UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de CTBMF e Periodontia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

**Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em
aplicações múltiplas como coadjuvante ao tratamento
cirúrgico em pacientes com Periodontite Crônica Avançada.**

UISLEN BERIAN CADORE

PG.PERIO
FORP-USP

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

UISLEN BERIAN CADORE

Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como
coadjuvante ao tratamento cirúrgico em pacientes com Periodontite Crônica
Avançada.

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

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

Cadore, Uislen Berian.

Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como coadjuvante ao tratamento cirúrgico em pacientes com Periodontite Crônica Avançada. / Uislen Berian Cadore; orientador Sérgio Luís Scombatti de Souza. – Ribeirão Preto, 2018.

124 p.: il.

Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2018.

1. Periodontite Crônica. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Antimicrobiano.

CADORE, U. B. Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como coadjuvante ao tratamento cirúrgico em pacientes com Periodontite Crônica Avançada. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A ela, que é mãe, pai, porto seguro, maior exemplo e inspiração de vida.

“Você é a fonte do meu sucesso”

Mãe, te amo!

Agradecimientos

Este trabalho é fruto da dedicação, direta ou indireta, de muitas pessoas. As quais terão minha eterna gratidão por tornar real esse sonho e ciclo importante em minha vida.

Agradeço primeiramente a **Deus** por guiar meus passos dando a oportunidade de conviver com pessoas de bem e proporcionar momentos tão bons. Agradeço também, ao amigo espiritual **Don Carlos Ramirez e a todos os amigos de luz** pelos ensinamentos passados, me tornando uma pessoa melhor.

A minha mãe, **Irene Madalena Cadore** que é a mulher mais forte que conheço e meu maior exemplo de vida, pessoa e vitória. Por dedicar todo seu amor e apoio em todos os momentos e escolhas de vida. Sem você nada disso seria possível.

Agradeço também, a minha família, meu pai **Gentil Romão Darosci, Solange, Adriano, Fabiane, Luiz, Sabrina e Enzo** por estarem sempre ao meu lado com muito amor, cerveja, carne e Street Fighter.

Ao meu mentor e amigo **Prof. Dr. Emerson Alexandre Sgrott**, pelos ensinamentos na vida profissional e pessoal, muitas vezes fazendo o papel de “pai” para contribuir no meu crescimento.

Aos professores da Pós-graduação, **Arthur B. Novaes Jr., Mario Taba Jr., Marcio Grisi, Daniela Palioto e Michel Reis Messoria**, em especial ao meu orientador **Prof. Dr. Sérgio Luis Scombatti de Souza**, pela confiança no meu trabalho, oportunidades de crescimento profissional e pela amizade construída ao longo deste caminho.

A **Nayara Tiepo Niza**, aos anos que estive ao meu lado dedicando seu completo amor e me ensinando a amar novamente. Por ter me proporcionado momentos inesquecíveis e suportado momentos turbulentos em minha vida. Mas sempre dando todo o amparo em minhas escolhas e acreditando em meus sonhos. Serei eternamente grato por tudo. Te amo muito!

A toda a **família Niza**, em especial a **Meire e Edson** que me acolheram como um filho, sempre aconselhando e dando auxílio nos momentos bons e ruins de minha vida.

A “**Família Clínica Sgrott**” pelas trocas de conhecimento e contribuição no atendimento de meus pacientes nos períodos de ausência, em especial ao amigo **Luiz**

Eduardo Gamba. Não posso deixar de agradecer do fundo do meu coração a **Regina Bertasso** por todo o cuidado, amizade e apoio ao longo dessa fase.

Aos amigos do TEMS, em especial os amigos **Camila Nery, Camila Rosa, Glauce Pereira Alves, Roberta Cristina A. Azevedo, Tatiana Giunchetti e Vitor Ferraz** por todas as risadas, brincadeiras e ensinamentos trocados.

A amiga e terapeuta **Teresa Lapaz Rizo** por me ajudar no processo de autoconhecimento e superar as dificuldades com maior clareza.

Aos professores de graduação e amigos **Eduardo Matte e João Muller** por me apresentar uma Periodontia diferenciada e ensinarem a amar essa especialidade.

Aos amigos **Marilia L. Reis, Sérgio Henrique Lago, Felipe Dantas Torres, Marcos de Mendonça Invernici e Gabriel Bastos** por toda a parceria e irmandade ao longo desses anos de convivência. Me sinto eternamente grato por ter pessoas como vocês ao meu lado.

Aos amigos de Pós-graduação **Kleber Suzuki, Pedro H. Felix, Karine Figueredo, Renata Cardoso, Bárbara Masalskas, Átila Nobre, Yasmin Dal Acqua e Chistian Hernandes.**

Ao grupo de professores do curso de Especialização de Implantes CAPO, **Michel Reis Messoria, Gabriel Bastos, Luiz Fernando de Oliveira e Lâner Botrel Rosa** pela confiança de meu trabalho e companheirismo.

Aos amigos **José Gabarra Jr., Rafael Mantovani, Leandro Costa e Carlos Roberto Saliba** por todo o ensinamento e amizade construída.

Aos amigos de Brusque, em especial ao casal **Antônio Cesar Fachini e Ana Ferro** pelo ombro amigo, sinceridade, risadas e gordices.

As funcionárias da instituição **Daniela Martins, Joaninha, Milla, Fabíola, Maria Izabel, Maria Aparecida e Carla Daniela** por tornarem a nossa vida de pós-graduação muito mais simples e pelo auxílio na pesquisa.

A técnica de laboratório **Izilvania** da Universidade de Guarulhos por ter realizado a análise microbiológica.

*“Toda religião, arte e ciência são ramos de uma mesma
árvore. Todas estas experiências são enobrecimentos
voltados para a vida do homem, levantando-o da esfera
da mera existência física e elevando-o para a
liberdade”.*

Albert Einstein.

Resumo

Resumo

CADORE, U. B. **Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como coadjuvante ao tratamento cirúrgico em pacientes com Periodontite Crônica Avançada.** 2018. N° de 124 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A Periodontite é uma doença de etiologia multifatorial que acomete os tecidos de suporte dentário resultando em perda progressiva de inserção e perda óssea. Este estudo clínico controlado, aleatorizado e duplo-cego avaliou a eficácia da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), em aplicações múltiplas, como terapia adjuvante ao tratamento periodontal cirúrgico em pacientes com Periodontite Crônica Avançada (PCA). Dezesseis voluntários foram submetidos ao modelo de estudo do tipo boca dividida, recebendo tratamento de acesso cirúrgico associado a raspagem e alisamento radicular (RAR) adjunto à TFDa em protocolo de aplicação nos períodos de 0, 2, 7 e 14 dias pós-operatórios (Grupo Teste - GT), ou apenas tratamento de acesso cirúrgico associado a RAR (Grupo Controle - GC). Todos os pacientes receberam orientação de higiene oral e acompanhamento por 90 dias pós-cirúrgicos. Os seguintes parâmetros clínicos e microbiológicos foram avaliados: Nível clínico de inserção (NCI), Profundidade de sondagem (PS), Recessão gengival (RG), Sangramento à sondagem (SS), Índice de placa (IP) e contagem de 40 espécies microbianas subgengivais (*checkerboard DNA-DNA hybridization*). Os dados foram coletados nos períodos *baseline* (pré-terapia básica), 60 dias (30 dias após terapia não cirúrgica) e 150 dias (90 dias pós-cirurgia). Uma redução significativa na PS foi observada aos 150 dias para o GT, quando comparado ao GC no mesmo período ($p < 0,05$). O ganho do NCI foi significativamente maior no GT entre os tempos de 60 e 150 dias ($p < 0,05$). As mudanças da microbiota subgengival foram similares entre os grupos ($p > 0,05$), mas o Grupo Teste apresentou quantidades mais elevadas de bactérias compatíveis com saúde periodontal no período final do experimento em relação ao GC ($p < 0,05$). Concluiu-se que a utilização da TFDa em aplicações múltiplas, como terapia adjuvante ao tratamento cirúrgico periodontal, produziu melhoras significativas nos parâmetros clínicos no período de 90 dias de avaliação.

Palavras-Chave: Periodontite Crônica; Terapia Fotodinâmica; Antimicrobiano.

Abstract

Abstract

CADORE, U. B. **Multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy associated to surgical periodontal treatment in patients with chronic periodontitis.** 2018. N° de 124 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Chronic Periodontitis is a multifactorial disease which results in tooth supporting tissues loss. This double-blind randomized controlled clinical trial assessed the efficacy of multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as an adjunct to surgical periodontal treatment in patients with severe chronic periodontitis (SCP). Sixteen volunteers were selected into this Split-mouth study. They were subjected to scaling and root planning in open flaps (SRP) combined with aPDT at 0, 2, 7, and 14 postoperative days (Test Group - TG), or only SRP (Control Group – CG). All patients were instructed about oral hygiene and were followed up for 90 days after surgery. The following clinical and microbiological parameters were assessed: clinical assessment level (CAL), probing depth (PD), gingival recession (GR), bleeding on probing (BOP), plaque index (PI). Levels of 40 subgingival species were measured by checkerboard DNA-DNA hybridization at baseline, 60 (30 days after non-surgical therapy) and 150 days (90 days post-surgery). Data were collected at baseline (pre-intervention), at 60 days (30 days after the end of nonsurgical therapy), and at 150 days (90 days after surgery). A significant reduction in PD was observed at 150 days for the TG, when compared to the CG ($p < 0.05$). CAL gain was significantly higher in the TG at 60 and 150 days ($p < 0.05$). Changes in the subgingival microbiota were similar between the groups ($p > 0.05$), but the TG revealed a larger number of bacteria associated with periodontal disease at the end of the experiment compared to the CG ($p < 0.05$). In conclusion, multiple sessions of aPDT as an adjunct to surgical periodontal treatment significantly improved clinical parameters at 90 postoperative days.

Keywords: Chronic Periodontitis; Photodynamic Therapy; Antimicrobial.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1	Fluxograma do estudo	42
Figura 2	Ilustração do delineamento experimental do estudo	44
Figura 3	Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Controle: A) Incisão intra-sulcular com lâmina de bisturi nº 15c. Região de pré-molar superior; B) Área de pré-molares incisadas; C) Evidenciação de crista e defeito ósseo. Área pós remoção do tecido granulomatoso e Raspagem e Alisamento Radicular; D) Retalho reposicionado e estabilizado por suturas simples com fio mononylon 5-0.	52
Figura 4	Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Teste: A) Imagem inicial. Primeiro pré-molar superior; B) Incisão intra-sulcular com lâmina nº 15c; C) Região de pré-molares incisadas; D) Retalho total e exposição de cálculos e tecido de granulação; E) Área descontaminada e exposição do defeito ósseo; F) Aplicação do fotossensibilizador de cloridrato de fenotiazina; G) Irrigação com soro fisiológico; H) Remoção do excesso de fotossensibilizador; I) Ativação do laser diodo sobre a superfície dentária (60s por sítio); J) Sutures simples com fio mononylon 5-0.	54
Figura 5	A) Pós-operatório de 14 dias; B) Aplicação do fotossensibilizador de cloridrato de fenotiazina; C) Remoção do excesso de fotossensibilizador; D) Ativação do laser diodo sobre a superfície dentária (10s por sítio).	55
Figura 6	Contagens das médias ($\times 10^5$) de 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no baseline 60 e 150 dias pós-terapia nos dois grupos terapêuticos, bem como, os resultados das comparações intragrupos. Diferenças significativas quando comparado ao <i>baseline</i> : (Ψ) Grupo Controle – 150 dias; (£) Grupo Teste – 150 dias. Diferenças significativas quando comparado aos 60 dias (Tempo II): (¥) Grupo Controle – 150 dias; (Ω) Grupo Teste – 150 dias. (ANOVA de medidas repetidas, <i>post hoc</i> de Bonferroni, $p < 0,05$).	64

Figura 7 Frequências relativas das médias em porcentagem (%) dos complexos microbianos nos diferentes períodos experimentais. (¶) diferença significativa quando comparado aos valores do *baseline*; (2) diferença significativa quando comparado aos valores de 60 dias. (ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* de Bonferroni $p < 0,05$).

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1	Relação das cepas bacterianas avaliadas pela técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	48
Tabela 2	Características demográficas da amostra no baseline de acordo com os grupos experimentais.	60
Tabela 3	Comparação entre grupos e intragrupos das médias $\pm$ desvios padrões dos parâmetros clínicos no <i>baseline</i> , 60 dias e 150 dias.	61
Tabela 4	Comparação entre grupos e intragrupos das médias $\pm$ desvios padrões dos parâmetros clínicos no Tempo I (<i>baseline</i>), Tempo II (60 dias) e Tempo III (150 dias).	62
Tabela 5	Comparação dos deltas $\pm$ desvios padrões dos parâmetros clínicos intergrupos e intragrupo no Tempo I (<i>baseline</i>), Tempo II (60 dias) e Tempo III (150 dias).	63

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

<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>
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Gramma
g/mL	Gramma/mililitro
IC	Intervalo de confiança
IHO	Instrução de higiene oral
IP	Índice de placa
J/cm ²	Joule/centímetro ao quadrado
mg/mL	Miligramma/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
PA	Periodontite Agressiva
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pg/mL	Picograma/mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
PHO	Programa de higiene oral
PS	Profundidade de Sondagem
RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
RG	Recessão gengival
RNA	Ácido ribonucleico
SS	Sangramento à sondagem
SSC	Solução salina citratada
<i>Td</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TPnC	Terapia Periodontal não Cirúrgica
TPC	Terapia Periodontal Cirúrgica
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
UNG	Universidade de Guarulhos
USP	Universidade de São Paulo
W/cm ²	Watt/centímetro ao quadrado

µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma/mililitro
µL	Microlitro
MTZ	Metronidazol
AMX	Amoxicilina

Lista de Símbolos

Lista de Símbolos

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
CO ₂	Dióxido de Carbono
<i>g</i>	Unidade de Aceleração
H ₂	Hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
M	Concentração molar
<i>n</i>	Tamanho da amostra
N ₂	Nitrogênio
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NA ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
<i>p</i>	Probabilidade de significância

Lista de Anexos

Lista de Anexos

Anexo A -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	90
Anexo B -	Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	93
Anexo C -	Artigo científico para submissão no periódico <i>Journal of Periodontology</i>	97

Sumário

Sumário

1. Introdução e Revisão de Literatura	31
2. Proposição	39
3. Material e Métodos	41
4. Resultados	59
5. Discussão	68
6. Conclusão	75
7. Referências Bibliográficas	77
8. Anexos	88

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo B - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo C - Artigo científico para submissão no periódico

Introdução e Revisão de Literatura

Introdução e Revisão de Literatura

A Periodontite é uma doença de etiologia multifatorial que acomete os tecidos de suporte dentário. Participam da sua patogênese microrganismos e diversos fatores (genéticos, ambientais e sistêmicos) que podem modificar sua expressão e a susceptibilidade do indivíduo ao seu desenvolvimento (Offenbacher, 1996). A Periodontite é considerada uma doença imunoinflamatória que resulta na destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar, com formação de bolsa periodontal e/ou retração em resposta ao acúmulo de biofilme bacteriano (Loesche e Grossman, 2001).

