*, 2012). Dessa forma, quando utilizada em conjunto mantém-se o efeito desejado do tratamento. Outros fatores também estão relacionados ao sucesso da TFDa como à concentração do fotosensibilizador, parâmetros de irradiação (comprimento de onda e potência da luz), protocolo de fototerapia (tempo de exposição e quantidade de energia empregada) e o tipo de micro-organismo (Prates *et al.*, 2011).

Protocolos de aplicação única da terapia fotodinâmica têm apresentado resultados positivos, no entanto, em alguns casos, o benefício adicional à RAR não foi estatisticamente comprovado para os parâmetros clínicos e níveis de citocinas do fluido crevicular gengival quando comparados com apenas a terapia de RAR (de Oliveira *et al.*, 2007; de Oliveira *et al.*, 2009; Balata *et al.*, 2013). Especula-se que o efeito de aplicação única da TDFa pode ser insuficiente para evitar a recolonização dos sítios tratados (Novaes Jr. *et al.* 2012; Petelin *et al.*, 2014). Em virtude desses fatos, a utilização de repetidos episódios de TFDa, na 1 e 2 semana após RAR, tem sido sugerida e baseada no fato de que logo após a remoção da placa supra e subgengival alguns cocos Gram positivos retomam a condição inicial em 1 dia, essas bactérias permitem a subsequente aderência de micro-organismos Gram negativos. *F nucleatum* e *P intermedia* também atingem os valores iniciais no terceiro ou quarto dia após a remoção do biofilme subgengival e no sétimo dia, os valores iniciais de alguns micro-organismos são excedidos (Haffajee, Socranky, 2005).

Visto que a presença de micro-organismos patógenos tem uma significativa associação com fumantes (Guglielmetti *et al.*, 2014) e que o fumo influencia negativamente os resultados do tratamento periodontal, a utilização da TFDa em episódios múltiplos como terapia adjuvante a RAR poderia um tratamento promissor na redução desses micro-organismos patógenos e melhora das condições clínicas periodontais, especialmente em pacientes fumantes, sem a utilização de antibióticos.

2 PROPOSIÇÃO

- **Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da terapia Fotodinâmica antimicrobiana em episódios múltiplos associados à Raspagem e Alisamento Radicular em indivíduos fumantes com periodontite crônica.

- **Objetivos Específicos**

Avaliar parâmetros clínicos (Índice de placa, profundidade de bolsa à sondagem, nível Clínico de inserção, sangramento a sondagem e sangramento marginal) antes e após tratamento da periodontite crônica com múltiplas aplicações da TFDa associada à RAR ou apenas RAR.

Avaliar os níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 presentes no fluido crevicular gengival antes e após tratamento da periodontite crônica com múltiplas aplicações de TFDa associada à RAR ou apenas RAR.

Avaliar a microbiota subgengival antes e após tratamento da periodontite crônica com múltiplas aplicações de TFDa associada à RAR ou apenas RAR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Consentimento para a pesquisa

Este estudo foi conduzido após a aprovação do comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP) (Protocolo nº 36933014.4.0000.5419). Todos os pacientes receberam informações detalhadas com relação ao experimento do qual participaram (Objetivos, benefícios, riscos e desconfortos) de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

3.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi determinado assegurando 80% de poder nas análises dos dados, considerando uma diferença significativa de 1 mm (δ) entre grupos com intervalo de confiança (IC) de 95% ($\alpha = 0.05$) e desvio padrão (σ) de 1.0 mm (Dilsiz *et al.*, 2013), sendo considerado as variações nas médias de Nível Clínico de Inserção como variável de resultado primário $[Z_{\alpha} (1.96) + Z_{\beta} (0.84)]^2 = 7.84$. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado na fórmula $n = \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2$. Portanto, foi necessário um total de 16 indivíduos. Julgando que alguns pacientes poderiam ser perdidos durante o acompanhamento, foram recrutados 22 sujeitos para esse estudo.

3.3 Seleção dos pacientes

Foram selecionados 22 pacientes da população atendida na Clínica de Pós-graduação em Periodontia da FORP-USP. Os pacientes selecionados apresentaram os seguintes critérios de inclusão: (1) diagnóstico de Periodontite crônica de acordo com a classificação internacional das doenças periodontais adotada pela Academia Americana de Periodontologia (Armitage, 1999), (2) bolsas periodontais ≥ 5 mm (3) fumar ≥ 10 cigarros por dia (4) não apresentar história positiva de antibioticoterapia nos últimos seis meses, (5) sem história positiva de tratamento periodontal básico nos últimos seis meses, (6) sem envolvimento sistêmico que possa interferir na progressão da doença ou na resposta ao tratamento (ex.: diabetes, desordens imunológicas), (7) sem envolvimento protéticos extensos, (8) sem necessidade de profilaxia antibiótica para a realização de procedimentos odontológicos de rotina, (9) sem utilizar anti-inflamatórios à longo prazo (10) não gestantes.

3.4 Delineamento do estudo

A Figura 1 representa o delineamento do estudo. Uma semana antes do início das intervenções (*baseline*) os indivíduos selecionados receberam instruções de higiene oral (IHO) e raspagem supragengival em todos os elementos dentários. O estudo foi do tipo boca dividida com dentes uni-radiculares contralaterais com dois sítios periodontais proximais apresentando profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ para as avaliações clínicas, microbiológicas e imunológicas. De acordo com uma tabela numérica aleatória gerada por um programa computadorizado, cada lado selecionado recebeu um dos seguintes tratamentos: RAR ou RAR associada a múltiplas aplicações da TFDa (ver Itens 3.11 e 3.12). Os parâmetros clínicos periodontais, imunológicos e microbiológicos foram avaliados no Dia 0, 30 e 90 após a realização da TPnC.

Os exames clínicos periodontais foram realizados por um único examinador devidamente treinado e calibrado (C.A.B), o qual desconhecia os grupos experimentais do presente estudo. Os procedimentos de RAR e utilização do protocolo da TFDa foram realizados por outro operador treinado para estas finalidades (M.S.M.S).

Figura 1. Delineamento do estudo

3.5 Monitoramento Clínico

O índice de placa (IP) visível de cada paciente foi avaliado dicotomicamente (O’Leary *et al.*, 1972) e determinado pela porcentagem das superfícies dos dentes com depósitos de placa.

Em 6 sítios de cada elemento dentário (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual) foram avaliados parâmetros clínicos periodontais de Profundidade de sondagem da bolsa periodontal (mm): medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa; Nível clínico de inserção (mm): mensurado a partir da Junção Cimento-esmalte ao fundo da bolsa; Sangramento à sondagem e sangramento marginal avaliados dicotomicamente (Ainamo e Bay, 1976): a presença do sangramento foi considerada positiva quando ocorrer em até 20s após a inserção da sonda para medida da profundidade de sondagem. Todos os parâmetros clínicos de cada paciente foram registrados no *baseline* (período pré-intervenção), bem como nos dias 0, 30 e 90 após a realização TPnC.

3.6 Calibração do examinador

O índice *Kappa* foi utilizado para avaliar a calibração do examinador para coleta dos parâmetros clínicos periodontais a fim de mensurar a concordância diagnóstica intra-examinador. Foram selecionados 10 pacientes, cada paciente foi examinado duas vezes por meio de sonda periodontal computadorizada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA), com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e segundo exame para obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador, a qual foi aferida determinando-se o índice Kappa.