Um levantamento epidemiológico realizado nos Estados Unidos da América entre os anos de 2009 a 2012 pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), mostrou que 46% dos adultos norte-americanos com 30 anos de idade ou mais possuem doença periodontal, representando 64,7 milhões de pessoas com periodontite, sendo 8,9% com periodontite severa. A prevalência de periodontite foi associada ao aumento da idade e foi maior entre os homens (Eke *et al.*, 2015).

A classificação das doenças periodontais mais utilizada atualmente foi determinada no ano de 1999, durante o *International Workshop for the Classification of the Periodontal Diseases*, organizado pela American Academy of the Periodontology (AAP) (Armitage, 1999). As diferentes formas de periodontite foram reclassificadas em três formas principais (crônica, agressiva e necrosante) e em manifestações periodontais de doenças sistêmicas.

A Periodontite Crônica (PC), é a forma mais prevalente de periodontite e a principal causa de perda dentária em indivíduos adultos (Haffajee *et al.*, 1997; Rosling *et al.*, 2001). Pode ser caracterizada de acordo com a sua extensão, em localizada (caso afete até 30% dos sítios da cavidade bucal), e generalizada (quando afeta acima de 30% dos sítios). A caracterização da periodontite crônica também pode ser feita de acordo com a severidade da doença, sendo chamada de leve, quando a perda de inserção clínica é de 1 a 2mm, moderada (de 3 a 4mm) e avançada, quando esta perda de inserção é igual ou superior a 5mm (Preshaw, 2009).

Em Periodontia, a Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) é a terapia “padrão-ouro” no tratamento da periodontite (Berezow e Darveau, 2011). Contudo, as técnicas de instrumentação para RAR nem sempre são completamente efetivas na eliminação dos depósitos mineralizados e microbianos nos casos mais severos de periodontites. Vários fatores podem influenciar na efetividade do procedimento, tais como: profundidade da bolsa periodontal, anatomia radicular, desenho dos instrumentos periodontais e habilidade do operador (Adriaens e Adriaens, 2004). A capacidade de invasão tecidual e celular exibida por alguns periodontopatógenos (Tribble e Lamont, 2010), especialmente presentes em formas avançadas da doença periodontal, também dificultam o efetivo controle da microbiota subgingival por meio da terapia de RAR. Nestas situações, a recolonização e a recorrência da doença periodontal são bastante comuns (Berezow e Darveau, 2011).

Considerando as limitações existentes da terapia de RAR isolada no tratamento de doenças periodontais avançadas, novas terapias estão sendo estudadas como um tratamento adjuvante, de forma a proporcionar melhores resultados no tratamento mecânico; tais como a administração de antibióticos ou terapias associadas a laser, dentre as quais se destaca a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) (Feres *et al.*, 2002; De Oliveira *et al.*, 2007). O uso de antibioticoterapia apresenta um número muito mais relevante de estudos controlados quando comparado aos estudos envolvendo a TFDa. Contudo, em resposta ao uso excessivo e indevido de antibióticos, levando ao aumento da resistência bacteriana e à diminuição do desenvolvimento de novos antibióticos, o Conselho para Terapia Antibiótica Apropriada e Racional (*Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy* - CARAT) desenvolveu critérios para orientar a seleção apropriada e precisa de antibióticos. Cinco critérios devem ser seguidos como guia para seleção de um regime antibiótico: uso baseado em evidências de resultados, benefícios terapêuticos, segurança ao uso, rentabilidade e dose/duração ideal do medicamento (Slama *et al.*, 2005).

Os relatos da Academia Americana de Periodontologia sugerem que pacientes com doenças periodontais avançadas são beneficiados pela terapia antimicrobiana adjuvante com antibióticos sistêmicos (Feres *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2008). Este fato é de particular importância em pacientes com Periodontite Agressiva (PA) e Periodontite Crônica Avançada (PCA), uma vez que é notória a alta prevalência de periodontopatógenos como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) e de

patógenos anaeróbios na microbiota subgengival (Takeuchi *et al.*, 2003; Kamma *et al.*, 2004; Faveri *et al.*, 2008). Contudo, é importante considerar que a utilização de antibioticoterapia sistêmica apresenta algumas desvantagens, as quais estão relacionadas, principalmente, com os efeitos colaterais indesejáveis resultantes do uso do agente antimicrobiano, como náusea, vômito, distúrbios intestinais, e também o risco aumentado do desenvolvimento de resistência bacteriana (Pallasch, 2000).

A possibilidade de resistência bacteriana ao uso de antimicrobianos sistêmicos deve ser considerada perante o uso. Um estudo realizado nos EUA avaliou, *in vitro*, os espécimes bacterianos presentes nas bolsas periodontais profundas de 400 pacientes adultos com periodontite crônica. As amostras foram cultivadas e os patógenos periodontais foram submetidos a análises de susceptibilidade aos fármacos amoxicilina, clindamicina, doxiciclina e metronidazol. No geral, 74,2% dos pacientes apresentaram patógenos periodontais subgengivais resistentes a pelo menos um dos antibióticos, e os espécimes bacterianos *Prevotella intermedia* (55%) e *A.a* (26%) foram resistentes, *in vitro*, à doxiciclina, amoxicilina, metronidazol ou clindamicina em pacientes com periodontite crônica (Rams *et al.*, 2014).

O tratamento convencional da Periodontite Crônica Avançada (PCA) baseia-se primordialmente na terapia não cirúrgica de raspagem e alisamento radicular, sendo a terapia antimicrobiana coadjuvante e intervenções cirúrgicas indicadas apenas em casos específicos. No entanto, devido às limitações encontradas no tratamento não cirúrgico, como em áreas de bifurcações, concavidades, sulcos, sítios distais de molares e bolsas periodontais profundas, torna-se necessário o uso de outras opções eficazes para alcançar melhores resultados na terapia periodontal (Ishikawa *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2008; Takasaki *et al.*, 2009).

A literatura apresenta evidências dos efeitos positivos de antibióticos sistêmicos como uma terapia adjuvante no tratamento de doenças periodontais avançadas (Feres *et al.*, 2012; Sgolastra *et al.*, 2012; Cosgarea *et al.*, 2016; Saleh *et al.*, 2016). Entretanto, o aumento crescente da resistência bacteriana justifica a busca por novas formas de tratamento que acarrete menor efeito negativo ao paciente (Ishikawa *et al.*, 2009). Assim, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa), além de não induzir resistência bacteriana, surge como um método de redução da microbiota patogênica com mínimos efeitos colaterais locais e sistêmicos.

A TFDa é uma abordagem na qual o princípio de ação se dá essencialmente pela associação de uma fonte de luz de um comprimento de onda adequado dentro da janela terapêutica (630-830nm), a um agente fotossensibilizante (corante) que quando ativado torna-se excitado, partindo do estado de oxigênio singlete para o estado de duplete ou tripleto (Azarpazhooh *et al.*, 2010). Esta mudança de estado leva a uma transferência de elétrons que reage com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio citotóxicos para as células-alvo, resultando em necrose celular e morte microbiana (Meisel e Kocher, 2005; Ishikawa *et al.*, 2009).

A utilização da TFDa como tratamento adjuvante à terapia periodontal convencional foi sugerida como uma alternativa na eliminação de periodontopatógenos na região subgengival, uma vez que foi comprovada a eficácia na morte de microrganismos no biofilme dentário por estudos *in vitro* (Chan e Lai, 2003; Wilson, 2004; Fontana *et al.*, 2009) e por estudos *in vivo* (Qin, Y. L. *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2015). Esse método de tratamento não causa danos aos tecidos do hospedeiro, pois as células eucariotas se defendem contra o ataque de radicais de oxigênio através de enzimas, como a catalase e superóxido dismutase (Stein *et al.*, 2009). O fotossensibilizador deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficiente, seletivo e minimamente tóxico aos tecidos normais (Wilson, 2004).

Com o intuito de investigar as alterações ocorridas na composição microbiológica após o tratamento com TFDa, Novaes *et al.*, em 2012, avaliaram, em um estudo clínico, controlado e de boca dividida, dez pacientes diagnosticados com periodontite agressiva submetidos a tratamento com TFDa ou terapia não cirúrgica de RAR. Amostras de biofilme subgengival foram coletadas (-7, 0 e 90 dias) e a contagem de 40 espécies subgengivais foi determinada utilizando o método *checkerboard DNA-DNA hybridization*. A TFDa foi mais eficiente que a RAR na redução do número de *Aa*. Entretanto, a RAR foi mais eficiente que a TFDa na redução de patógenos periodontais do complexo vermelho. Segundo os autores, TFDa e RAR afetam diferentes grupos de bactérias. Dessa forma a associação de ambas as terapias poderia ser benéfica para o tratamento da periodontite agressiva.

A técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi preconizada por Socransky *et al.*, (1994). Este método de diagnóstico oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana, incluindo a detecção de microrganismos de

desenvolvimento lento, nutricionalmente exigentes, além de detecção da microbiota não cultivável. É um método preciso e mais rápido que o empregado na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pois utiliza várias sondas de DNA de uma única vez, possibilitando estocar as amostras por longos períodos.

Moreira *et al.* em 2015, avaliaram, em um estudo clínico controlado, aleatorizado e do tipo boca dividida, os efeitos de aplicações repetidas de TFDa adjuvante à raspagem e alisamento radicular (RAR) em pacientes com periodontite agressiva generalizada (PAg). Vinte pacientes com PAg generalizada foram tratados com RAR associada a TFDa (aplicada em quatro períodos 0, 2, 7 e 14 dias) ou apenas RAR. Foram analisados estatisticamente os parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos em todos os pacientes. Na análise de bolsas periodontais profunda (profundidade de sondagem ≥ 7 mm), o grupo RAR + TFDa apresentou diminuição na profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica significativamente maior quando comparado ao grupo com apenas RAR no período de 90 dias. Os resultados também demonstram significativa diminuição de patógenos periodontais dos complexos vermelho e laranja e uma menor proporção de interleucina-1b / interleucina-10 no grupo que associou a RAR a TFDa.

Existem na literatura alguns estudos sobre a aplicação da TFDa em pacientes com periodontite crônica. Contudo, observa-se a inexistência de um padrão nas metodologias que incluem parâmetros que podem influenciar diretamente nos resultados como, o comprimento de onda do laser utilizado, tempo de aplicação da luz, tempo de permanência do corante no interior da bolsa e a forma como a luz é aplicada (em pontos ou em movimentos circulares).

Bassir *et al.*, em 2013, avaliaram, em um estudo clínico controlado aleatorizado duplo-cego de boca dividida, os efeitos clínicos da terapia fotodinâmica em pacientes portadores de periodontite crônica moderada e severa. Dezesseis pacientes foram submetidos a RAR, sendo que cada quadrante foi distribuído a um dos seguintes grupos de tratamento: irradiação de diodo emissor de luz (LED) (grupo 1); fotossensibilizador de azul de toluidina a 0,1 mg/ml (grupo 2); LED + fotossensibilizador (grupo 3); e apenas RAR (grupo controle). A fonte de luz utilizada neste estudo foi um LED no espectro vermelho (comprimento de onda: 625-635nm, potência de saída: 2000 mW/cm²), irradiado no interior da bolsa periodontal por 10 segundos em cada sítio, sendo o dente dividido em 6 sítios. Os tratamentos adjuntos foram repetidos após 7 e 14 dias. Os

parâmetros clínicos de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção foram mensurados no início, 1 e 3 meses após a RAR. Os parâmetros clínicos apresentaram melhoras significativas em relação ao baseline em todos os grupos, porém não houve diferenças significativas entre os grupos em qualquer intervalo de tempo. Os autores concluíram não haver efeitos adicionais nos parâmetros clínicos em pacientes diagnosticados com periodontite crônica moderada e severa em comparação com a RAR isoladamente.

Para avaliar o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana adjunta ao tratamento da periodontite crônica, Betsy *et al.*, (2014), realizaram um ensaio clínico aleatorizado e controlado. Oitenta e oito pacientes foram distribuídos aleatoriamente para receber RAR associada a TFDa (grupo teste) ou apenas RAR (grupo controle). Sendo, que os procedimentos de RAR foram realizados em 24 horas em ambos os grupos. No grupo teste, o fotossensibilizador (Azul de metileno 10 mg/ml) foi aplicado em sítios com PS ≥ 4 mm e após 3 minutos, os sítios foram irrigados com soro fisiológico e irradiados por 60s (por sítio) pelo laser de diodo (comprimento de onda: 655nm com uma potência de 60 mW/cm²). Os parâmetros clínicos foram mensurados em 2 semanas, 1, 3 e 6 meses após o tratamento. Os parâmetros de profundidade de sondagem e o nível clínico de inserção apresentaram redução estatisticamente significativa no grupo de teste na avaliação aos 3 e 6 meses, em comparação com o grupo controle. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana atua como um complemento benéfico no tratamento não cirúrgico da periodontite crônica.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da terapia adjunta no tratamento periodontal cirúrgico, Martins *et al.*, (2017), em um estudo clínico controlado aleatorizado duplo-cego do tipo boca dividida, selecionaram 20 pacientes com periodontite crônica avançada generalizada com indicações clínicas de tratamento periodontal cirúrgico. Dois dentes contralaterais foram selecionados em cada paciente para receber em um lado o tratamento periodontal cirúrgico (TPC) + TFDa (grupo teste) ou apenas TPC (grupo controle). No grupo teste, foi empregado um protocolo de única aplicação de TFDa utilizando o azul de toluidina 10 mg/ml irradiado por um laser diodo (comprimento de onda de 660nm, poder máximo de 60 mW/cm² e densidade de energia de 0,6J/cm²), pelo período de 60 segundos por sítio (6 sítios por dente). Os parâmetros clínicos e microbiológico foram avaliados nos tempos baseline, 60 e 150 dias. Os níveis de 40 espécies microbianas subgingivais foram avaliadas pelo método de análise checkerboard DNA-DNA hybridization. Aos 150

dias, houve uma redução significativa na profundidade de sondagem do grupo teste quando comparado ao grupo controle. Além disso, o grupo de teste também demonstrou redução significativa de patógenos periodontais do complexo vermelho (*Treponema denticola*).

Considerando que as bolsas periodontais profundas dificilmente são descontaminadas adequadamente com terapia não cirúrgica (Waerhaug, 1978b), torna-se necessário o advento de procedimentos complementares para alcançar resultados satisfatórios. Os procedimentos cirúrgicos de acesso para descontaminação radicular, bem como, a utilização de terapias adjuvantes como a antibioticoterapia e a TFDa são formas consideradas no tratamento das doenças periodontais. Dentre as terapias antimicrobianas apresentadas, a TFDa demonstra vantagens sobre os antibióticos pela ausência de relatos de resistência bacteriana e efeitos colaterais ao tratamento. Além disso, muitos estudos clínicos encontraram efeitos adicionais benéficos da TFDa ao tratamento periodontal não cirúrgico; entretanto, ainda há pouca evidência científica desse método terapêutico como adjuvante a tratamentos periodontais cirúrgicos (especificamente, inexistente, até o nosso conhecimento, pesquisa investigando protocolo de aplicações múltiplas associado a técnicas cirúrgicas). Assim, seria interessante a investigação da eficácia da TFDa em aplicações múltiplas no tratamento cirúrgico de doenças periodontais.

Proposição

Proposição

Objetivos Primários:

- ✓ Avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) em protocolo de múltiplas aplicações como adjuvante ao tratamento periodontal cirúrgico em pacientes diagnosticados com Periodontite Crônica Avançada.

Objetivos Secundários:

- ✓ Avaliar parâmetros clínicos (Índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção clínica) prévios e após a realização do procedimento cirúrgico combinado ou não à aplicação de TFDa;
- ✓ Avaliar a microbiota periodontopatogênica subgengival prévia e após a realização do procedimento cirúrgico combinado ou não à aplicação de TFDa.

Material e Métodos

Materiais e Métodos

3.1 Consentimento para a pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto FORP-USP (Processo nº 58437816.3.0000.5419). Conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os voluntários foram instruídos detalhadamente sobre os objetivos, benefícios, riscos e desconfortos que poderiam advir dos procedimentos do estudo.

3.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa *Graphpad Statemate* 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos nesta pesquisa foi calculado considerando-se o desvio-padrão médio dos grupos experimentais do estudo de Müller Campanile et al. (2015), considerando a diferença significativa de 1mm (δ) entre os grupos, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), desvio padrão (σ) de 1mm, as mudanças na média de PS como variável primaria e $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$. O cálculo da amostra por grupo foi baseado na formula: $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$. O número mínimo necessário foi calculado em 16 pacientes.

3.3 Seleção dos pacientes

O estudo foi do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego. A seleção dos voluntários à participação na pesquisa foi realizada na população local submetida ao atendimento da rede básica de saúde na Clínica de Periodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FORP-USP (Figura 1). Os pacientes incluídos no estudo apresentaram boa condição de saúde sistêmica, idade superior a trinta anos e ao menos 15 dentes presentes, excluindo-se terceiros molares e dentes com indicação de exodontia. O diagnóstico de Periodontite Crônica Avançada Generalizada foi

estabelecido de acordo com a atual classificação da Academia Americana de Periodontologia (Armitage, 1999) após avaliação periodontal minuciosa. Segundo a classificação, os pacientes deveriam apresentar boa condição de saúde sistêmica, perda de inserção interproximal generalizada envolvendo no mínimo dois sextantes posteriores com três ou mais bolsas acima de 5mm e indicação de terapia de acesso cirúrgico em ao menos dois sextantes posteriores contralaterais. Além disso, foram também requisitos a presença de sítios periodontais proximais apresentando profundidade de sondagem e nível de inserção clínico ≥ 5 mm e sangramento à sondagem.

Foram critérios de exclusão do estudo: história positiva de antibioticoterapia nos últimos seis meses, tratamento periodontal básico nos últimos seis meses, envolvimento sistêmico que pudesse interferir na progressão da doença ou na resposta ao tratamento, envoltimentos protéticos extensos, necessidade de profilaxia antibiótica para a realização de procedimentos odontológicos de rotina, uso de anti-inflamatórios por longo período de tempo, tabagismo e gravidez.

Figura 1: Fluxograma do estudo.

3.4 Delineamento do Estudo

Previamente ao início da pesquisa, os voluntários selecionados receberam raspagem supra gengival e instruções de higienização bucal. Além disso, procedimentos para remoção de áreas retentoras de placa e restaurações com excesso, remoção de tecido dental cariado e exodontias de dentes perdidos foram realizados. Por ser um estudo do tipo boca dividida, dois elementos dentários posteriores contralaterais, uni ou multi-radiculares, apresentando sítios periodontais interproximais com profundidade de sondagem ≥ 5 mm, foram selecionados para avaliações clínicas e microbiológicas. Em seguida, um único profissional especialista em Periodontia realizou procedimentos semanais de raspagem e alisamento radicular por quadrantes em 4 semanas. Os dentes selecionados foram alocados ao Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), por meio de uma tabela numérica aleatória gerada por site específico (<http://www.randomization.com>). Os elementos alocados ao GT foram submetidos à terapia cirúrgica de acesso com raspagem e alisamento radicular associada a TFDa utilizando o protocolo de aplicação nos períodos de 0, 2, 7 e 14 dias pós-operatórios (Ramos *et al.*, 2016). No outro grupo, foi feita a terapia cirúrgica de acesso com raspagem e alisamento radicular associada a procedimento “Procedimento Sham” com o intuito de garantir o cegamento do paciente perante o estudo, no qual foi simulada a TFDa, com o corante fotossensibilizador sendo substituído por soro fisiológico e a luz fotoativadora posicionada, mas não acionada. O controle do biofilme foi efetuado semanalmente durante os primeiros 30 dias pós-operatórios e mensalmente até completar 90 dias pós-intervenção. Os parâmetros clínicos periodontais e microbiológicos foram avaliados no *baseline* (Tempo I = período pré-intervenção), pós-terapia básica (Tempo II = reavaliação) e 90 dias após o procedimento cirúrgico (Tempo III) (representando 150 dias após o início do estudo). A Figura 2 mostra graficamente o delineamento experimental do estudo.

Um pesquisador sem envolvimento nos procedimentos clínicos e/ou coletas, foi responsável pela alocação dos elementos dentários selecionados nos devidos grupos. Esta alocação foi ocultada em envelopes lacrados, não transparentes, identificados pelo número correspondente e as iniciais do seu nome completo. A violação e o reconhecimento dos grupos só foram realizados ao fim do procedimento cirúrgico de acesso e descontaminação radicular em ambos os lados tratados do respectivo voluntário. Para que houvesse um cegamento em relação a este estudo, os exames clínicos

periodontais e coletas de biofilme subgengival foram realizados por um único examinador devidamente treinado e calibrado, o qual desconhecia os grupos experimentais do estudo. Os demais procedimentos clínicos de raspagem e alisamento radicular, terapia cirúrgica, aplicação de TFDa e controles pós-operatórios foram realizados por outro operador devidamente treinado para estas finalidades, e também, cego em relação aos grupos experimentais do estudo.

Figura 2: Ilustração do delineamento experimental do estudo.

3.5 Calibração do Examinador

Para haver uma concordância diagnóstica intra-examinador nos exames clínicos periodontais, o examinador responsável foi submetido à calibração tendo como referência o índice Kappa. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para critérios de diagnóstico, o índice aceitável de concordância de Kappa deve ser maior ou igual a 0,85 (OMS, 1997). Foram selecionados dez voluntários apresentando pelo menos 2 pares de dentes posteriores contralaterais com profundidade de sondagem ≥ 5 mm nos sítios

proximais. 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.

3.6 Monitoramento Clínico

Os seguintes parâmetros clínicos periodontais foram avaliados em 4 sítios de cada elemento dentário (mesio-vestibular, mesio-lingual, disto-vestibular e disto-lingual): Profundidade de Sondagem periodontal (PS) (mm): mensurada da margem gengival até o fundo da bolsa periodontal; Nível Clínico de Inserção (NCI) (mm): medida a partir da junção amelocementária ao fundo da bolsa periodontal; Recessão Gengival (RG) (mm): mensurada da junção amelocementária à margem gengival; Sangramento à Sondagem (SS): avaliado dicotomicamente, sendo considerado positivo a ocorrência de sangramento em até 20 segundos após a inserção da sonda milimetrada para medição da OS; Índice de placa visível (IP): avaliado dicotomicamente (O'leary *et al.*, 1972) e determinado pela porcentagem de superfícies dentárias com depósitos de placa/biofilme corados com solução evidenciadora (o score 1 foi determinado para sítios com presença de placa e o score 0 definido como ausente).

Os parâmetros clínicos periodontais e o índice de placa foram registrados no *Baseline* (Tempo I), pós-terapia básica (Tempo II) e 90 dias após a realização da intervenção cirúrgica (150 dias do início do estudo – Tempo III) em cada paciente.

3.7 Monitoramento Microbiológico

As amostras da microbiota subgengival presente nas bolsas periodontais foram coletas em três momentos distintos: *Baseline* (Tempo I), na reavaliação do tratamento periodontal básico (Tempo II), bem como, 90 dias após a realização da terapia periodontal cirúrgica (Tempo III). Os dentes selecionados foram isolados com roletes de algodão estéreis e secos com jatos de ar, evitando a contaminação da área com fluído salivar. Com o auxílio de uma cureta Gracey estéril (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA), a placa supragengival foi cuidadosamente removida. Posteriormente, outra cureta Gracey

estéril foi utilizada para a coleta da microbiota subgengival dos sítios mesial e distal, partindo da porção mais profunda da bolsa em direção coronal de cada elemento dentário selecionado. Imediatamente após a coleta, a amostra de cada sítio foi armazenada em frasco específico estéril do tipo *eppendorf* contendo 150µL de solução tampão [10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6 – solução Tris-EDTA (TE)]. Foram adicionados 100µL de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 0,5M a esta solução para que o ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Os *eppendorfs*, devidamente identificados com o código do paciente, data e sítio coletado, foram armazenados sob refrigeração a -80°C. No Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da Universidade de Guarulhos (Universidade de Guarulhos – UNG, Guarulhos, SP, Brasil), o método de análise microbiana *checkerboard DNA-DNA hybridization* foi utilizado para a contagem de 40 espécies bacterianas subgengivais em cada amostra (Socransky e Haffajee, 1994; Socransky *et al.*, 1994; Sampaio *et al.*, 2011).

3.7.1 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. *Tannerella 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 *Treponema denticola* e *Treponema 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) (Martins *et al.*, 2016).

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 microcentrífuga 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.*, (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 (Martins et al. 2016).

Complexo Azul	Complexo Roxo	Complexo Verde	Complexo Amarelo
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>		<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>		<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
		<i>Aggregatibacter</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
		<i>actinomycetemcomitans</i>	
Complexo Laranja	Complexo Vermelho	Especies “não-orais”	
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Eubacterium saburreum</i>	
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	
<i>Campylobacter showae</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>	
<i>Eubacterium nodatum</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>	
<i>Parvimonas micra</i>		<i>Prevotella melaninogenica</i>	
<i>Prevotella intermedia</i>		<i>Neisseria mucosa</i>	
<i>Prevotella nigrescens</i>		<i>Streptococcus anginosus</i>	
<i>Streptococcus constellatus</i>		<i>Selenomonas noxia</i>	
<i>Fusobacterium Periodonticum</i>		<i>Treponema Socranskii</i>	
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum</i>			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum</i>			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii</i>			

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

3.7.2 *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

As suspensões de biofilme subgingival foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônio a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do Minislot foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 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 (Immunetics,

Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do Miniblotter 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 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 (Moreira et al. 2014).

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, então, lavada duas vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20 - pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5 (Moreira et al. 2014).

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 (Moreira et al. 2014).

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 10⁵ e 10⁶ 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 10⁵ células; 2 equivaleu a 10⁵ células; 3 entre 10⁵

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 (Moreira et al. 2014).

3.8 Terapia Periodontal Básica

Ao iniciar o estudo, os pacientes foram submetidos a exames radiográficos periapicais completos, realizados pela técnica de paralelismo, com auxílio de posicionador radiográfico. Em seguida, um programa de higienização oral (PHO) foi estabelecido. Neste programa, manequins e acessórios foram utilizados como métodos de instrução para um efetivo autocontrole de placa bacteriana, incluindo informações de técnica de escovação Técnica de Bass (1954), limpeza interproximal com fio dental e escovas interdentais e higienização do dorso da língua. Os voluntários também receberam orientações para a utilização de escovas com cerdas macias para que não houvesse interferências ao estudo por traumas de higienização. Após a realização deste programa, os pacientes foram submetidos à análise dos parâmetros clínicos periodontais já descritos anteriormente, sendo realizadas, também, as coletas das amostras de placa bacteriana subgingival nos sítios selecionados (*Baseline* - Tempo I). Em um segundo momento, sessões semanais de raspagem e alisamento radicular foram realizadas e executas por quadrantes durante o período de 4 semanas, com auxílio de instrumentos manuais (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos. Para finalizar, foi realizado polimento coronário com taças de borracha em todos os elementos dentários presentes na cavidade bucal.