3.7 Monitoramento imunológico

Nos dias 0, 14, 30 e 90, após a realização TPnC foram coletadas amostras do FCG dos elementos dentários selecionados. A placa supragengival desses elementos foi removida e os sítios foram cuidadosamente secos com jatos de ar, sendo, posteriormente, isolados com roletes de algodão estéreis. As amostras do FCG foram obtidas dos sítios mesiais e distais

com a utilização de tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). As tiras foram cuidadosamente inseridas junto à margem do sulco gengival, permanecendo por um período de 30 segundos. As tiras foram colocadas em frascos esterilizados do tipo *Eppendorf*, os quais foram armazenados a uma temperatura de -80°C para posterior quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10. Os níveis de citocinas foram obtidos utilizando-se um kit Millipore 3-plex (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e o sistema Luminex 100™ (Luminex, MiraiBio, Alameda, CA, EUA).

O valor da Proteína total de cada amostra foi verificado por meio de ensaio imunoenzimático convencional (ELISA). Inicialmente fez-se o preparo da curva de concentração. Para isso, diluições seriadas foram feitas a partir da proteína Albumina de serum bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 1.5 mg/ml, até atingir 5 pontos da curva (1.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 0.375 mg/ml, 0.187 mg/ml, 0.09 mg/ml). Como diluidor e branco foi-se utilizado água deionizada. Para preparo das amostras, as mesmas foram descongeladas e adicionados 2 μ l de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em uma solução com 0,01% de Tween 20 em 200 μ l de solução salina tamponada (PBS – Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). Os microtubos foram, então, deixados por 30 minutos em agitador orbital de placa. As amostras foram centrifugadas, subsequentemente, a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, para coleta do sobrenadante. Para análise 5 μ l de cada ponto da curva padrão, do branco e de cada amostra foram pipetadas em placas de 96 poços - Costar 3595 (Corning Incorporated, NY, EUA), em duplicata. Em seguida, foi-se utilizado um kit comercial para marcação das proteínas presentes nos poços (Bio-Rad, California, EUA). Resumidamente, 25 μ l do reagente A (Bio-Rad DC™ Protein Assay), foram adicionados em todos os poços, seguido de 200 μ l do reagente B (Bio-Rad Reagent B). A placa foi deixada por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente para posterior leitura em leitor de placa μ Quant (BioTek, Winooski, VT). Os dados foram lidos em um comprimento de onda de 750 nm e os resultados apresentados como uma média da duplicata, em mg/ml.

3.8 Análise da Cotinina salivar

No baseline foi coletada a saliva de cada paciente em tubos Falcon estéreis e armazenados no freezer -80. A coleta integral da saliva foi realizada sem estimulação, apenas posicionando a cabeça do paciente ligeiramente para baixo por 3 min, permitindo a

saliva se acumular no assoalho da boca. O procedimento foi realizado 3 vezes, sendo o primeiro acúmulo de saliva descartado. Os níveis de cotinina foram detectados por análise imunoenzimática (ELISA) (Salimetrics Inc., State College, PA, USA). Foi utilizado o kit comercial Salivary Cotinine – quantitative high sensitivity (Salimetrics, State College, PA, EUA) para marcação das proteínas presentes nas amostras de saliva, de acordo com especificações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram descongeladas e centrifugadas 5000rpm por 15 minutos em T.A. e diluições seriadas foram feitas a partir do reagente padrão 200 ng/ml, até atingir 5 pontos da curva (66 ng/ml, 22,2 ng/ml, 7,4 ng/ml, 2,5 ng/ml, 0,8 ng/ml), todos os reagentes foram preparados previamente. Para análise 20µl de cada ponto da curva padrão, do controle negativo e de cada amostra foram pipetadas na placa de 96 poços, em um determinado poço pipetou 120ul Assay Diluent NSB. Adicionou 100ul de Enzyme Conjugate em todos os poços e incluiu 100ul de Cotinine Antiserum menos no poço contendo o Assay Diluent NSB. Em seguida, a placa foi vedada e incubada 37°C com agitação de 500rpm por 1 hora e 30 minutos. Após este período, foi realizado o processo de lavagem. Em seguida, adicionou 200ul de TMB Substrate Solution por poço, a placa foi novamente vedada e incubada com agitação de 500 rpm por 5 minutos. A placa foi mantida em temperatura ambiente em local escuro por 25 minutos. Por fim, foi adicionado 50ul de Stop Solution misturando em 500rpm por 3 minutos. Os dados foram lidos em um comprimento de onda de 450 nm.

3.9 Monitoramento microbiológico

No *baseline* e nos dias +30 e +90, após a realização TPnC, amostras de placa subgengival foram coletadas nas bolsas periodontais proximais (mesial e distal) dos dentes selecionados. Contagens de 40 espécies subgengivais foram determinadas em cada amostra usando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization* (do Nascimento, *et al.*, 2008).

Para a coleta da placa subgengival, os sítios foram isolados com roletes de algodão estéreis e secos com jatos de ar. A placa supragengival foi cuidadosamente removida com a utilização de uma cureta estéril. Em seguida, outra cureta estéril foi utilizada para a coleta de placa subgengival, partindo da extremidade mais profunda da bolsa para a região coronal. As amostras coletadas foram rapidamente depositadas em tubos do tipo *Eppendorf* estéreis e identificados com os dados dos pacientes. Os tubos continham 150 µL de solução tampão

(10mM de Tris-HCL, 1mM de EDTA, pH 7,6 – solução TE). Após a coleta das amostras em solução tampão foi adicionado 100µL de NaOH a 0,5M e armazenados no freezer -80° para permitir que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Contagens de 40 espécies bacterianas subgengivais foram identificadas em cada amostra através do método de *checkerboard DNA-DNA hybridization* realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da Universidade de Guarulhos (Universidade de Guarulhos – UNG, Guarulhos, SP, Brasil) conforme descrição de Sampaio *et al.* (2011).

3.9.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar- triptose de soja com 5% de sangue desfibrilado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrilado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de Mycoplasma suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5mL contendo 1mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3500g por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-

negativas foram novamente suspensas e lisadas com dodecilsulfato de sódio (SDS - C₁₂H₂₅NaO₄S, Synth®, Labsynth, Diadema, SP, Brasil) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15mg/mL de lisozima (Sigma) e 5mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (Smith *et al.*, 1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *kit random primer digoxigenin labeling* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). As espécies avaliadas (Tabela 1) foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal.

3.9.2 Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As suspensões de biofilme subgengival foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônio a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de micro-organismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10⁵ e 10⁶ células, ou seja, 1g e 10g de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 vezes de solução salina citratada (SSC) (1 vez de SSC= 150mM NaCl - Vetec), 15M de citrato de sódio – pH 7,0 (J.T.Baker, Estado de México, México), 25mM de fosfato de sódio – pH 6,5 (Na₂HPO₄, Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 g/mL, em 130 µL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 vezes de SSC, 20mM de

Na₂HPO₄ (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C.

Tabela 1. Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica *DNA-DNA Checkerboard Hybridization*.

Complexo Azul	Complexo Roxo	Complexo Amarelo	Complexo Verde
<i>A. gerencseriae</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>A. a</i>
<i>A. israeli</i>	<i>V. parvula</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>C. gingivalis</i>
<i>A. naeslundii</i>		<i>S. mitis</i>	<i>C. ochracea</i>
<i>A. oris</i>		<i>S. oralis</i>	<i>C. sputigena</i>
		<i>S. sanguinis</i>	<i>E. corrodens</i>
Complexo Laranja	Complexo Vermelho	Espécies “não- orais”	
<i>C. gracilis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>T. Socranskii</i>	
<i>C. showae</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. saburreum</i>	
<i>C. rectus</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>S. anginosus</i>	
<i>E. nodatum</i>		<i>N. mucosa</i>	
<i>F. nucleatum (sp. nucleatum)</i>		<i>S. noxia</i>	
<i>F. periodonticum</i>		<i>P. acnes</i>	
<i>F.n. (sp. polymorphum)</i>		<i>P. melaninogenica</i>	
<i>F.n. (sp. vincentii)</i>		<i>G. morbillorum</i>	
<i>P. intermedia</i>		<i>L. buccalis</i>	
<i>P. micra</i>			
<i>P. nigrescens</i>			
<i>S. constellatus</i>			

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína - pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi lavada duas vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20 - pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-StarTM *Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi

Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado e calibrado que desconhecia os grupos experimentais e terapias utilizadas no presente estudo. A leitura foi realizada duas vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas duas linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias (duas últimas das 30 canaletas do *Minislot*). Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a aproximadamente 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 a aproximadamente 10^6 células; e 5 equivaleu a mais de 10^6 células. Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas. Um total de 190 amostras foi analisado.