3.9 Terapia Periodontal Cirúrgica

Os procedimentos cirúrgicos de acesso foram executados 60 dias após o início do tratamento periodontal básico (reavaliação – Tempo II). Neste momento, os parâmetros clínicos foram analisados e amostras microbiológicas dos sítios interproximais coletadas. Os voluntários que apresentaram bolsas periodontais interproximais menores que 5mm nos elementos dentários selecionados foram eliminados da pesquisa e encaminhados para o curso de Especialização de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

para continuidade do tratamento. Os pacientes que mantiveram bolsas periodontais com $PS \geq 5\text{mm}$ e presença de SS foram submetidos a terapia cirúrgica de acesso para descontaminação radicular. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador, especialista em Periodontia. Inicialmente os pacientes foram submetidos à antissepsia extra oral com solução de clorexidina 2% e intra oral por meio de bochecho com solução de clorexidina 0,12%. Anestesias infiltrativas locais com solução de lidocaína a 2% e 1:100.000 de adrenalina foram aplicadas. A seguir, foram realizadas incisões intra-sulculares com lâmina de bisturi nº 15C englobando o dente selecionado e seus adjacentes. Um retalho de espessura total ou mucoperiosteal foi realizado para a exposição da crista óssea e depósitos de cálculo subgengival e/ou tecido granulomatoso. Procedimentos de curetagem e descontaminação radicular foram feitos por meio de curetas Gracey convencionais e Mini-Five, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e aparelhos ultrassônicos e, ao final, irrigação abundante com soro fisiológico estéril. Os procedimentos foram executados da mesma forma no dente contralateral selecionado. Concluída a descontaminação da área e RAR de ambos os lados, o envelope obtendo as informações da aleatorização foi revelado, e assim, iniciada a TFDa no lado do Grupo Teste. No lado contralateral, Grupo Controle, foi realizado o “Procedimento Sham”, que simula a TFDa com substituição do fotossensibilizador por soro fisiológico e aplicação do laser inativado pelo mesmo tempo previsto Grupo Teste. Finalizada a terapia de cada grupo, os retalhos foram reposicionados nos locais de origem e estabilizados com suturas simples por meio de fio mononylon 5-0. Com o objetivo de evitar sintomatologia dolorosa, analgésicos (Paracetamol 750mg, 1 comprimido a cada 6 horas, por 48 horas) foram prescritos. As suturas foram removidas com 14 dias de pós-operatórios. Com o auxílio de micromotor e taças de borracha impregnadas com pasta profilática, foi realizado controle de placa supra-gengival semanalmente durante o primeiro mês e mensalmente até completar 3 meses pós-intervenção cirúrgica.

Figura 3: Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Controle: A) Incisão intra-sulcular com lâmina de bisturi nº 15c. Região de pré-molar superior; B) Área de pré-molares incisadas; C) Evidenciação de crista e defeito ósseo. Área pós remoção do tecido granulomatoso e Raspagem e Alisamento Radicular; D) Retalho reposicionado e estabilizado por suturas simples com fio mononylon 5-0.

3.10 Protocolo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

3.10.1 Protocolo Transcirúrgico

Finalizados os procedimentos de descontaminação da área alocada ao Grupo Teste, deu-se início à TFDa. A área selecionada foi irrigada com soro fisiológico e seca com gaze estéril para que não houvesse sangramento. Em seguida, foi aplicado o fotossensibilizador de cloridrato de fenotiazina, cujo principal componente é o azul de toluidina, na concentração de 10mg/mL (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Áustria), o qual permaneceu em contato com a superfície radicular pelo período de 5 minutos. Aguardado este período, a área foi irrigada com soro fisiológico para a remoção dos excessos de corante e irradiada com laser diodo de comprimento de onda de 660nm, poder máximo de 60 mW/cm² e densidade de energia de 0,6J/cm² (Helbo therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Áustria), durante 60 segundos por sítio. O tratamento foi efetuado em 6 sítios (mesio-vestibular,

vestibular, disto-vestibular, mesio-palatal/lingual, palatal/lingual e disto-palatal/lingual) por dente, totalizando 6 minutos de aplicação de luz laser por dente. Aos dentes envolvendo lesões de bifurcação foram acrescentados mais 60 segundos no interior da lesão.

Figura 4: Descrição da Terapia Cirúrgica – Grupo Teste: A) Imagem inicial. Primeiro pré-molar superior; B) Incisão intra-sulcular com lâmina nº 15c; C) Região de pré-molares incisadas; D) Retalho total e exposição de cálculos e tecido de granulação; E) Área descontaminada e exposição do defeito ósseo; F) Aplicação do fotossensibilizador de cloridrato de fenotiazina; G) Irrigação com soro fisiológico; H) Remoção do excesso de fotossensibilizador; I) Ativação do laser diodo sobre a superfície dentária (60s por sítio); J) Suturas simples com fio mononylon 5-0.

3.10.2 Protocolo pós-cirúrgico

O tratamento com TFDa no Grupo Teste manteve o protocolo de aplicações nos períodos de 2, 7 e 14 dias pós-intervenção cirúrgica conforme descrito por Ramos *et al.*, em 2016. Este protocolo é distinto do anterior pelo tempo de exposição à luz laser. No protocolo realizado durante o ato cirúrgico, o tempo de exposição foi de 60 segundos por sítio totalizando 6 minutos; neste, realizado no período pós-operatório, as aplicações foram de 10 segundos por sítio em 6 sítios por dente, totalizando 1 minuto de exposição. Dentes envolvendo lesão de bifurcação tiveram acréscimo de mais 10 segundos no interior da lesão.

Figura 5: A) Pós-operatório de 14 dias; B) Aplicação do fotossensibilizador de cloridrato de fenotiazina; C) Remoção do excesso de fotossensibilizador; D) Ativação do laser diodo sobre a superfície dentária (10s por sítio).

3.10.3 Procedimento Sham

O procedimento foi realizado em paralelo aos protocolos de TFDa acima citados. No Grupo Controle, para assegurar um cegamento do paciente perante o estudo, foram realizados protocolos similares ao Grupo Teste. Entretanto, a substância

fotossensibilizadora foi substituída por soro fisiológico e o procedimento de aplicação do laser fotoativador foi realizado com o equipamento desativado.

4.11.1 Parâmetros clínicos

Para os diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (Baseline, 60 dias e 150 dias) foi calculada a média e o desvio-padrão de PS, NCI e RG. Para as variáveis SS e IP, foram calculadas as frequências absoluta e relativa desses parâmetros em cada paciente. As diferenças dentro de cada grupo para PS, NCI, RG, SS e IP nos três tempos experimentais foram avaliadas pela Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas e teste *post hoc* de Bonferroni. As diferenças intergrupos (em um determinado tempo experimental) para PS, NCI, RG, SS e IP foram avaliadas pela Análise de Variância de medidas repetidas e Teste t de Student pareado. A análise das diferenças intergrupos para as mudanças ocorridas (aos 60 e 150 dias) nos valores de PS, NCI e RG em relação aos valores obtidos no *baseline* foram avaliadas pelo Teste t de Student pareado. A análise das diferenças demográficas dos pacientes e profundidade das bolsas periodontais presentes no baseline foram avaliadas pelo teste Qui-Quadrado.

4.11.2 Parâmetros microbiológicos

Os níveis de cada espécie bacteriana testada foram calculados 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 ($\times 10^5$) para cada par de dentes analisados (4 amostras de placa bacteriana subgengival). Foi calculada, então, a contagem média de cada espécie nos diferentes grupos (Controle e Teste) e tempos experimentais (*baseline*, 60 e 150 dias). Os dados foram também agrupados em complexos, os quais foram descritos por (Socransky *et al.*, 1988). As diferenças intragrupos nas contagens médias de cada espécie bacteriana foram avaliadas pelo Teste de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, conforme descrito por (Socransky e Haffajee, 1994; Socransky

et al., 1994). Resumidamente, foi computado um valor geral de p conforme as seguintes fórmulas: i) $1-(1-k)$ (Qin, Y. L. *et al.*, 2008) para espécies orais; ii) $1-(1-k)$ (Danser *et al.*, 1996) 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. As diferenças intergrupos para as mudanças ocorridas aos 60 e 150 dias nas contagens médias de cada espécie bacteriana em relação aos valores obtidos no *baseline* foram avaliadas pelo Teste t de Student pareado. As diferenças intragrupos e intergrupos para as frequências relativas médias dos complexos bacterianos foram avaliadas pelo Teste de Bonferroni e pelo Test t de Student, respectivamente.

Resultados

Resultados

Todos os pacientes incluídos na amostra completaram o estudo. Nenhum incômodo ou efeito adverso foi relatado na terapia não cirúrgica de RAR prévia ao tratamento periodontal cirúrgico. Alguns pacientes (3 voluntários) relataram sensibilidade dentinária aumentada ao estímulo térmico após o tratamento periodontal cirúrgico em ambos os tratamentos realizados. Houve redução progressiva da sintomatologia durante os primeiros dias, com ausência completa em no máximo 14 dias após a terapia cirúrgica. Não houve qualquer incômodo relatado ou intercorrência diretamente relacionada à TFDa ou ao procedimento “Sham” durante do o período experimental, denotando a segurança dos tratamentos. Também não houve queixa de aparência ou estética relacionadas a manchas dentais provocadas pelo corante utilizado.

A cicatrização pós-operatória ocorreu sem complicações em todos os casos após a realização da terapia periodontal cirúrgica. Em um único voluntário foi observada a presença de uma pequena lesão palatina, sem comunicação direta ou prejuízos à área cirúrgica. Presume-se que a lesão foi em decorrência do afastamento tecidual ou técnica anestésica. O paciente foi submetido a acompanhamento semanal até a completa cicatrização da área. Todos os procedimentos necessários para o experimento foram realizados entre os períodos de março de 2016 a novembro de 2017.

As características demográficas dos grupos experimentais estão apresentadas na Tabela 2. Nenhuma diferença significativa foi observada na frequência de bolsas periodontais, bem como no tipo de dente (uni ou multirradicular) entre os grupos experimentais no Tempo I (*baseline*).

VARIÁVEL	Média ± DP	Controle	Teste	Valor p
Número de pacientes	16			
Idade	50.25 ± 9.30			
Gênero (F/M)	7 / 9			
Número de dentes no baseline	24.56 ± 2.71			
Molares		10	10	NS
Pré Molares		6	6	NS
Número de bolsas periodontais presentes no baseline				
PS = 5 mm		4	6	NS
PS = 6 mm		14	11	NS
PS ≥ 7 mm		14	15	NS

F= Feminino; M= Masculino; PS= Profundidade de sondagem; DP= Desvio padrão; NS= Diferenças não significativas (Teste Qui-Quadrado, $p > 0,05$).

Tabela 2. Características demográficas da amostra no *baseline* de acordo com os grupos experimentais.

5.1 Monitoramento clínico

Os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI) e Recessão gengival (RG) para os grupos Controle (GC) e Teste (GT) podem ser observados na Tabela 3.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

COMPARAÇÃO INTERGRUPOS

Teste *t* Student pareado

VARIÁVEL	TEMPO	Controle	Teste	Diferenças entre as médias	IC 95%	Valor <i>p</i>
PS (mm)	Tempo I	6,56 ± 0,20	6,43 ± 0,21	0.13	-0,42 0,67	NS
	Tempo II	5,87 ± 0,22	6,21 ± 0,21	-0.34	-0,18 0,87	NS
	Tempo III	4,06 ± 0,23 ^{a, b}	3,31 ± 0,18 ^{a, b}	0.75	-1,05 -0,44	0,0007
NCI (mm)	Tempo I	6,90 ± 0,36	7,00 ± 0,27	-0.10	-0,77 0,96	NS
	Tempo II	6,25 ± 0,54	6,90 ± 0,32	-0.65	-0,67 1,98	NS
	Tempo III	5,59 ± 0,54	5,03 ± 0,36 ^{a, b}	0.56	-1,95 0,83	NS
RG (mm)	Tempo I	0,50 ± 0,22	0,56 ± 0,22	-0.06	-0,53 0,66	NS
	Tempo II	0,71 ± 0,26	0,71 ± 0,23	0.00	-0,60 0,60	NS
	Tempo III	1,84 ± 0,37 ^{a, b}	1,71 ± 0,29 ^{a, b}	0.13	-1,15 0,90	NS

PS: profundidade de sondagem; NCI: nível clínico de inserção; RG: Recessão gengival; IC: Intervalo de confiança; NS: Diferença não significante; a: diferença significativa quando comparado ao valor do Tempo I em um mesmo grupo; b: diferença significativa quando comparado ao valor do Tempo II em um mesmo grupo (ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Bonferroni, $p < 0,05$).

Tabela 3. Comparação entre grupos e intragrupos das médias ± desvios padrões dos parâmetros clínicos no *baseline*, 60 dias e 150 dias.

No Tempo I (*baseline*), nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos. Também não houve diferença significante entre os grupos nos parâmetros NCI e RG em outros tempos. No Tempo III (150 dias), foi observado um valor de PS significantemente menor para o GT quando comparado ao GC ($p < 0,05$). Quando analisadas as diferenças ocorridas entre os tempos de cada grupo (análise intragrupos), houve diminuição significativa na PS quando comparados os tempos *baseline* versus 150 dias e 60 dias (Tempo II) versus 150 dias, nos GC e GT. Entretanto, para o NCI houve redução relevante apenas no GT, entre os tempos I e III e entre os tempos II e III. Foi observado um aumento expressivo da recessão gengival na comparação dos tempos *baseline* aos 150 dias e 60 dias em ambos os grupos.

Com relação aos índices de placa (IP) e sangramento à sondagem (SS), apesar de não haver diferenças significativas entre GC e GT, ambos apresentaram diminuição

estatisticamente significativa nas comparações intragrupos: houve redução significativa nos parâmetros SS e IP do Tempo I para o Tempo III em ambos os grupos. Houve, também, redução no Tempo III em relação ao Tempo II nos GC e GT no parâmetro SS e no Tempo II para o Tempo I no Grupo Controle para IP.

		Controle	Teste			
		Média ± DP	Média ± DP	Diferença entre as médias	IC 95%	Valor p
SS (%)	Tempo I	84,38 ± 30,10	68,75 ± 44,25	15,63	-36,76 a 5,50	NS
	Tempo II	78,13 ± 31,46	65,63 ± 39,66	12,50	35,32 a 10,32	NS
	Tempo II	18,75 ± 30,96 ^{bΩ}	9,37 ± 27,20 ^{bΩ}	9,38	-23,87 a 5,116	NS
IP (%)	Tempo I	71,88 ± 44,60	62,50 ± 42,82	9,38	-25,92 a 9,249	NS
	Tempo II	31,25 ± 40,31 ^b	34,38 ± 39,66	-3,13	-18,92 a 24,47	NS
	Tempo II	21,88 ± 36,37 ^b	15,63 ± 35,21 ^b	6,25	-13,60 a 2,485	NS

IC: Intervalo de confiança; SS: Sangramento à sondagem; IP: Índice de placa; NS: Diferença não significativa; B: diferença significativa quando comparado ao valor do Tempo I em um mesmo grupo; Ω: diferença significativa quando comparado ao valor do Tempo II em um mesmo grupo (ANOVA de medidas repetidas, post hoc Bonferroni, $p < 0,05$).

Tabela 4. Comparação entre grupos e intragrupos das médias ± desvios padrões dos parâmetros clínicos no Tempo I (baseline), Tempo II (60 dias) e Tempo III (150 dias).

Na Tabela 5 podem ser observadas as médias das diferenças dos parâmetros clínicos entre os tempos, em valores absolutos e percentuais para cada grupo. Na PS houve uma diminuição significativa na comparação intragrupos entre os períodos 0-60 *versus* 0-150 dias e 0-60 *versus* 60-150 dias para os GC e GT, respectivamente. Houve também, uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos na variação de 60 para 150 dias (GT = $-2,91 \pm 0,92$; GC = $-1,81 \pm 1,03$). Outro achado importante foi um ganho significativamente maior no NCI do Grupo Teste em relação ao Grupo Controle para a variação entre os tempos de 60 e 150 dias. Essa diferença também pode ser observada na análise intragrupo para o GT nas variações de 0-60 *versus* 0-150 dias e 0-60 *versus* 60-150 dias. No parâmetro SS houve diferença estatística apenas na análise

intragrupos. Sendo que no Grupo Teste a variação significativa foi observada apenas nos períodos 0-6 *versus* 0-150 e no Grupo Controle nos períodos 0-60 *versus* 0-150 e 0-60 *versus* 60-150 dias. Não houve diferenças estatisticamente significantes no IP para todas as análises intra e entre grupos.

		Δ 0-60	%	Δ 0-150	%	Δ 60-150	%
COMPARAÇÃO INTERGRUPO	PS (mm)						
	Controle	-0,69 ± 1,09	-10,48 ± 14,97	-2,5 ± 1,40 a	-38,83 ± 17,59	-1,81 ± 1,03 a	-30,85 ± 15,69
	Teste	-0,22 ± 0,68	-3,52 ± 9,78	-3,13 ± 1,06 a	-76,92 ± 12,01	-2,91 ± 0,92 a	-87,74 ± 11,05
	Valor p	0,15		0,16		0,0035	
	NCI (mm)						
	Controle	-0,66 ± 1,93	-9,50 ± 33,95	-1,31 ± 1,75	-18,75 ± 27,45	-0,66 ± 1,47	-10,50 ± 23,94
	Teste	-0,09 ± 0,99	-1,36 ± 15,59	-1,97 ± 1,07 a	-35,20 ± 16,02	-1,88 ± 1,04 a	-37,27 ± 15,12
	Valor p	0,30		0,21		0,0111	
	RG (mm)						
	Controle	0,22 ± 0,52	43,75 ± 43,66	1,34 ± 1,26 a	238,89 ± 56,84	1,13 ± 1,20	156,52 ± 51,59
	Teste	0,16 ± 0,51	21,74 ± 50,25	1,16 ± 1,08 a	62,71 ± 54,68	1,00 ± 1,03 a	58,18 ± 53,14
	Valor p	0,0030		0,6542		0,7548	
	SS (%)						
	Controle	-6,25 ± 35,19		-65,63 ± 48,06 a		-59,38 ± 47,06 a	
	Teste	-18,75 ± 45,51		-59,38 ± 53,00 a		-56,25 ± 39,94	
	Valor p	0,3874		0,7256		0,8385	
	IP (%)						
	Controle	-40,63 ± 48,06		-50,00 ± 48,06		-9,38 ± 48,80	-13,03
	Teste	-28,13 ± 45,51		-46,88 ± 42,26		-18,75 ± 36,84	-30,00
	Valor p	0,4566		0,8476		0,5745	

PS: Profundidade de sondagem; NCI: nível clínico de inserção; RG: Recessão gengival; SS: sangramento à sondagem; IP: índice de placa; DP: desvio padrão; % Δ : Porcentagem de Variação; Δ 0-60: variação absoluta entre o tempo I e tempo II; Δ 0-150: variação absoluta entre o tempo I e tempo III; Δ 60-150: variação absoluta entre o tempo II e tempo III; a: Diferença significativa intragrupo quando comparado ao Δ 0-60 (ANOVA de medidas repetidas, post hoc Bonferroni, $p < 0,05$).

Tabela 5. Análises intergrupos e intragrupo das variações ± desvios padrões dos parâmetros clínicos entre os Tempos I (baseline) e II (60 dias), I e III (150 dias), e II e III.

5.2 Monitoramento microbiológico

De forma geral, os voluntários tratados no presente estudo apresentaram elevadas contagens de patógenos periodontais dos complexos laranja (GC = 29,35% e GT = 32,34%) e vermelho (GC = 12,90% e GT = 18,98%) no *baseline*. A Figura 7 expressa as médias da contagem total ($\times 10^5$) das 40 espécies subgengivais ao longo do período experimental nos Grupos Controle e Teste, bem como as diferenças estatisticamente significantes ocorridas nas contagens médias de cada grupo aos 60 e 150 dias quando comparadas aos valores obtidos no *baseline*.

Figura 6. Contagens das médias ($\times 10^5$) de 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no baseline, 60 e 150 dias pós-terapia nos dois grupos terapêuticos, bem como, os resultados das comparações intragrupos. Diferenças significativas quando comparado ao *baseline*: (Ψ) Grupo Controle – 150 dias; (£) Grupo Teste - 150 dias. Diferenças significativas quando comparado aos 60 dias (Tempo II): (¥) Grupo Controle – 150 dias; (Ω) Grupo Teste – 150 dias. (ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$).

Os grupos experimentais demonstraram resultados similares na análise intergrupo, não havendo diferenças significativas entre eles. Na análise intragrupo, não houve diferença significativa do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*) entre os tempos analisados em ambos os grupos. No grupo teste houve redução significativa da espécie bacteriana *F. nuc. Nucleatum* do complexo laranja para as comparações *baseline versus* 60 dias e *baseline versus* 150 dias.

Aos 150 dias, foi observado um aumento significativo de uma espécie bacteriana do complexo laranja (*C. gracilis*), bem como uma do complexo azul (*A. naeslundii I*) quando comparado ao tempo *baseline* em ambos os grupos. Além disso, outras bactérias

estavam aumentadas, como a *S. sanguinis* do complexo amarelo, *A. odontolyticus* do complexo roxo e a *S. anginosus* do complexo de bactérias não orais. No Grupo Teste, também foi observado um aumento das bactérias *P. micros* e *C. rectus* do complexo laranja, *C. ochracea* e *E. corrodens* do complexo verde, *A. actinomycetemcomitans* (*A.a*) e outras três espécies bacterianas (*L. buccalis*, *N. mucosa*, *T. socranskii*) do complexo de bactérias não orais.

Quando tomado o tempo de 60 dias como base de comparação, os grupos experimentais apresentaram um aumento significativo aos 150 dias nas espécies bacterianas *C. gracillis* do complexo laranja, *A. naeslundii* I do complexo azul, *S. sanguinis* do complexo amarelo, *A.a* e outras três espécies (*L. buccalis*, *S. anginosus* e *T. socranskii*). Além disso, o Grupo Controle apresentou um aumento significativo da *P. nigrescens* no complexo laranja. Já o Grupo Teste apresentou aumento das espécies bacterianas *A. gerencseriae* e *A. viscosus*, ambas do complexo azul.

A frequência relativa das médias foi avaliada e exposta na figura 8. Não foram observadas diferenças estatísticas nos complexos bacterianos entre os grupos experimentais nos diferentes tempos. Em ambos os grupos foram observados no *baseline* percentuais consideravelmente baixos de *Aa* e uma maior prevalência de bactérias do complexo laranja. Na análise intragrupo, houve um aumento significativo do complexo laranja aos 60 dias quando comparado ao *baseline* nos Grupos Controle e Grupo Teste. Além disto, o complexo de bactérias não orais teve uma redução significativa na comparação do tempo *baseline versus* 60 dias e um aumento entre 60 dias *versus* 150 dias (sendo estas diferenças estatisticamente significantes apenas para o GC).

Figura 7. Frequências relativas das médias em porcentagem (%) dos complexos microbianos nos diferentes períodos experimentais. (¶) diferença significativa quando comparado aos valores do *baseline*; (2) diferença significativa quando comparado aos valores de 60 dias. (ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$).

Discussão

Discussão

O presente estudo clínico, do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego avaliou a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana em múltiplas sessões como terapia adjunta ao tratamento cirúrgico da periodontite crônica generalizada avançada, por meio de análises de parâmetros clínicos e microbiológicos. Os resultados revelaram efeitos clínicos benéficos da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações repetidas, com valores residuais de profundidade de sondagem aos 90 dias pós-operatórios para o Grupo Teste de $3,31 \pm 0,18\text{mm}$ e de $4,06 \pm 0,23\text{mm}$ no Grupo Controle.

Os experimentos prévios que associam a TFDa ao tratamento convencional não-cirúrgico demonstram controvérsias nos resultados obtidos e divergências nos protocolos utilizados. Estudos que obtiveram resultados favoráveis na melhora dos parâmetros clínicos pela associação da TFDa à raspagem e alisamento radicular, de forma geral, evidenciam a diminuição da profundidade de sondagem como o parâmetro clínico mais comumente encontrado (Braun *et al.*, 2008; Lulic *et al.*, 2009; Betsy *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2015; Vohra *et al.*, 2018). Em contrapartida, outros estudos não observaram efeitos adicionais da TFDa nos parâmetros clínicos avaliados pela associação ao tratamento periodontal de raspagem e alisamento radicular (Christodoulides *et al.*, 2008; Balata *et al.*, 2013; Bassir *et al.*, 2013; Luchesi *et al.*, 2013; Chitsazi *et al.*, 2014; Segarra-Vidal *et al.*, 2017). Os resultados conflitantes da literatura podem ser em consequência da heterogeneidade dos protocolos de TFDa, diferenças na fonte de luz, fotossensibilizador e tempo de análise, o que dificulta a comparação detalhada entre os estudos.

Apesar de haver estudos relevantes da associação de procedimentos de RAR à TFDa em aplicações múltiplas, não há na literatura, até o momento, estudos que associem esse método terapêutico ao tratamento cirúrgico da doença periodontal. Martins *et al.*, em 2017, associaram ao tratamento cirúrgico de periodontite crônica generalizada avançada um protocolo de aplicação única de TFDa, realizado no ato cirúrgico. Foram observadas reduções de PS aos 90 dias pós-cirúrgicos em relação aos valores do *baseline*, sendo, em média, 2,30mm para o Grupo Controle e 2,93mm para o Grupo Teste. Esses resultados corroboram os achados do presente estudo, o qual atingiu reduções médias de 2,50mm e

3,13mm nos Grupos Controle e Teste, respectivamente, nos mesmos períodos. Reduções semelhantes são relatadas no estudo de Giannelli *et al.*, que em 2012 realizou remoção do epitélio interno da bolsa periodontal, utilizando laser de alta potência, prévia ao tratamento de TFDa, resultando em reduções na PS de 0,9 mm ($4,9 \pm 0,1$ para $4,0 \pm 0,1$) no grupo controle e 3,0mm ($5,1 \pm 0,1$ para $2,1 \pm 0,1$) no grupo teste quando comparados os tempos *baseline* e 350 dias.

Quando a TFDa foi utilizada como tratamento adjuvante à terapia periodontal não cirúrgica, foram observadas reduções menos expressivas em comparação aos estudos envolvendo técnicas cirúrgicas associadas. De Oliveira *et al.*, em 2007, obteve uma redução média na PS de 1,43mm ($4,92 \pm 1,61$ mm para $3,49 \pm 0,98$ mm) no grupo teste e 0,94mm ($4,92 \pm 1,14$ mm para $3,98 \pm 1,76$ mm) no grupo controle, após 3 meses de acompanhamento. Já Atieh, em 2010, em uma meta-análise realizada com 4 estudos clínicos controlados similares, associando a TFDa ao tratamento não cirúrgico de RAR, observou uma redução média de apenas 0,11mm na profundidade de sondagem em 12 semanas de acompanhamento.

Uma possível explicação para as reduções mais elevadas expressas no presente estudo quando comparado aos que abordaram tratamento não cirúrgico se dá pelo fato de a terapia cirúrgica para debridamento, por si só, colabora para a diminuição na profundidade de sondagem (Westfelt *et al.*, 1985). Lindhe *et al.*, 1982 observaram reduções médias de $4,2 \pm 0,2$ para $2,5 \pm 0,1$ após 24 meses de acompanhamento em procedimentos de RAR associada a cirurgia para debridamento. Achados menos expressivos foram encontrados em uma revisão sistemática, que observou reduções médias de 0,4 mm em bolsas periodontais iniciais de 4 a 6 mm e de 0,6 mm em bolsas profundas (> 6 mm) após debridamento cirúrgico (Heitz-Mayfield *et al.*, 2002). Além disso, o acesso cirúrgico pode aumentar a capacidade de penetração do fotossensibilizador aos tecidos epiteliais e conjuntivo, podendo atingir periodontopatógenos infiltrados (Komerik *et al.*, 2003), e poderia ainda haver um efeito de biomodulação causado pelo laser de baixa intensidade nos tecidos e células locais durante a cicatrização tecidual, melhorando o reparo dos tecidos e diminuindo a inflamação periodontal (Qadri *et al.*, 2005).

Outro achado importante do presente estudo foi o ganho significativo no nível clínico de inserção do Grupo Teste quando comparados os diferentes tempos (análise

intragrupos), bem como na comparação entre os grupos Teste e Controle aos 90 dias pós-cirurgia. Este fato sugere uma superioridade clínica das múltiplas aplicações de TFDa no tratamento cirúrgico da PCA, pois em estudo prévio com aplicação única (Martins *et al.*, 2017) não foram observadas diferenças significantes no NCI, mas apenas na profundidade de sondagem.