3.10 Variáveis de resultados

A variável primária estabelecida para este estudo foi o NCI aos 90 dias após o tratamento periodontal não cirúrgico. Os parâmetros clínicos (PS e NCI) foram analisados levando-se em consideração a estratificação em subgrupos da PS inicial. As bolsas periodontais foram classificadas de acordo com a PS inicial, sendo as moderadas com PS entre 5-6mm e profundas com $PS \geq 7$ mm. Os demais parâmetros clínicos (IP, SS, SM, PS), imunológicos e microbiológicos, foram considerados variáveis secundárias, assim como o número de bolsas periodontais residuais e o número de pacientes com necessidade de terapia periodontal adicional. A variável “necessidade de cirurgia de acesso” foi obtida caso o paciente apresentasse pelo menos um dente com sítio com $PS \geq 5$ mm e sangramento à sondagem positivo.

3.11 Terapia Periodontal Não Cirúrgica

Todos os pacientes, 7 dias antes da realização da TPnC, foram submetidos a exame radiográfico periapical completo da boca toda. Os mesmos foram agrupados em um programa de higiene oral (PHO) individualizado. Neste programa, os pacientes receberam

instruções de autocontrole do bifilme dental, incluindo informações sobre a Técnica de Bass (Bass, 1954) e limpeza interproximal com fio dental e escovas interdentais. Após a realização do PHO, os pacientes foram avaliados clinicamente e registrado todos parâmetros clínicos periodontais descritos anteriormente. Foram realizadas coletas de amostras de placa bacteriana subgengival e do FCG nos sítios selecionados (*baseline* – período pré-intervenção). Logo em seguida, receberam raspagem supragengival.

A TPnC foi iniciada 7 dias após a execução do PHO e da raspagem supragengival inicial. O tratamento foi realizado por um especialista em Periodontia, em intervalo de 24 horas, por meio de raspagem (supragengival e subgengival) e alisamento radicular de todos elementos dentários com comprometimento periodontal, utilizando-se instrumentos manuais (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos. A instrumentação foi realizada quadrante por quadrante, ao término do procedimento foi verificado a adequada limpeza e alisamento radicular com auxílio de uma sonda exploradora.

Os indivíduos receberam profilaxia profissional quinzenal até três meses após o término da TPnC. Nas visitas periódicas de controle e avaliação, a cooperação do paciente para com o estudo foi monitorada, verificando-se o estado de higiene bucal.

3.12 Protocolo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

Após o completo debridamento mecânico subgengival, as bolsas periodontais dos dentes selecionados para receber a TFDa foram irrigadas com soro fisiológico. Em seguida, a aplicação do fotossensibilizador cloridrato de fenotiazina na concentração de 10mg/mL (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria) foi realizada partir do fundo da bolsa até a margem gengival. Após 1 minuto, foi realizada irrigação abundante das bolsas periodontais com soro fisiológico para remoção dos excessos do corante. A área corada foi irradiada com laser de diodo (Helbo Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria) com comprimento de onda de 660 nm e potência de 70 mW, por meio de uma sonda de fibra óptica de 0,6 mm de diâmetro (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria). A irradiação com laser foi realizada em seis sítios de cada dente selecionado, totalizando 1 minuto por elemento dentário, ou o equivalente a 10 segundos por sítio (densidade de potência 28mW/cm^2 , fluência por sítio = $2,79\text{ J/cm}^2$, fluência por dente = 16.72 J/cm^2). Os dentes adjacentes aos dentes selecionados

receberam o mesmo protocolo de TFDa. As aplicações da TFDa foram repetidas com o mesmo método até a segunda semana nos dias +2, +7 e +14. Imediatamente antes das aplicações, foi realizada a remoção mecânica da placa supragengival com a utilização de curetas (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) estéreis. Um procedimento *sham* foi realizado concomitantemente nos dentes contralaterais selecionados que não receberam a TFDa (grupo controle). Nos dentes do lado controle, as bolsas periodontais foram irrigadas com soro fisiológico e a aplicação do laser foi simulada.

Figura 2. Lado teste selecionado aleatoriamente; B) Aplicação do fotosensibilizador (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems) na concentração de 10mg/ML; C) Irrigação com soro fisiológico para remoção do excesso do fotosensibilizador; D) Ativação do laser diodo em 6 pontos por elemento dentário (660nm, 70mw, 10s por ponto) com ponta de fibra óptica de 0,6mm de diâmetro (Helbo 3D Pocket Probe, Helbo Photodynamic Systems).

3.13 Análise estatística dos dados obtidos

Todas as análises foram realizadas com o *software* GraphPad Prisma (GraphPad Prisma, La Jolla, CA, USA). O paciente foi considerado a unidade estatística (n=20). O nível de significância foi determinado em 5% ($p < 0,05$). A normalidade e homocedasticidade dos

dados obtidos foram verificados pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As comparações inter e intra-grupos nos diferentes intervalos de tempo foram realizadas por meio de testes paramétricos ou não-paramétricos de acordo com a distribuição dos dados.

3.13.1 Parâmetros Clínicos

A média e o desvio padrão de PS e NCI foram calculados para cada paciente de cada par de dentes selecionados nos diferentes grupos (Teste e controle) e tempos experimentais (baseline, dia 0, dia 30 e dia 90). Foram calculadas as frequências absoluta e relativa em cada paciente para SS, SM e IP. As diferenças intra-grupo e inter-grupo de PS e NCI para os diferentes tempos experimentais foram avaliados pela Análise de variância a dois critérios. As diferenças intra e inter-grupos para SS, SM e IP foram avaliadas pelo teste de Friedman e Teste exato de *Fisher*, respectivamente. As bolsas periodontais residuais e necessidade de cirurgia de acesso foram analisadas com teste de *Fisher*.

3.13.2 Parâmetros Imunológicos

Os níveis finais das citocinas avaliadas foram obtidos pela razão entre os valores indicados pelo sistema MAGPIX® (pg/mL) e os valores de proteína total (mg/mL). Para cada paciente foi calculada a média e desvio padrão dos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-10 de cada amostra nos diferentes grupos (teste e controle) e tempos experimentais (dia 0, 14, 30 e 90). A proporção dos níveis de citocinas obtidos em pg/mg foram agrupados de acordo com a PS obtida no *dia 0* (PS=5-6mm – bolsas moderadas; PS $\geq$ 7mm – bolsas profundas). As diferenças entre os grupos para os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-10 foram calculadas pelo teste de *Wilcoxon* e as diferenças intragrupo foram calculadas com teste de *Kruskal Wallis*.

3.13.3 Parâmetros microbiológicos

A quantidade de cada espécie bacteriana avaliada foi calculada pela transformação dos escores obtidos na leitura dos filmes radiográficos após a realização do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em valores absolutos: escore 1 = 10.000 células; escore 2 = 100.000 células; escore 3 = 500.000 células; escore 4 = 1.000.000 células; e escore 5 = 10.000.000

células. Em cada paciente, foi calculada a média das contagens bacterianas para cada amostra de placa bacteriana subgengival. Foi calculada, então, a contagem média de cada espécie nos diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, dia 0, 30, 90). Os dados foram também agrupados em complexos, os quais foram descritos por Socransky *et al.* (Socransky *et al.*, 1998). As diferenças entre os grupos teste e controle para contagens médias de cada espécie bacteriana foram avaliadas pelo Teste de *Wilcoxon*. Diferenças intergrupos foram avaliadas pelo teste de *Kruskal Wallis*. As análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, conforme descrito por Socransky *et al.* (1991). Resumidamente, foi computado um valor geral de *p* conforme as seguintes fórmulas: i) $1-(1-k)^{42}$ para espécies orais; ii) $1-(1-k)^{25}$ para espécies não periodontais, sendo *k* o valor de *p* estabelecido para o presente estudo (0,05). Dessa forma, valores de $p < 0,0012$ e valores de $p < 0,002$ foram considerados estatisticamente significantes para as espécies orais e não orais, respectivamente.

4 RESULTADOS

O presente estudo foi realizado no período de agosto de 2014 à Julho de 2017. O fluxograma apresentado da Figura 2 demonstra os indivíduos selecionados para compor a amostra do estudo. Inicialmente foram selecionados 22 indivíduos dos 332 recrutados para o estudo. Foram perdidos 2 pacientes durante as avaliações devido a utilização de antibióticos.

Figura 3 . Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo.

As características demográficas dos pacientes selecionados estão apresentadas na Tabela 2. Nenhum efeito adverso foi observado com a utilização da TFDa durante e após o tratamento, também não foi relatado complicações. No *baseline* foi verificado os níveis médios de cotinina na saliva e o número de cigarros consumidos por dia com valores de 478,94 ng/ml e 19, respectivamente (Figura 4).

Tabela 2. Características demográficas dos pacientes; DP= Desvio Padrão.

Variáveis	Todos	Grupos experimentais	
	Média ± DP	Teste	Controle
Gênero (% feminino)	70		
Idade	47.8 ± 5.68		
Quantidade de cigarros/dia	19 ± 5.75		
Nº de Dentes selecionados	94	48	46

Figura 4. Concentração de cotinina na saliva e número de cigarros consumidos por dia no baseline.

4.1 Monitoramento Clínico

As médias e desvio padrão da PS e NCI podem ser observados na tabela 3. Em geral, para os parâmetros clínicos avaliados não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparado o grupo teste e controle ($p > 0,05$). Ambos os grupos apresentaram reduções estatisticamente significantes na PS aos 30 e 90 dias quando comparado ao *baseline* para bolsas moderadas ($p < 0,05$).

Tabela 3. PS e NCI no grupo teste e controle nos diferentes tempos e resultados das comparações intra e inter-grupos.

Variável	Tempo	Grupos experimentais (média $\pm$ DP)		Comparações inter-grupos		
PS (mm)		Controle (n=20)	Teste (n=20)	Diferenças entre Médias	95% IC	P
Bolsas Moderadas	Baseline	5,33 $\pm$ 0,43	5,17 $\pm$ 0,45	0,1600	-0,4426 a 0,7626	ns
	Dia 0	5,35 $\pm$ 0,37	5,06 $\pm$ 0,75	0,2900	-0,3126 a 0,8926	ns
	Dia 30	4,33 $\pm$ 0,90*	3,81 $\pm$ 0,85*	0,5200	-0,08264 a 1,123	ns
	Dia 90	4,13 $\pm$ 1,09*	3,87 $\pm$ 0,86*	0,2600	-0,3426 a 0,8626	ns
Bolsas Profundas	Baseline	7,27 $\pm$ 0,43	7,29 $\pm$ 0,95	-0,02000	-1,523 a 1,483	ns
	Dia 0	6,38 $\pm$ 0,94	6,86 $\pm$ 1,77	-0,4800	-1,983 a 1,023	ns
	Dia 30	6,17 $\pm$ 1,62	6,64 $\pm$ 1,49	-0,4700	-1,973 a 1,033	ns
	Dia 90	5,50 $\pm$ 1,11	5,14 $\pm$ 1,06*	0,3600	-1,143 a 1,863	ns
NCI (mm)						
Bolsas Moderadas	Baseline	5,34 $\pm$ 0,95	5,25 $\pm$ 0,59	0,09000	-0,7231 a 0,9031	ns
	Dia 0	5,21 $\pm$ 0,98	5,26 $\pm$ 0,44	-0,05000	-0,8631 a 0,7631	ns
	Dia 30	4,47 $\pm$ 1,32	4,41 $\pm$ 1,18*	0,06000	-0,7531 a 0,8731	ns
	Dia 90	4,53 $\pm$ 1,18	4,40 $\pm$ 1,16*	0,1300	-0,6831 a 0,9431	ns
Bolsas Profundas	Baseline	7,47 $\pm$ 0,67	7,59 $\pm$ 1,02	-0,1200	-1,228 a 0,9876	ns
	Dia 0	7,15 $\pm$ 0,87	7,42 $\pm$ 0,96	-0,2700	-1,378 a 0,8376	ns
	Dia 30	5,92 $\pm$ 1,53*	6,64 $\pm$ 1,13	-0,7200	-1,828 a 0,3876	ns
	Dia 90	5,70 $\pm$ 1,46*	5,87 $\pm$ 1,31*	-0,1700	-1,278 a 0,9376	ns

* P < 0,05 comparado com o baseline (ANOVA a dois critérios, teste *post hoc* de Bonferroni) ns = não significativo

O NCI aos 90 dias, no grupo de bolsas moderadas, reduziu significativamente quando comparado ao *baseline* no grupo teste ($p < 0,05$), enquanto o grupo controle não mostrou diferenças significantes na comparação intragrupo ($p > 0,05$). Para Bolsas Profundas foi observada redução estatisticamente significativa da PS aos 90 dias apenas no grupo teste quando comparado ao *baseline* ($p < 0,05$), enquanto que para o NCI ambos os grupos apresentaram diferenças significativas aos 90 dias após o tratamento periodontal quando comparados ao *baseline* ($p < 0,05$).

Em relação ao SM, foi observado um aumento na frequência de sítios com SM no grupo controle e diminuição no grupo teste aos 90 dias quando comparado ao *baseline*, no entanto sem diferença estatisticamente significativa. Para os parâmetros de SS e IP foram observados redução em ambos os grupos quando comparados ao *baseline* (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência absoluta e relativa para SM, SS, IP nos grupos teste e controle e resultado das comparações intragrupo (Teste de *Fisher's*) e intergrupos (Teste de *Friedman*).

Variável	Grupos Experimentais (número [%])		Teste de <i>Fisher's</i>	
SM	Controle (n=20)	Teste (n=20)	Risco Relativo	P
Baseline	8 (14,54)	11 (19,64)	1,213	ns
Dia 0	12 (24)	9 (17,30)	0,8418	ns
Dia 30	11 (20)	12 (21,42)	1,045	ns
Dia 90	10 (20,40)	8 (16)	0,6201	ns
SS				
Baseline	36 (65,45)	40 (71,42)	0,8726	ns
Dia 0	36 (70,58)	44 (84,61)	1,449	ns
Dia 30	21 (31,18)	25 (44,65)	1,146	ns
Dia 90	26 (53,06)	31 (62)	1,201	ns
IP				
Baseline	39 (70,90)	38 (67,85)	1,073	ns
Dia 0	27 (52,94)	23 (44,23)	0,4329	ns
Dia 30	24 (44,44)	19 (33,92)	1,250	ns
Dia 90	12 (25)	17 (34)	0,3803	ns

ns= não significativo

As bolsas periodontais residuais e o número de pacientes identificados com necessidade de cirurgia de acesso aos 90 dias após o tratamento estão apresentados na tabela 5. Não foram observadas diferenças significativas entre grupos na frequência de bolsas periodontais residuais ($p > 0,05$). O percentual de pacientes que necessitaram de cirurgia após o tratamento foi de 45% no grupo controle e 40% no grupo teste.