Apesar dos achados clínicos favoráveis do presente estudo, os trabalhos avaliando procedimentos clínicos não cirúrgicos de raspagem e alisamento radicular associados a aplicações repetidas de TFDa são controversos quanto aos resultados apresentados (Lulic *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2015; Monzavi *et al.*, 2016). Entretanto, pesquisa avaliando as diferenças clínicas obtidas pela aplicação de uma ou mais sessões de TFDa adjunta ao tratamento não cirúrgico de raspagem, mostrou que nenhum sítio periodontal apresentou profundidade de sondagem maior que 4 mm e presença de sangramento à sondagem no grupo de aplicações repetidas aos 3 e 6 meses, mas no grupo de aplicação única houve a permanência de 3 sítios com PS elevada e sangramento à sondagem (Müller Campanile *et al.*, 2015).

Segundo a Academia Americana de Periodontologia (American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease, 2011), as evidências atuais mostram que os lasers, tal como a TFDa, isolada ou como terapia adjuvante, são imprevisíveis e inconsistentes em sua capacidade de reduzir as cargas microbianas subgengivais além daquelas obtidas apenas pela RAR. A literatura mostra tantos estudos apresentando redução significativa de periodontopatógenos como *A.a* (Nastri *et al.*, 2010; Novaes *et al.*, 2012), *P. gingivalis* (Braham *et al.*, 2009; Sigusch *et al.*, 2010), *Prevotella intermedia* (Talebi *et al.*, 2016) entre outras espécies bacterianas (Sigusch *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2015), como outros que não encontraram alterações significativas da microbiota subgengival pela associação da TFDa ao tratamento não-cirúrgico de doenças periodontais (Polansky *et al.*, 2009; Christodoulides *et al.*, 2008).

No presente estudo não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, aos 150 dias, nos complexos microbianos subgengivais. Entretanto, embora não significantes, foram verificadas importantes reduções numéricas nas porcentagens de bactérias do complexo vermelho durante os períodos de acompanhamento, tanto para os Grupos Teste e Controle. Sítios periodontais com altos

níveis de bactérias do complexo vermelho apresentam maior risco de perda de inserção (Hamlet *et al.*, 2004), bem como apresentam maior gravidade e progressão da doença periodontal (Beck *et al.*, 1990). Em contrapartida, foram observados aumentos significativos em bactérias do complexo laranja (*C. gracillis*), complexo amarelo (*S. sanguinis*) e complexo azul (*A. naeslundii* I) em ambos os grupos. O aumento desses complexos bacterianos aos 150 dias do estudo sugere uma possível recolonização microbiana subgengival 90 dias após o tratamento cirúrgico. Em uma revisão recente, (Mombelli, 2018) afirma que os locais tratados estão sujeitos a recolonização com uma microbiota semelhante à presente antes da terapia, sendo que o grau e a velocidade da recolonização dependem do protocolo de tratamento, dos padrões de distribuição dos microrganismos periodontais em outras partes da cavidade oral e da qualidade da higiene bucal do paciente. Magnusson *et al.*, em 1984 investigaram a possível recolonização subgengival após tratamento periodontal de RAR. Após 16 semanas de acompanhamento e coletas de amostras microbianas, o grupo restrito ao acompanhamento profissional de controle bacteriano demonstrou que, na ausência de higiene bucal adequada após o tratamento, uma microbiota subgengival contendo um grande número de espiroquetas e bastonetes móveis é restabelecida dentro de 4 a 8 semanas.

No presente experimento, na análise intragrupos, aos 150 dias o Grupo Controle apresentou um aumento significativo na espécie bacteriana *P. nigrescens* do complexo laranja, a qual tem se mostrado associada a uma grande proporção de sítios com sangramento à sondagem (Mombelli *et al.*, 2000), sendo encontrada mais frequentemente na microbiota subgengival de pacientes com periodontite avançada (Stingu *et al.*, 2013). Já no Grupo Teste, a TFDa proporcionou um aumento significativo nas espécies bacterianas *A. gerencseriae* e *A. viscosus* do complexo azul, as quais são associadas a saúde periodontal. Essas alterações positivas nas proporções de espécies bacterianas compatíveis com o hospedeiro, observadas apenas no Grupo Teste, representam um papel importante no tratamento periodontal de sucesso (Tanner *et al.*, 1998).

Embora haja uma relação de causa e efeito entre o acúmulo de depósitos microbianos e a inflamação gengival (Loe *et al.*, 1965), fatores ambientais (Giannopoulou *et al.*, 2003), bem como fatores relacionados ao hospedeiro, como a expressão individual e local de sinais de inflamação gengival que modulam a resposta inflamatória à colonização microbiana (Que *et al.*, 2004), podem ter papel importante no desenvolvimento da doença. Apesar da hipótese de uma recolonização da microbiota

subgengival existente ao final do presente experimento, as melhoras clínicas significativas na PS e NCI do Grupo Teste permaneceram aos 90 dias após terapia cirúrgica. Uma possível hipótese para esse achado se dá pela ação benéfica do laser de baixa potência, que provoca inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo as alterações inflamatórias locais (Xavier *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018). Para que haja comprovação dessa hipótese, avaliações imunológicas devem ser realizadas para verificação das possíveis alterações no perfil de citocinas presentes nos sítios tratados.

Um outro fator a ser considerado na análise dos resultados é a diversidade nos protocolos para a aplicação de TFDa como coadjuvante no tratamento de doenças periodontais. Lulic *et al.*, em 2009, realizaram um protocolo de cinco aplicações (0, 1, 2, 7 e 14 dias) utilizando um fotossensibilizador de cloreto de fenotiazina com exposição de 3 minutos sobre a região e fotoativação com laser vermelho de 670nm por 60 segundos em cada sítio nas bolsas residuais após RAR. Reduções significativas foram observadas nas médias de PS ($6,08 \pm 1,19\text{mm}$ para $5,41 \pm 1,09\text{mm}$) pela associação da TFDa após 6 meses. Já Theodoro *et al.*, em 2018, realizaram aplicação da TFDa adjunta à RAR seguida de aplicações pós-operatórias as 48 e 96 horas, em bolsas periodontais moderadas no tratamento da PC. Um fotossensibilizador à base de azul de metileno a 10 mg/ml foi utilizado, com exposição de 1 minuto, seguida de irradiação por 48 segundos com laser de diodo de 660nm em cada sítio periodontal. Foram encontradas reduções significantes na profundidade de sondagem entre os tempos baseline ($4,02 \pm 0,42\text{mm}$) e 180 dias ($3,54 \pm 0,33\text{mm}$), além de um ganho significativo no nível clínico de inserção ($4,55 \pm 0,39\text{mm}$ para $4,11 \pm 0,34\text{mm}$). O protocolo utilizado no presente experimento demonstrou benefícios mais expressivos, sendo compatíveis com os achados de Moreira *et al.*, que em 2015 utilizaram protocolo similar. Além disso, os protocolos utilizados nestes trabalhos anteriores apresentaram diferentes tempos de exposição ao fotossensibilizador no período pré-irradiação, variando de 1 a 3 minutos. No presente estudo, foi utilizado um tempo de pré-irradiação de 5 minutos, o qual é considerado o tempo ótimo para a absorção da fenotiazina pelas bactérias (Qin, Y. *et al.*, 2008).

Entre as limitações do presente estudo, inicialmente pode-se considerar que o intervalo de 90 dias pós-operatórios para reavaliação dos efeitos terapêuticos talvez seja um período demasiado longo para verificação dos achados microbiológicos, devendo ser reconsiderado (Segelnick e Weinberg, 2006). Sugere-se que, para ensaios futuros a serem realizados, períodos menores de 30 e 60 dias sejam considerados para a reavaliação

clínica e microbiológica após o tratamento cirúrgico. Além disso, o próprio desenho experimental do presente estudo pode ter tido algum tipo de influência nos resultados obtidos: a inserção de uma cânula para aplicação do fotossensibilizador, bem como a inserção da fibra óptica para irradiação do laser no interior dos sítios subgengivais nos períodos pós-operatórios precoces (2, 7 e 14 dias), pode ter causado uma interferência deletéria durante o período crítico de neoformação epitelial e de reparo periodontal pós-cirúrgico (Waerhaug, 1978a; Caton e Zander, 1979), facilitando a penetração e recolonização bacteriana subgengival da região. Finalmente, frente aos bons resultados clínicos encontrados, seria ainda interessante agregar a estudos futuros avaliações imunológicas das possíveis alterações no perfil de citocinas presentes nos sítios tratados.

O presente estudo avaliou a associação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como adjuvante ao tratamento cirúrgico da Periodontite Crônica Avançada. Foram observadas melhoras significativas nos parâmetros clínicos com redução da profundidade de sondagem e ganho no nível clínico de inserção, bem como reduções numéricas na proporção de bactérias do complexo vermelho, 90 dias após a terapia cirúrgica. Além disso, apesar de haver aumento de algumas espécies bacterianas, sugerindo o início de uma recolonização da microbiota subgengival, o Grupo Teste apresentou quantidades mais elevadas de bactérias compatíveis com saúde periodontal no período final do experimento. Seria interessante, em futuros estudos, realizar um maior número de monitoramentos microbiológicos em períodos mais precoces, e avaliar os resultados obtidos longitudinalmente, para verificar se as melhoras dos parâmetros clínicos e as mudanças do microambiente subgengival se sustentam a longo prazo.

Conclusão

Conclusão

Os dois tipos de tratamento avaliados foram efetivos na melhora das condições periodontais em pacientes com Periodontite Crônica Avançada. Entretanto, o grupo com aplicação adjuvante da TFDa mostrou melhores resultados clínicos ao final do período de avaliação.

O protocolo de aplicações múltiplas parece demonstrar melhoras periodontais adicionais em comparação à aplicação única da TFDa como recurso adjuvante à terapia periodontal cirúrgica de pacientes com Periodontite Crônica, evidenciada pelo maior ganho de inserção clínica aos 90 dias após o tratamento.

Alterações no microambiente periodontal subgengival puderam ser observadas após 90 dias em ambos os tratamentos realizados, sendo que a TFDa apresentou melhoras mais expressivas em bactérias compatíveis com saúde do que a terapia cirúrgica de raspagem e alisamento radicular isoladamente.

A utilização da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como tratamento adjunto ao procedimento cirúrgico para raspagem e alisamento radicular é uma opção terapêutica a ser considerada, principalmente em sítios com bolsas periodontais profundas.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. ADRIAENS, P. A.; ADRIAENS, L. M. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. **Periodontol** **2000**, v. 36, p. 121-45, 2004.
2. American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease. **J Periodontol**, v. 82, n. 4, p. 513-4, Apr 2011.
3. ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec 1999.
4. ATIEH, M. A. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 4, p. 605-13, Jul 2010.
5. AZARPAZHOOH, A. et al. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, v. 81, n. 1, p. 4-14, Jan 2010.
6. BALATA, M. L. et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. **J Appl Oral Sci**, v. 21, n. 2, p. 208-14, 2013 Mar-Apr 2013.
7. BASS, C. C. An effective method of personal oral hygiene; part II. **J La State Med Soc**, v. 106, n. 3, p. 100-12, Mar 1954.
8. BASSIR, S. H. et al. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 1, p. 65-72, Jan 2013.
9. BECK, J. D. et al. Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. **J Periodontol**, v. 61, n. 8, p. 521-8, Aug 1990.

10. BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontol** **2000**, v. 55, n. 1, p. 36-47, Feb 2011.
11. BETSY, J. et al. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 6, p. 573-81, Jun 2014.
12. BRAHAM, P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. **J Periodontol**, v. 80, n. 11, p. 1790-8, Nov 2009.
13. BRAUN, A. et al. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 10, p. 877-84, Oct 2008.
14. CATON, J. G.; ZANDER, H. A. The attachment between tooth and gingival tissues after periodic root planing and soft tissue curettage. **J Periodontol**, v. 50, n. 9, p. 462-6, Sep 1979.
15. CHAN, Y.; LAI, C. H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 1, p. 51-5, 2003.
16. CHITSAZI, M. T. et al. Clinical and Microbiological Effects of Photodynamic Therapy Associated with Non-surgical Treatment in Aggressive Periodontitis. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**, v. 8, n. 3, p. 153-9, 2014.
17. CHRISTODOULIDES, N. et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 79, n. 9, p. 1638-44, Sep 2008.
18. COSGAREA, R. et al. Non-surgical periodontal treatment in conjunction with 3 or 7 days systemic administration of amoxicillin and metronidazole in severe chronic periodontitis patients. A placebo-controlled randomized clinical study. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 9, p. 767-77, Sep 2016.
19. DANSER, M. M. et al. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. **J Periodontol**, v. 67, n. 5, p. 478-85, May 1996.

20. DE OLIVEIRA, R. R. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. **J Periodontol**, v. 78, n. 6, p. 965-73, Jun 2007.
21. EKE, P. I. et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. **J Periodontol**, v. 86, n. 5, p. 611-22, May 2015.
22. FAVERI, M. et al. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, n. 2, p. 112-8, Apr 2008.
23. FERES, M. et al. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. **J Clin Periodontol**, v. 29, n. 8, p. 724-35, Aug 2002.
24. SOARES, G. M. et al. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 12, p. 1149-58, Dec 2012.
25. FONTANA, C. R. et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **J Periodontal Res**, v. 44, n. 6, p. 751-9, Dec 2009.
26. GIANNELLI, M. et al. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 10, p. 962-70, Oct 2012.
27. GIANNOPOULOU, C.; CAPPUYNS, I.; MOMBELLI, A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 11, p. 996-1002, Nov 2003.
28. HAFFAJEE, A. D. et al. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 5, p. 324-34, May 1997.
29. HAMLET, S. et al. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 232-5, Mar 2004.

30. HEITZ-MAYFIELD, L. J. et al. A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 29 Suppl 3, p. 92-102; discussion 160-2, 2002.
31. HERRERA, D. et al. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 45-66, Sep 2008.
32. Herrera, D. et al. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v. 29 Suppl 3, p. 136-59; discussion 160-2, 2002.
33. ISHIKAWA, I.; AOKI, A.; TAKASAKI, A. A. Clinical application of erbium:YAG laser in periodontology. **J Int Acad Periodontol**, v. 10, n. 1, p. 22-30, Jan 2008.
34. ISHIKAWA, I. et al. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? **Periodontol 2000**, v. 50, p. 90-126, 2009.
35. KAMMA, J. J. et al. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, n. 5, p. 314-21, Oct 2004.
36. KOMERIK, N. et al. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 932-40, Mar 2003.
37. LEE, J. H. et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy on human periodontal ligament cells: in vitro study. **Lasers Med Sci**, v. 33, n. 3, p. 469-477, Apr 2018.
38. LINDHE, J. et al. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 2, p. 115-28, Mar 1982.
39. LOE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. **J Periodontol**, v. 36, p. 177-87, 1965 May-Jun 1965.