Tabela 5. Bolsas residuais e número de pacientes com necessidade de cirurgia de acesso 90 dias após o tratamento (%). Teste de *Fisher*.

Variável	Controle n (%)	Teste n (%)	Risco Relativo	p
Bolsas residuais $\geq$ 5mm	(15) 30,61	(13) 26	0,5459	ns
Nº de pacientes com necessidade de cirurgia de acesso	(9) 45	(8) 40	1,109	ns

ns = Não significativo

4.2 Monitoramento Imunológico

A figura 5 demonstra os níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 considerando a estratificação em bolsas moderadas e profundas dos valores obtidos no dia 0. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo teste e controle no dia 0 para os níveis de citocinas avaliados ($p>0,05$).

Bolsas periodontais moderadas

No período experimental de 14 dias foi observado um aumento significativo dos níveis de IL-1 β no grupo teste e controle quando comparado com o dia 0 ($p<0,05$), no entanto sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todos os tempos avaliados para esta citocina ($p<0,05$).

Para os níveis de IL-10 foi observada diferença estatisticamente significativa aos 30 dias na comparação entre grupos ($p<0,05$), com maiores valores para o grupo teste. Aos 90 dias não foi observada diferença significativa entre grupos nos níveis de IL-10 ($p>0,05$). Os níveis de IL-10 aos 30 e 90 dias foram comparáveis ao baseline, sem diferença significativa ($p>0,05$).

Em relação aos níveis de TNF- α foi observado diferença estatisticamente significativa aos 30 dias com níveis mais elevados para o grupo teste, no entanto os níveis de TNF- α aos 90 dias não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na comparação inter-grupos ($p>0,05$).

Bolsas periodontais profundas

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos diferentes tempos experimentais intra e intergrupo para bolsas profundas ($p>0,05$).

Figura 5. Média e desvio padrão dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α (pg/mg) nos grupos teste e controle no dia 0, dia 14, dia 30 e dia 90 após a raspagem e alisamento radicular para bolsas moderadas (A,C e E) e profundas (B, D e F). (*) $p < 0,05$ quando comparado ao dia 0, Teste de *Kruskal Wallis*; (†) Diferença estatisticamente significativa entre grupos no mesmo tempo experimental, Teste de *Wilcoxon*.

4.3 Monitoramento Microbiológico

A média de contagem de cada uma das 40 espécies bacterianas avaliadas nos diferentes tempos experimentais do grupo teste e controle está representada na Figura 6. De maneira geral, os indivíduos apresentavam alta contagem de patógenos periodontais como espécies do complexo laranja e vermelho no baseline. Foi observada diminuição estatisticamente significativa aos 30 dias para *F. Periodonticum*, *P. Gingivalis* e *T. Forsythia* em ambos os grupos ($p < 0,05$).

A figura 7 apresenta as frequências relativa média dos complexos microbianos no grupo teste e controle nos diferentes tempos experimentais e resultados de comparações intra e inter-grupos. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos foram observadas no baseline para os complexos laranja e verde ($p < 0,05$). Foi observado aumento na proporção média de bactérias do complexo azul aos 90 dias em ambos os grupos quando comparados ao baseline, no entanto sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A proporção média de bactérias do complexo vermelho diminuiu em ambos os grupos no dia 90, sem diferenças significantes quando comparadas ao *baseline* ($p > 0,05$). Aos 30 dias as bactérias do complexo vermelho apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparado ao *baseline* ($p < 0,05$). Aos 90 dias foi observado aumento significativo na contagem média de bactérias do complexo verde ($p < 0,05$).

Figura 6. Média da contagem das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival nos diferentes tempos experimentais e nos grupos controle e teste. (*) Diferenças significantes entre tempos intra-grupo ($p < 0,05$). Teste de *Wilcoxon*.

Figura 7. Gráficos em pizza com as proporções médias de cada complexo microbiano no *baseline*, dia 0, dia 30 e Dia 90 após o tratamento no grupo teste e controle. As cores representam os diferentes complexos microbianos (Socransky et al., 1998). (*) Diferenças significantes quando comparado com o baseline, teste de *Kruskal Wallis*. (†) Diferença significante entre grupos no mesmo tempo experimental. Teste de *Wilcoxon* ($p < 0.05$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo de ensaio clínico controlado aleatorizado foi elaborado com a proposta de avaliar a eficácia da TFDa adjuvante à RAR no tratamento não cirúrgico da periodontite crônica em indivíduos fumantes. Estudos clínicos semelhantes foram publicados (Queiroz *et al.*, 2015; Al-Zahrani e Austah, 2011) no entanto, este é o primeiro estudo com TFDa em aplicações múltiplas (0, 2, 7 e 14) no tratamento da periodontite crônica em fumantes sem antibioticoterapia. Os resultados clínicos, microbiológicos e imunológicos demonstraram que o uso da TFDa adjuvante a RAR, com repetidas aplicações, não apresentou benefícios adicionais em indivíduos fumantes 90 dias após o TPnC.

O efeito do TFDa no resultado primário de NCI não apresentou diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre os grupos teste e controle, assim como para os resultados de PS, SM, SS e IP aos 30 e 90 dias após o tratamento periodontal não cirúrgico. Queiroz *et al.*, (2013) avaliaram a eficácia da TFDa com aplicação única, associada a RAR em fumantes, e corroborando com este estudo também não encontrou diferenças significativas para os parâmetros clínicos nas comparações entre o grupo teste e controle. Apesar dos efeitos negativos do cigarro na cicatrização periodontal (Kinane e Chestnutt, 2000), ambos os tratamentos apresentaram diferenças significativas nas comparações entre os tempos experimentais, demonstrando a melhora dos parâmetros clínicos aos 90 dias com relação ao *baseline*.

Em contrapartida com este estudo, Al-Zahrani e Austah, 2011 realizaram um ensaio clínico aleatorizado e controlado em fumantes, com métodos semelhantes e observaram redução estatisticamente significativa para PS e NCI nas comparações entre o grupo teste e controle, todavia os parâmetros relacionados à terapia a laser, como fluência de energia, potência e duração da aplicação de luz não foram relatados. As características relacionadas ao laser são informações importantes por influenciar a quantidade real de energia liberada durante o processo de aplicação, podendo afetar potencialmente a eficácia antimicrobiana e, portanto, a resposta anti-inflamatória ao tratamento periodontal (Street *et al.*, 2010; Akram *et al.*, 2016). Outros fatores, como a presença de sangue e alta concentração de proteína também pode comprometer sua ação (Meisel e Kocher 2005). É importante ressaltar que o presente estudo utilizou o paciente como a unidade experimental, e não os sítios afetados com a doença, o que também poderia influenciar significativamente na detecção de diferenças estatísticas.

Os resultados da análise de subgrupos de uma revisão sistemática relacionada aos efeitos clínicos da terapia fotodinâmica adjuvante a RAR revelaram impacto negativo do tabagismo sobre a eficácia clínica da terapia no tratamento da periodontite crônica (Xue *et al.*, 2017). Comparações com outros estudos são difíceis de serem realizadas devido à alta heterogeneidade das amostras, principalmente por incluírem ao mesmo tempo fumantes e não fumantes, entre outros fatores relacionados às características dos lasers que tornam complicado a interpretação dos resultados de meta-análises. Apesar da TDFa com aplicações múltiplas e adjuvante a RAR não apresentar resultados clínicos significativos quando comparado ao grupo controle em fumantes, esse mesmo protocolo de múltiplas aplicações quando utilizado em indivíduos com diabetes tipo II e periodontite agressiva, demonstrou resultados significativamente melhores que apenas o tratamento com RAR (Moreira *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2016).

O hábito de fumar e algumas doenças sistêmicas são fatores de risco relevantes para a periodontite crônica que influenciam consideravelmente a resposta das intervenções periodontais (Joaquim *et al.*, 2017, Ganesan *et al.*, 2017). O cigarro e diabetes são fatores modificadores da doença periodontal que afetam de maneira única o meio subgengival, enquanto que o cigarro leva a vasoconstrição periférica e diminuição da permeabilidade vascular, a hiperglicemia aumenta os níveis de glicose, a permeabilidade vascular e os níveis de metaloproteinases da matriz, citocinas e moléculas de adesão (Ganesan *et al.*, 2017). Alguns aspectos devem ser considerados com os achados do presente estudo, como por exemplo, os efeitos negativos do tabagismo no desafio bacteriano (Haffajee e Socransky, 2001; Kumar, 2012), a reduzida resposta imuno-inflamatória desses indivíduos, (Boström *et al.*, 1998) e o distúrbio no equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes que esgota capacidade antioxidante endógena sistêmica (Akpınar *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo demonstraram menor porcentagem de bolsas periodontais residuais no grupo teste, mas sem diferença estatisticamente significativa aos 90 dias após o tratamento. Bolsas residuais representam nichos bacterianos que podem atuar como foco de reinfecção (Matulienė *et al.*, 2008). Deve-se enfatizar que a ausência de sítios com DP $\geq$ 5 mm após o tratamento é um importante desfecho clínico da terapia periodontal (Matulienė *et al.*, 2010). A TFDa em múltiplas aplicações foi avaliada no tratamento periodontal em bolsas residuais, demonstrando redução significativa na PS e sangramento (Lulic *et al.*, 2009), no entanto a maioria

dos indivíduos avaliados não eram fumantes. Bolsas periodontais residuais permanecem sendo um desafio no tratamento periodontal, uma vez que várias sessões de RAR podem não resolver com sucesso esse problema (Jenkins *et al.*, 2000). Estudos futuros devem ser realizados para demonstrar se a TFDa é eficaz na descontaminação de superfícies radiculares no tratamento periodontal cirúrgico em fumantes.

Considerando os achados imunológicos do presente estudo, foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos no período experimental de 30 dias para IL-10 e TNF- α , no entanto os resultados foram semelhantes em ambos os grupos no dia 90, indicando que a TFDa não apresentou efeito adicional sobre as citocinas pró-inflamatórias em fumantes. Resultados conflitantes foram relatados em relação ao mapeamento sítio-específico de marcadores inflamatórios em fumantes com periodontite crônica (Johannsen *et al.*, 2014). A maioria dos estudos relatou diminuição da expressão local de algumas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em fumantes (Rawlinson *et al.*, 2003; Tymkiw *et al.*, 2011). Por outro lado, expressões elevadas de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias também foram relatadas em fumantes (Giannopoulou *et al.*, 2003). A deficiência na resposta imunológica do hospedeiro após o tratamento pode ser devido a alterações na função dos leucócitos polimorfonucleares, tais como quimiotaxia e fagocitose que são diminuídas por substâncias presentes na fumaça do cigarro. (Sasagawa *et al.*, 1985; Nociti *et al.*, 2015).

Considerando os parâmetros microbiológicos, foi observado redução significativa da contagem média das bactérias *F periodonticum*, *p. gingivalis* e *T forsythia* aos 30 dias para ambos os grupos, no entanto aos 90 dias os valores médios para essas bactérias foram semelhantes ao *baseline*. Feres *et al* (2015) compararam o padrão de recolonização em fumantes e não fumantes após a RAR, concluíram que indivíduos fumantes são mais susceptíveis ao reestabelecimento de uma flora subgengival mais patogênica. Acredita-se que o tabagismo poderia contribuir para uma menor redução de micro-organismos e restabelecimento mais rápido do biofilme patogênico subgengival após terapia periodontal (Renvert *et al.*, 1998), esse fato poderia explicar a resposta clínica negativa frequente dos fumantes mesmo após o tratamento com aplicação múltipla da TFDa adjuvante a RAR.

Queiroz *et al.*, 2014 também investigaram os efeitos microbiológicos da TFDa em aplicação única e adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico em fumantes, e observaram que nenhum dos tratamentos (RAR ou RAR + TFDa) foram capazes de reduzir os níveis da contagem de 40 espécies bacterianas, semelhantes as avaliadas no presente

estudo. Uma variedade de mecanismos foi proposta para explicar a influencia do tabagismo na resposta bacteriana, incluindo os componentes nocivos do cigarro que alteram a composição bacteriana oral, influenciando o nível de oxigenação e, consequentemente o crescimento de bactérias aeróbias benéficas (Lee *et al.*, 2012). Além disso, também podem provocar danos as células envolvidas na proteção do ambiente periodontal, tais como neutrófilos, que poderiam ser afetados pela formação de produtos finais de glicosilação avançada pelo fumo (Eggert *et al.*, 2001).

Os resultados deste estudo fornecem evidências adicionais de que os fumantes demonstram comprometimento da função antimicrobiana, o que é consistente com o maior nível de patógenos periodontais e com a gravidade da doença periodontal, mesmo após o tratamento com TFDa em múltiplos episódios. Desta forma, o uso de antibióticos pode ser necessário no tratamento não cirúrgico de fumantes. Estudos clínicos observaram que a administração sistêmica de antibióticos como adjuvantes ao tratamento periodontal não cirúrgico promove benefícios em fumantes (Matarazzo *et al.*, 2008; Assem *et al.*, 2017). Uma revisão sistemática com meta-análise que avaliou o efeito de antibióticos sistêmicos no tratamento periodontal de fumantes mostrou que a antibioticoterapia sistêmica favorece a redução de CAL e PD quando comparada com apenas a SRP, porém parece ter pouca relevância clínica, com resultados modestos, embora estatisticamente significativos (Assem *et al.*, 2017). Deve-se levar em consideração que mesmo quando antibióticos sistêmicos são utilizados em fumantes, o efeito da terapia periodontal na redução de sítios residuais é menor quando comparado a não fumantes com periodontite crônica (Faveri *et al.*, 2014; Chambrone *et al.*, 2016).

No presente estudo, não houve efeitos adversos associados ao uso da TFDa em múltiplos episódios, o que está de acordo com estudos prévios realizados (Moreira *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2016). A compreensão de que a TFDa não promoveu benefícios adicionais ao RAR em fumantes é um passo importante no desenvolvimento de terapias específicas para esse grupo de risco para periodontite. Ensaios clínicos aleatorizados são necessários para avaliar terapias adjuvantes à RAR no tratamento periodontal em fumantes. Outras terapias adjuvantes como suplementação de antioxidantes combinada com TFDa podem ser úteis para melhorar a resposta ao tratamento periodontal não cirúrgico em fumantes por reduzir o estresse oxidativo. O uso de probióticos em combinação com TFDa também poderia ajudar no controle da doença periodontal.

6 CONCLUSÃO

A utilização da TFDa em aplicações múltiplas como alternativa aos antibióticos sistêmicos e adjuvantes do tratamento periodontal não cirúrgico não forneceu benefícios clínicos adicionais no tratamento da periodontite crônica em fumantes. Os resultados microbiológicos e imunológicos no tempo experimental de 90 dias foram semelhantes ao grupo que realizou apenas RAR. Outros estudos com terapias associadas à TFDa e adjuvantes ao tratamento periodontal cirúrgico devem ser avaliadas em fumantes.