40. LOESCHE, W. J.; GROSSMAN, N. S. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 727-52, table of contents, Oct 2001.
41. LUCHESI, V. H. et al. Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 8, p. 781-8, Aug 2013.
42. LULIC, M. et al. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 8, p. 661-6, Aug 2009.
43. MAGNUSSON, I. et al. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. **J Clin Periodontol**, v. 11, n. 3, p. 193-207, Mar 1984.
44. MARTINS, S. H. L. **Efeitos clínicos e microbiológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento cirúrgico da Periodontite Crônica: Um estudo clinico do tipo boca-dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego.** Tese. Universidade de São Paulo (Mestrado em Periodontia). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2016: 121p.
45. MARTINS, S. H. L. et al. Effect of surgical periodontal treatment associated to antimicrobial photodynamic therapy on chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 44, n. 7, p. 717-728, Jul 2017.
46. MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. **J Photochem Photobiol B**, v. 79, n. 2, p. 159-70, May 2005.
47. MOMBELLI, A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. **Periodontol 2000**, v. 76, n. 1, p. 85-96, Feb 2018.
48. MOMBELLI, A. et al. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycescomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. **J Periodontol**, v. 71, n. 1, p. 14-21, Jan 2000.

49. MONZAVI, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 14, p. 93-7, Jun 2016.
50. MOREIRA, A. L. et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. **J Periodontol**, v. 86, n. 3, p. 376-86, Mar 2015.
51. MOREIRA, A. L. G. **Efeitos clínicos, microbiológicos e imunológicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento não cirúrgico da Periodontite Agressiva: um estudo clínico do tipo boca dividida, controlado, aleatorizado e duplo-cego.** Tese. Universidade de São Paulo (Mestrado em Periodontia). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2014: 120p.
52. MÜLLER CAMPANILE, V. S. et al. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 1, p. 27-34, Jan 2015.
53. NASTRI, L. et al. Effects of toluidine blue-mediated photodynamic therapy on periopathogens and periodontal biofilm: in vitro evaluation. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 23, n. 4, p. 1125-32, 2010 Oct-Dec 2010.
54. NOVAES, A. B. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 2, p. 389-95, Mar 2012.
55. O'LEARY, T. J.; KOERBER, L. G.; CATHERMAN, J. L. Preparing dental hygiene students for expanded functions. **J Dent Educ**, v. 36, n. 10, p. 18-24, Oct 1972.
56. OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann Periodontol**, v. 1, n. 1, p. 821-78, Nov 1996.

57. PALLASCH, T. J. Global antibiotic resistance and its impact on the dental community. **J Calif Dent Assoc**, v. 28, n. 3, p. 215-33, Mar 2000.
58. POLANSKY, R. et al. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 7, p. 575-80, Jul 2009.
59. PRESHAW, P. M. Definitions of periodontal disease in research. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 1, p. 1-2, Jan 2009.
60. QADRI, T. et al. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 7, p. 714-9, Jul 2005.
61. QIN, Y. et al. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. **Lasers Med Sci**, v. 23, n. 1, p. 49-54, Jan 2008.
62. QIN, Y. L. et al. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 2, p. 162-7, Apr 2008.
63. QUE, M. L.; ANDERSEN, E.; MOMBELLI, A. Myeloid-related protein (MRP)8/14 (calprotectin) and its subunits MRP8 and MRP14 in plaque-induced early gingival inflammation. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 11, p. 978-84, Nov 2004.
64. RAMOS, U. D. et al. 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**, v. 43, n. 2, p. 147-55, Feb 2016.
65. RAMS, T. E.; DEGENER, J. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. **J Periodontol**, v. 85, n. 1, p. 160-9, Jan 2014.
66. ROSLING, B. et al. The use of PVP-iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 11, p. 1023-31, Nov 2001.

67. SALEH, A. et al. Comparison of adjunctive azithromycin and amoxicillin/metronidazole for patients with chronic periodontitis: preliminary randomized control trial. **Aust Dent J**, v. 61, n. 4, p. 469-481, Dec 2016.
68. SAMPAIO, E. et al. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 9, p. 838-46, Sep 2011.
69. SCHWARZ, F. et al. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 29-44, Sep 2008.
70. SEGARRA-VIDAL, M. et al. Effects of photodynamic therapy in periodontal treatment: A randomized, controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 44, n. 9, p. 915-925, Sep 2017.
71. SEGELNICK, S. L.; WEINBERG, M. A. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? **J Periodontol**, v. 77, n. 9, p. 1598-601, Sep 2006.
72. SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, v. 83, n. 10, p. 1257-69, Oct 2012.
73. SIGUSCH, B. W. et al. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. **J Periodontol**, v. 81, n. 7, p. 975-81, Jul 2010.
74. SLAMA, T. G. et al. A clinician's guide to the appropriate and accurate use of antibiotics: the Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy (CARAT) criteria. **Am J Med**, v. 118 Suppl 7A, p. 1S-6S, Jul 2005.
75. SMITH, G. L.; SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C. M. Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**, v. 4, n. 1, p. 41-6, Mar 1989.

76. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. **Compend Suppl**, n. 18, p. S684-5, 688-93; quiz S714-7, 1994.
77. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; DZINK, J. L. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. **J Clin Periodontol**, v. 15, n. 7, p. 440-4, Aug 1988.
78. SOCRANSKY, S. S. et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, v. 17, n. 4, p. 788-92, Oct 1994.
79. STEIN, E. et al. Phenothiazine chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 1, p. 71-7, Feb 2009.
80. STINGU, C. S. et al. Association of periodontitis with increased colonization by *Prevotella nigrescens*. **J Investig Clin Dent**, v. 4, n. 1, p. 20-5, Feb 2013.
81. TAKASAKI, A. A. et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. **Periodontol 2000**, v. 51, p. 109-40, 2009.
82. TAKEUCHI, Y. et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. **J Periodontol**, v. 74, n. 10, p. 1460-9, Oct 2003.
83. TALEBI, M. et al. Microbiological Efficacy of Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-surgical Periodontal Treatment: A Clinical Trial. **J Lasers Med Sci**, v. 7, n. 2, p. 126-30, 2016.
84. TANNER, A. et al. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 85-98, Feb 1998.
85. THEODORO, L. H. et al. Treatment of Periodontitis in Smokers with Multiple Sessions of Antimicrobial Photodynamic Therapy or Systemic Antibiotics: A Randomized Clinical Trial. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, Apr 2018.
86. TRIBBLE, G. D.; LAMONT, R. J. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. **Periodontol 2000**, v. 52, n. 1, p. 68-83, Feb 2010.

87. VOHRA, F. et al. Short-term effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in obese patients with chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 21, p. 10-15, Mar 2018.
88. WAERHAUG, J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. I. As observed in human biopsy material. **J Periodontol**, v. 49, n. 1, p. 1-8, Jan 1978a.
89. WAERHAUG, J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. **J Periodontol**, v. 49, n. 3, p. 119-34, Mar 1978b.
90. WESTFELT, E. et al. Improved periodontal conditions following therapy. **J Clin Periodontol**, v. 12, n. 4, p. 283-93, Apr 1985.
91. WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, n. 5, p. 412-8, May 2004.
92. XAVIER, M. et al. Low-level light-emitting diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 1, p. 85-90, Jan 2014.

Anexos

Anexos

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza e Uislen Berian Cadore (denominados Pesquisadores) convidamos o(a) Sr(a) portador(a) do RG _____ e CPF _____, (denominado participante da pesquisa) a participar da pesquisa, cujo título é **“Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como coadjuvante na terapia cirúrgica de acesso à raspagem em pacientes com Periodontite Crônica Avançada”**. Através deste Termo de Consentimento o participante da pesquisa autoriza a sua participação na pesquisa, pois foram dadas todas as informações necessárias para que ele pudesse tomar esta decisão. Este documento foi elaborado em duas vias de igual valor e conteúdo para o participante da pesquisa ler e assinar, caso ele aceitasse participar da pesquisa, ficando ele com uma das vias.

O participante da pesquisa fica ciente de que:

1. A pesquisa é de responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza e tem a participação do mestrando em Periodontia Uislen Berian Cadore.
2. Esta pesquisa será feita para que se possam verificar os benefícios da ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana. Para isso, o mestrando fará alguns exames antes e depois de executar as cirurgias nos dentes do participante da pesquisa selecionado. O tratamento da gengiva de toda a boca do participante da pesquisa será também realizado pelo mestrando Uislen B. Cadore.
3. Os produtos que serão usados no tratamento do participante da pesquisa são registrados por órgãos internacionais e/ou pelo governo brasileiro e não oferecem risco à saúde.
4. Os procedimentos que poderão causar incômodo ao participante da pesquisa são: exames que serão feitos na boca, fotografias, limpeza dos dentes e anestesia. Depois das cirurgias, o local poderá ficar um pouco inchado e o participante da pesquisa poderá sentir dor, mas será explicado e dado por escrito a ele as recomendações para diminuir a chance de isso ocorrer. Além disso, será receitado depois das cirurgias um remédio analgésico e antiinflamatório para diminuir a chance de inchar e para aliviar a dor do participante da pesquisa.
5. Serão realizadas terapias diferentes, uma em cada lado da boca, sendo uma considerada controle e a outra experimental, como tratamentos para uma mesma doença. A terapia que possivelmente promoverá benefícios extras será disponibilizada a todos os participantes da pesquisa.
6. O participante da pesquisa 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.

7. Fica garantido ao participante da pesquisa que o Uislen B. Cadore o acompanhará desde o primeiro exame até o final do seu tratamento da gengiva, estando ele à disposição para tirar dúvidas durante o tratamento.
8. O participante da pesquisa pode não querer participar desta pesquisa ou pode retirar o seu consentimento a qualquer hora, sem receber penalização e sem prejudicar o seu atendimento.
9. Os dados do participante da pesquisa ficarão arquivados na FORP-USP e somente serão usados na publicação da pesquisa. Haverá total garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos dados durante todas as fases da pesquisa.
10. Conforme a Resolução CNS 466/2012, é garantido ao participante da pesquisa o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo. Fica garantido, também, que o participante da pesquisa terá assistência, se acontecer algum problema à sua saúde comprovadamente causado devido à sua participação nesta pesquisa.
11. O participante da pesquisa se compromete a comparecer às consultas marcadas, no horário combinado, e a seguir as orientações dadas pelo mestrando Uislen Berian Cadore.
12. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência total ao paciente durante a pesquisa. Se necessário, o participante poderá entrar em contato com Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza (tel. (16) 3602-4141 / e-mail: scombatti@forp.usp.br), com Uislen Berian Cadore (tel. (47) 9121-7545 / (47) 9917-2639, e-mail: uislenc@hotmail.com).
13. O participante da pesquisa que sofrer qualquer dano ou prejuízo comprovadamente decorrente da pesquisa será indenizado dos gastos decorrentes desse dano.
14. O participante da pesquisa foi informado que pode comunicar suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à participação na pesquisa caso sinta vontade, por escrito à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa - FORP/USP, desde que se identifique, sendo que o seu nome será mantido em anonimato.
15. O participante da pesquisa confirma o recebimento de uma via do Termo de Consentimento idêntica a que será arquivada com os pesquisadores, devidamente assinada pelos pesquisadores e o participante da pesquisa na última folha e rubricada nas demais folhas.

Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza - CPF: 078.945.798-90

Uislen Berian Cadore – CPF: 060.588.819-19

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

Participante da pesquisa

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Comitê de Ética em Pesquisa

Tel.: (16) 3602-0493/ E-mail: cep@forp.usp.br

Horário de atendimento: das 8 às 12 horas, de segunda a sexta-feira

Anexo B - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em aplicações múltiplas como coadjuvante na terapia cirúrgica de acesso à raspagem em pacientes com Periodontite Crônica Avançada

Pesquisador: Sérgio Luís Scombatti de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 58437816.3.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.707.546

Apresentação do Projeto:

O projeto está corretamente enquadrado na área temática e a metodologia proposta é adequada. Os antecedentes científicos justificam a execução da mesma. A temática proposta é original e importante para a área da saúde humana. O projeto está bem estruturado, com revisão bibliográfica adequada, pertinente ao tema e atualizada. Os pesquisadores apresentam formação acadêmica adequada para desenvolver o projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Estudos anteriores vem demonstrando resultados promissores na associação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com o tratamento das doenças periodontais. Com bases nos estudos publicados, acredita-se que a utilização de um protocolo de aplicações múltiplas de terapia fotodinâmica apresente resultados positivos com melhoras clínicas, diminuição dos microrganismos periodontopatógenos e melhora nas citocinas antiinflamatórias.

Objetivo Primário:

Avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em aplicações múltiplas como adjuvante ao tratamento periodontal cirúrgico para descontaminação de bolsas periodontais através de raspagem e alisamento em pacientes diagnosticados com Periodontite Crônica

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 1.707.546

Avançada.

Objetivo Secundário:

Avaliar parâmetros clínicos (Índice de placa, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, mobilidade dentária, recessão gengival e nível de inserção clínica) prévios e após a realização do procedimento cirúrgico combinado ou não à aplicação de TFDa; Avaliar os níveis de citocinas e marcadores do metabolismo ósseo prévios e após a realização do procedimento cirúrgico combinado ou não à aplicação de TFDa; Avaliar a microbiota periodontopatogênica subgengival prévia e após a realização do procedimento cirúrgico combinado ou não à aplicação de TFDa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Depois das cirurgias, o local poderá ficar um pouco inchado e o participante da pesquisa poderá sentir dor, mas será orientado e prescrito medicação analgésica e anti-inflamatória para diminuição do risco.