REFERÊNCIAS

- Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. **J Periodontol** 1988, 59:222-30.
- Ainamo J, Bay I. Periodontal indexes for and in practice. **Tandlaegebladet** 1976, 80:149-152.
- Albandar JM. Adjunctive antibiotics with nonsurgical periodontal therapy improve the clinical outcome of chronic periodontitis in current smokers. **J Evid Based Dent Pract**. 2012 Sep;12(3 Suppl):63-6.
- Akpınar, A., Toker, H., Özdemir, H, Bostancı, V e Aydın, H. The effects of non-surgical periodontal therapy on oxidant and anti-oxidant status in smokers with chronic periodontitis. **Arch Oral Biol** 2013, 58, 717-23.
- Al-Zahrani MS, Austah ON. Photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing in treatment of chronic periodontitis in smokers. **Saudi Med J** 2011, Nov;32(11):1183-8.
- Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **J Clin Dent** 2007, 18:34-8.
- Angaji M, Gelskey S, Nogueira-Filho G, Brothwell D. A systematic review of clinical efficacy of adjunctive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. **J Periodontol** 2010 Nov;81(11):1518-28.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions **Ann Periodontol** 1999, 4:1-6.
- Assem, N.Z., Alves, M.L.F., Lopes, A.B., Gualberto, E.C. Jr, Garcia VG & Theodoro LH. Antibiotic therapy as an adjunct to scaling and root planing in smokers: a systematic review and meta-analysis, **Braz Oral Res** 2017, 3, 31:e67.
- Balata ML, de Andrade LP, Santos DB, Cavalcanti AN, Tunes Uda R, Ribeiro Édel P, Bittencourt S. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Appl Oral Sci** 2013, Mar-Apr;21(2):208-14.
- Bartold PM, van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontology 2000** 2013, 62(1): 203-17.

- Bass CC. An effective method of personal oral hygiene: part II. **J La State Med Soc** 1954;106:100-12.
- Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. **Oral Microbiol Immunol** 2008 23:425-431.
- Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/ photodynamic therapy: Six-month study. **Head Face Med** 2012, 8:12.
- Bergstrom J. Periodontitis and smoking: an evidence-based appraisal. **J Evid Based Dent Pract** 2006, 6(1): 33-41.
- Bergstrom J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. **Odontology** 2004; 92: 1-8.
- Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **J Clin Periodontol** 2008, 35:877-84.
- Carvalho LH, D'Avila GB., Leao A, Gonçalves C, Haffajee AD, Socransky SS; Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II. microbiological results. **J Clin Periodontol** 2005, 32, 406-11.
- Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. **J Clin Periodontol** 2008, 79:1638-44.
- Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Risk Indicators for Increased probing depth in an isolated population in Brazil. **J Periodontol** 2008;79:1726-34.
- Cugini MA., Haffajee AD., Smith C., Kent RL Jr, Socransky, SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. **J Clin Periodontol** 2000, 27, 30-6.
- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. **J Periodontol** 2007, Jun;78(6):965-73.

- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes Jr. AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba Jr. M, Scombatti SLS, Ribeiro FJ. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. **J Periodontol** 2009, 80:98-105.
- Dilsiz A, Canakci V, Aydin T. Clinical effects of potassium-titanyl-phosphate laser and photodynamic therapy on outcomes of treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol** 2013, Mar;84(3):278-86.
- Do Nascimento C, Barbosa RES, Issa JPM, Watanabe E, Yoko Ito I, Monesi N & Albuquerque Junior RF. The use of fluorescein for labeling genomic probes in the Checkerboard DNA-DNA hybridization method. **Microbiol Res** 2008,163: 403–7.
- Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CW. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. **J Clin Periodontol** 2001, 28:437-45.
- Faveri M, Rebello A, de Oliveira DR, Borges Jr I, Duarte P.M., Figueiredo, L.C. & Feres, M. Clinical and microbiologic effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized chronic periodontitis: smokers versus non-smokers. **J Periodontol** 2014, 85, 581-91. doi: 10.1902/jop.2013.130278.
- Feres M, Bernal M, Matarazzo F, Faveri, M, Duarte PM, Figueiredo LC Subgingival bacterial recolonization after scaling and root planning in smokers with chronic periodontitis. **Aust Dent J** 2015 Jun;60(2):225-32.
- Feres M, Haffajee AD., Allard K, Som S, Goodson JM; Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. **J Clin Periodontol** 2002, 29, 724-35.
- Fredriksson MI, Figueredo CM, Gustafsson A, Bergström KG, Asman BE. Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute-phase proteins. **J Periodontol**. 1999 Nov;70(11):1355-60.
- Ganesan SM, Joshi V, Fellows M, Dabdoub SM, Nagaraja HN, O'Donnell B, Deshpande NR, Kumar PS. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. **ISME J** 2017 Sep;11(9):2075-2089.

- Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, Xie Y, Liu D. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. **Photomed Laser Surg** 2011 29:33–7.
- Gelskey SC. Cigarette smoking and periodontitis: methodology to assess the strength of evidence in support of a causal association. **Community Dent Oral Epidemiol** 1999; 27: 16-24.
- Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. **Periodontology 2000** 2013; 62: 59-94.
- Grossi SG., Goodson JM., Gunsolley JC., Otomo-Corgel J., Bland PS., Doherty, F, Comiskey J. Mechanical therapy with adjunctive minocycline microspheres reduces red-complex bacteria in smokers. **J Periodontol** 2007, 78:1741–50.
- Guglielmetti MR, Rosa EF, Lourenção DS, Inoue G, Gomes EF, De Micheli G, Mendes FM, Hirata RD, Hirata MH, Pannuti CM. Detection and quantification of Periodontal Pathogens in smokers and never-Smokers with Chronic Periodontitis by Real-Time Polymerase Chain Reaction. **J Periodontol** 2014 May 2.
- Güntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klingerm G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. **J Periodontal Res** 2006, 184-8.
- Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley J. C. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. The American Academy of **Ann Periodontol** 2003, 8, 115-81.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000** 1994, 5:78-111.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: Introduction. **Periodontol 2000** 2005 38:9-12.
- Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. **J Clin Periodontol** 2001, 28, 377-88.
- Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. **J Clin Periodontol** 2006; 33: 241-53.

- Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan SA. Systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. **J Clin Periodontol** 2002, 29, 136-59.
- Joaquim CR, Miranda TS, Marins LM, Silva HDP, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM. The combined and individual impact of diabetes and smoking on key subgingival periodontal pathogens in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol Res** 2018 Jun;53, 315-323.
- Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. **Periodontol 2000** 2007; 44: 178-94.
- Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. **J Periodontol** 2004, 75 (2):196-209.
- Kinane, D.F. e Chestnutt, I.G. Smoking and periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med** 2000 11, 356-65.
- Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN . Periodontal diseases. **Nat Rev Dis Primers** 2017, 22;3:17038.
- 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, 47:932-40.
- Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. **Photochem Photobiol** 2000, 72:676-80.
- Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. **J Periodontol** 2008; 79: 1560-68.
- Kumar PS. Smoking and the subgingival ecosystem: A pathogen-enriched community. **Future Microbiol** 2012, 7, 917-919.
- Labriola A, Needleman I, Moles DR. Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. **Periodontol 2000** 2005, 37:124-37.
- Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. **J Dent Res** 2012, 91: 142–149.

- Lulic M, Leiggener Gorog I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol** 2009, 36: 661-6.
- Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Eksomtramate M, Rerkyen P, Phairat B, Schaecher KE, Fukuda MM, Pichyangkul S. Cigarette smoke extract modulates human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. **J Periodontol Res** 2009 44:557-564.
- Marcacci A, Sur L. Action of the alcaloids in the vegetable and animal kingdoms (in Italian). **Arch Ital Biol** 1888;9:2-4. *Apud*: 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 Jun;78(6):965-73.
- Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Hill R, Soehren S, Fenno JC, Giannobile WV, Wang HL. Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. **J Periodontol** 2005, 76, 426–36.
- Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. **J Clin Periodontol** 2008, Oct;35(10):885-96.
- Matuliene G, Pjetursson BE, Salvi GE, Schmidlin K, Brägger U, Zwahlen M, Lang NP. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. **J Clin Periodontol** 2008, 35, 685-95.
- Matuliene G, Studer R, Lang NP, Schmidlin K, Pjetursson BE, Salvi GE, Brägger U, Zwahlen M. Significance of Periodontal Risk Assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss. **J Clin Periodontol**, 2010, 37, 191-9.
- Moreira AL, Novaes Jr AB, Grisi MF, Taba Jr M, Souza SL, Palioto DB, de Oliveira PG, Casati M.Z., Casarin RC, Messoria MR. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. **J Periodontol** 2015, 86, 376-86.
- Novaes AB Jr, Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. **Lasers Med Sci**. 2012 Mar;27(2):389-95.

- O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. **J Periodontol** 1972, 43:38.
- Pace E, Ferraro M, Siena L, Melis M, Montalbano AM, Johnson M, Bonsignore MR, Bonsignore G, Gjemarkaj M. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. **Immunology** 2008 124:401-411.
- Pallasch TJ. Antibiotic resistance. **Dent Clin North Am** 2003, 47:623-39.
- Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. **Lasers Med Sci**. 2014, Jul 24.
- Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. **J Periodontol** 2004, 75:1343-49.
- Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MP, Ribeiro AC, Ribeiro MS. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. **Photomed Laser Surg** 2011, 29:835-44.
- Queiroz AC, Suaid FA, de Andrade PF, Oliveira FS, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Palioto DB, Grisi MF, Souza SL Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. **Laser Med Sci** 2013, Jul 5.
- Ramos UD, Ayub LG, Reino DM, Grisi MF, Taba Jr M, Souza SL, Palioto DB, Novaes Jr AB. Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. **J Clin Periodontol** 2016 43, 147-55.
- Renvert S, Dahlén G, Wikström M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. **J Clin Periodontol** 1998 Feb;25(2):153-7.
- Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. **Periodontol** 2000 2007; 43: 267-77.
- Sampaio, E., Rocha, M., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Duarte, P. M., Gomes Lira, E. A. & Feres, M. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of

- generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol** 2011, 38, 838-846.
- Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J Periodontal Res** 1993,28: 204-10.
- Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono Y. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planning in human periodontitis. **J Periodontol** 1990, 61:579-84.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol** 2000 2002, 28:12-55.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. **Periodontol** 2000. 2005;38:135-87. Review.
- Soder B, Nedlich U, Jin LJ. Longitudinal effect of nonsurgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and nonsmokers with refractory periodontitis: a 5-year study. **J Periodontol** 1999, 70: 761–771.
- Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrob Agents Chemother** 1998, 42:2595- 601.
- Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, Koshy G, Romanos G, Ishikawa I Izumi Y. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and periimplant diseases. **Periodontol** 2000 2009, 51:109-40.
- Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontol** 2000 2006, 42:180–218.
- Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, Spolidório DM, de Toledo BE, Garcia VG. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. **Lasers Med Sci** 2012, 27:687-93.
- Tomar SL, Asma S.Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. **J Periodontol** 2000, 71(5):743-51.

- Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. **Periodontol** 2000 2004, 36:98–120.
- van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, Loos BG. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. **J Clin Periodontol** 2003, 30, 603–10.
- van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, Dellemijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between the Netherlands and Spain **J Clin Periodontol** 2000, 27, 79–86.
- Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol** 1992, 25:77-81.
- Xue D, Tang L, Bai Y, Ding Q, Wang P, Zhao Y. Clinical efficacy of photodynamic therapy adjunctive to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2017, 18, 119-127.
- Yamada Jr AM, Hayek RRA, Ribeiro MS. O emprego da terapia fotodinâmica na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. **RGO** 2004, 52(3):207-10.
- Zeng J, Williams SM, Fletcher DJ, Cameron CM, Broadbent JM, Shearer DM, Thomson WM. Re-Examining the Association Between Smoking and Periodontitis in the Dunedin Study With an Enhanced Analytical Approach. **J Periodontol**. 2014, Feb 20.

ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Prof Dr. Arthur Belém Novaes Júnior e Mariana Sales de Melo Soares, convidamos você, _____, a participar da pesquisa “Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com aplicações múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica em fumantes” (Parte II).

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos de um corante ativado por luz no tratamento da inflamação da gengiva em fumantes sem a utilização de antibióticos. A parte I do tratamento foi realizada em você, que consistiu na terapia básica e aplicação do laser na região sorteada, no entanto, algumas áreas permanecem com inflamação na gengiva e será necessário o tratamento cirúrgico dessas regiões (parte II do tratamento).

Será realizada anestesia local dos dentes afetados pela inflamação, em seguida será realizada a cirurgia para descontaminação mais profunda das regiões inflamadas, a aplicação do laser será feita de acordo com o sorteio realizado na parte I do tratamento, ao final serão realizados pontos (suturas). O local poderá ficar pouco inchado e você poderá sentir leve dor, mas você receberá recomendações para diminuir a chance de isso ocorrer. Além disso, será receitado após a cirurgia um remédio analgésico para diminuir a chance de inchar e para aliviar a dor. Você se compromete a contar aos pesquisadores se possui algum problema de saúde ou se já teve alguma alergia a algum material ou medicamento, pois isto é muito importante para a realização das cirurgias.

Você será acompanhado (a) por um período de 3 meses com a realização de limpezas dentárias periódicas e, por isso, garantiremos o ressarcimento de suas despesas decorrentes de seu deslocamento para participação nesta pesquisa. Ainda, informamos que você tem direito à indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra qualquer dano físico decorrente do tratamento realizado nesta pesquisa.

Os riscos que podem existir são os mesmos riscos atribuídos às pessoas que se submetem ao tratamento cirúrgico dos dentes e das gengivas, como a ocorrência de leve inchaço e dor, caso ocorra tal condições poderá ser prescrito medicações para eliminar esses desconfortos. Todos os procedimentos necessários para diminuição dos riscos existentes serão cuidadosamente observados. Caso ocorra qualquer efeito colateral resultante do tratamento você terá direito à assistência médica/odontológica gratuita que será prestada/intermediada pelos responsáveis pela pesquisa.

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

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

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

Eu, _____ após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto explico minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Declaro que li, compreendi, concordo em participar desta pesquisa, por isso assino este documento”

Sujeito da pesquisa

RG.....

Telefone.....

Endereço.....

.....

Caso tenha alguma dúvida, você poderá entrar em contato.

Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior (Pesquisador Responsável)
Av. do Café s/no., CEP: 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brasil. Departamento CBTMF
e Periodontia - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP
(16) 36023979

Mariana Sales de Melo Soares (Pesquisador)
Av. do Café s/no., CEP: 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brasil. Departamento CBTMF
e Periodontia - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP
(16) 3602-4092

Secretaria do CEP
Av. do Café s/no., CEP: 14040-904
Ribeirão Preto-SP, Brasil.
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP
Telefone: (16) 3315-0493

Anexo B – Certificado de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com aplicações múltiplas associada à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica em fumantes

Pesquisador: ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 36933014.4.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.109.153

Apresentação do Projeto:

Emenda para aprovação do CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos descritos inicialmente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos descritos inicialmente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovado a correção do parecer emitido na Plataforma Brasil

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.109.153

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado. Conforme deliberado na 204ª Reunião do CEP/FORP/USP, em 07/06/2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_888503 E1.pdf	29/05/2017 12:23:07		Aceito
Outros	relatorio_parcial_parte2.doc	24/03/2017 09:15:10	ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PARTE2.pdf	24/03/2017 09:12:53	ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR	Aceito
Outros	alterações no TCLE.docx	20/10/2014 15:07:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE3.pdf	20/10/2014 15:08:22		Aceito
Outros	Autorização infraestrutura.pdf	01/10/2014 20:08:54		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Doutorado1.docx	01/10/2014 20:07:36		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto plataforma brasil.pdf	17/09/2014 08:52:01		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 08 de Junho de 2017

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br