Benefícios:

Estabilização da doença periodontal com diminuição do nível clínico de inserção, diminuição do sangramento gengival e diminuição dos patógenos periodontais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 195ª Reunião Ordinária do CEP, realizada em 31/08/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	04/08/2016		Aceito

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 1.707.546

Básicas do Projeto	ETO_747764.pdf	23:14:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Uislen_B_Cadore.docx	04/08/2016 23:13:20	Uislen Berian Cadore	Aceito
Outros	Declaracaodeparticipacaodepesquisa.doc	28/06/2016 15:23:00	Uislen Berian Cadore	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_da_Infraestrutura_de_laboratorios.pdf	28/06/2016 15:17:09	Uislen Berian Cadore	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_da_Infraestrutura_de_clinicas.pdf	28/06/2016 15:16:50	Uislen Berian Cadore	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoUislenBerianCadore.docx	28/06/2016 15:10:02	Uislen Berian Cadore	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoPlataformaBrasil.pdf	28/06/2016 14:28:30	Uislen Berian Cadore	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 01 de Setembro de 2016

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

Anexo C - Artigo científico para submissão no periódico *Journal of Periodontology*.

**Multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy
associated to surgical periodontal treatment in patients with
chronic periodontitis**

Authors

Uislen B. Cadore*; Marília B. L. Reis*; Sergio H. L. Martins*, Marcos de M. Invernici*; Arthur B. Novaes Jr.*, Mario Taba Jr.*, Daniela B. Palioto*, Michel R. Messoria*; Sérgio L. S. Souza*

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Sérgio L. S. Souza, DDS, MS

Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology

Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo – USP

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

scombatti@forp.usp.br

Word count: 3769

figures and tables: 6

References: 50

Short title: Antimicrobial photodynamic therapy in chronic periodontitis

One-sentence summary: A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana apresenta resultados clínicos favoráveis no tratamento cirúrgico da Periodontite crônica severa.

Abstract

Background: This double-blind randomized controlled clinical trial assessed the efficacy of multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as an adjunct to surgical periodontal treatment (ST) in patients with severe chronic periodontitis (SCP).

Material and methods: Sixteen patients with SCP were treated with aPDT+ST (Test Group, TG) or ST only (Control Group, CG), in a split mouth design. aPDT was applied at 0, 2, 7, and 14 postoperative days only in TG. All patients were followed up for 90 days after surgery. The following clinical and microbiological parameters were assessed: clinical attachment level (CAL), probing depth (PD), gingival recession (GR), bleeding on probing (BOP), plaque index (PI), and count of 40 subgingival microbial species (checkerboard DNA-DNA hybridization). Data were collected at baseline (pre-intervention), at 60 days (30 days after the end of nonsurgical therapy), and at 150 days (90 days after surgery).

Results: A significant reduction in PD was observed at 150 days for the TG, when compared to the CG ($p < 0.05$). CAL gain was significantly higher in the TG at 60 and 150 days ($p < 0.05$). Changes in the subgingival microbiota were similar between the groups ($p > 0.05$), but the TG revealed a larger number of bacteria associated with periodontal disease at the end of the experiment compared to the CG ($p < 0.05$).

Conclusion: Multiple sessions of aPDT as an adjunct to surgical periodontal treatment significantly improved clinical parameters at 90 postoperative days.

Keywords: Chronic Periodontitis; Photodynamic Therapy; Antimicrobial.

Introduction

Periodontitis is a multifactorial disease that affects tooth supporting tissues. Several predisposing factors (genetic, environmental, systemic) are involved in its pathogenicity and may alter their expression and the patient's susceptibility to its development.¹ Scaling and root planing (SRP) is the gold standard treatment for periodontitis.² However, SRP instrumentation techniques are not always effective in eliminating microbial and mineralized deposits in more severe cases of the disease. Conventional treatment of severe chronic periodontitis (SCP) is largely based on nonsurgical SRP: adjunctive antimicrobial therapies and surgical interventions are indicated only for specific cases. New adjunctive therapies have been investigated so as to offer better outcomes with mechanical treatment, such as antibiotic and laser therapies, including antimicrobial photodynamic therapy (aPDT).^{3,4}

The mechanism of action of aPDT consists in the combination of a light source at a wavelength that is adequate for the therapeutic window with a photosensitizing agent that becomes excited when activated, going from a state of singlet oxygen to a state of doublet or triplet oxygen.⁵ This change in state causes the transfer of electrons which react with molecular oxygen and produce reactive oxygen species that are cytotoxic to the target cells, leading to cell necrosis and microbial death.⁶ The use of aPDT as an adjunct to conventional periodontal therapy has been suggested as an alternative for the elimination of periodontopathogens from the subgingival region, as its efficacy in killing microorganisms attached to the dental biofilm has been corroborated by *in vitro*⁷ and *in vivo* studies.^{8,9}

As deep periodontal pockets are not easily and properly decontaminated with nonsurgical therapy,¹⁰ additional procedures are necessary in order to obtain appropriate

clinical outcomes. Surgical access procedures for root decontamination and the use of adjunctive therapies such as aPDT should be considered for these cases. Some studies on the application of aPDT to patients with chronic periodontitis are available in the literature.^{11, 12} However, no experiments have evaluated the effects of multiple sessions of aPDT as an adjunctive therapy to surgical periodontal treatment. Therefore, the aim of this study was to assess the clinical effects and changes in the subgingival microbiota obtained from the association of multiple sessions of aPDT with the surgical treatment of SCP.

Material and Methods

Patients

This study was a double-blind randomized controlled split-mouth clinical trial. Volunteers were selected from the local population treated at the Periodontal Clinic of the Graduate Program in Dentistry of FORP-USP. Sixteen patients diagnosed with severe Chronic Periodontitis (classified according to the American Academy of Periodontology¹³) were included. Patients should have a good systemic health, interproximal attachment loss in at least two posterior sextants with three or more sites with Probing Depth (PD) greater than 5 mm, and indication for surgical treatment in at least two contralateral posterior sextants. Presence of proximal periodontal sites with PD and Clinical Attachment Loss (CAL) $\geq$ 5 mm, Bleeding on Probing (BOP), age over 30 years, and presence of at least 15 teeth, excluding third molars and teeth requiring extraction, were also utilized as inclusion criteria. The exclusion criteria were positive history of antibiotic therapy in the past 6 months, basic periodontal treatment in the past 6 months, systemic involvement that could interfere with disease progression or with the response to treatment, extensive prosthetic involvement, need for antibiotic prophylaxis

for dental procedures, use of anti-inflammatory drugs for a long period of time, smoking, and pregnancy. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Ribeirão Preto (FORP-USP) Dental School (Process no. 58437816.3.0000.5419) and registered in ClinicalTrials.gov (NCT03498404). Research was conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2013) and the additional requirements. Upon signing the free and informed consent form, volunteers were told about the objectives, benefits, risks, and discomfort that could be associated with the dental procedures.

Sample size calculation

The patient was considered the study unit, and the changes in probing pocket depth (PPD) was the primary outcome variable. The sample size was estimated to provide 80% power, in order to recognize a significant difference of 1 mm (δ) between groups, with a 95% confidence interval ($\alpha = 0,05$), and intragroup standard deviation of 1 mm (Müller Campanile et al.³⁴). Therefore, the sample should include at least 16 patients.

Study design

Prior to the study, the selected volunteers received supragingival scaling, oral hygiene instructions, and had plaque retentive areas removed. Two contralateral single-rooted or multi-rooted posterior teeth presenting interproximal periodontal sites with PD ≥ 5 mm were selected for clinical and microbiological analyses. A specialist in periodontics then performed quadrant-wise SRP during 4 weeks. The selected teeth were assigned to the Test Group (TG) or Control Group (CG) using a random number table (www.randomization.com). The TG teeth received SRP combined with aPDT at 0, 2, 7, and 14 postoperative days.¹⁴ The teeth in the CG received SRP associated with a “sham procedure,” in which aPDT was simulated using saline solution rather than a

photosensitizing dye; the laser point was positioned but not activated, thus blinding the patients to the study protocol. Biofilm formation was controlled on a weekly basis during the first 30 postoperative days and on a monthly basis up to postoperative day 90. Periodontal and microbiological clinical parameters were assessed at baseline (T1 = pre-intervention), after basic therapy (T2 = reassessment, 60 days after baseline), and 90 days after the surgical procedure (T3, 150 days after baseline). The experimental design is shown in Figure 1.

A researcher who had not taken part in the clinical procedures and/or sample collections was in charge of allocating the selected teeth to the appropriate groups. Sealed, non-transparent envelopes, properly identified, were used for this purpose. The envelopes were opened and the groups were revealed only at the end of the surgical procedure and of root decontamination on both treated sides. Periodontal clinical assessments and subgingival biofilm collection were performed by a single trained and calibrated researcher, blinded to the experimental groups. The remaining SRP procedures, surgical treatment, aPDT, and postoperative follow-up were carried out by another trained researcher.

Clinical assessment

The following periodontal clinical parameters were assessed at four sites (mesiobuccal, mesiolingual, distobuccal, and distolingual) of each selected tooth: probing depth (PD, in mm); clinical attachment level (CAL, in mm); gingival recession (GR, in mm); bleeding on probing (BOP), dichotomously evaluated – regarded as positive when bleeding occurred up to 20 seconds after the insertion of a graduated probe for PD measurement; plaque index (PI), assessed dichotomously¹⁵ and calculated as the

percentage of tooth surfaces with plaque/biofilm (score 1 indicated sites with plaque and score 0 indicated absence of plaque).

Microbiological monitoring

The selected teeth were isolated using sterile, air-dried cotton rolls to avoid contamination of the site with salivary flow. The supragingival plaque was carefully removed with a sterile Gracey curette. Thereafter, another sterile Gracey curette was used for collection of subgingival microbiota from the mesial and distal regions, going coronally from the deepest portion of the pocket towards each of the selected dental elements. Immediately after the collection, the sample obtained from each site was stored in a sterile *Eppendorf* tube containing 150 μ L of buffer [10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7.6]. One hundred microliters of sodium hydroxide (NaOH) at 0.5 M was added and stored at -80 °C. *Checkerboard* DNA-DNA hybridization was used for the count of 40 subgingival bacterial species in each sample.¹⁶⁻¹⁸

Surgical periodontal treatment

Surgical procedures were performed 4 weeks after last session of scaling and root planing (T2 = 60 days after baseline) on both Test and Control Groups (Figure 2). Those patients with PD $\geq$ 5 mm and BOP underwent surgery for root decontamination. All surgical procedures were carried out by a single researcher with expertise in periodontics. After infiltrative local anesthesia, an intrasulcular incision with 15C scalpel blade was performed, encompassing the site with PS $\geq$ 5mm and both (mesial and distal) adjacent teeth, preserving gingival papillae. A mucoperitoneal flap was raised and after that, scaling and root decontamination were performed using Gracey curettes and ultrasonic devices. After SRP were concluded on both sides, the envelope with information about

the randomization process was opened, and aPDT was then carried out in the TG. A sham procedure was performed on the contralateral side in the CG. After the procedures were completed in each group, the flaps were replaced and sutured with 5-0 nylon sutures. Paracetamol 750mg, 6/6 hours for 2 days was prescribed for pain. Sutures were removed 14 days after surgery.

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) protocol

Intraoperative protocol

The selected area was irrigated with saline solution and dried with sterile gauze to prevent bleeding. Thereafter, 10 mg/mL of phenothiazine chloride (Helbo Blue, Helbo Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria) was applied and left in contact with the root surface for 5 minutes.⁹ Subsequently, the area was irrigated with saline solution and irradiated with laser diode at 660 nm, with maximum power of 60 mW/cm² and energy density of 0.6 J/cm² (HELBO® *TheraLite Laser*, Bredent Medical GmbH & Co, Germany), during 60 seconds per site. Treatment was performed on six sites (mesiobuccal, buccal, distobuccal, mesiopalatal/mesiolingual, palatal/lingual, and distopalatal/distolingual) per tooth, totaling 6 minutes of laser exposure. An additional 60 seconds was used for teeth presenting furcation defects, applying laser light inside the furcation area.

Postoperative protocol

The aPDT protocol was maintained in the TG at 2, 7, and 14 postoperative days, as described by Ramos *et al.*¹⁴: laser light was applied for 10 seconds per site on six sites per tooth, totaling 1 minute of exposure. Teeth with furcation involvement were exposed for another 10 seconds.

Statistical analysis

The mean and standard deviation of PD, CAL, and GR were calculated for the different groups and experimental periods. Absolute and relative frequencies were calculated for BOP and PI. Within-group differences in the three experimental periods were assessed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-hoc test. Intergroup differences were determined by repeated-measures ANOVA and Student's paired t test. The between groups variations in PD, CAL, and GR (at 60 and 150 days, compared to baseline) were assessed by Student's paired t test. Statistical significance was set as $p < 0.05$.

The mean bacterial count ($\times 10^5$) was calculated for each pair of sites in the same teeth. The mean count of each species was then obtained for the different groups and experimental periods. The data were grouped into complexes, as described by Socransky *et al.*²⁰ The within-group differences in the mean counts of each bacterial species were assessed by Bonferroni's test. The analyses were fitted for multiple comparisons, as described by Socransky *et al.*²¹ The between-group analysis of variations in the mean count of each bacterial species at 60 and 150 days compared to baseline was made using Student's paired t test. Within-group and between-group differences in the mean relative frequencies for bacterial complexes were assessed by Bonferroni's test and Student's t test, respectively.

Results

All of the patients included in the sample completed the study. No discomfort or adverse effect was reported during the experimental period. Postoperative healing was uneventful in all cases after surgical periodontal treatment.

The clinical parameters evaluated in the CG and TG are shown in Table 1. At T1, there were no statistically significant differences between groups. No significant differences were found for CAL and GR in other experimental periods. At T3, PD was significantly lower for the TG when compared to the CG ($p < 0.05$). By analyzing within-group differences, PD significantly decreased when baseline values were compared to 150 days and 60 days vs. 150 days in the CG and TG. However, there was a remarkable reduction in CAL between T1 and T3 and between T2 and T3 in the TG. There was an increase in GR when baseline values were compared to 150 days and 60 days in both groups, while no significant differences between groups in PI and BOP were observed, both groups showed a statistically significant reduction in these parameters in the within-group comparisons.

Table 2 shows the mean variations in clinical parameters for the experimental periods, in absolute and percentage values for each group. PD demonstrated a significant decrease in the within-group comparisons between 0-60 days and 0-150 days and between 0-60 days and 60-150 days for the CG and TG, respectively. A statistically significant difference was between groups in the 60-150 days range. Another interesting finding was the significantly larger increase in CAL in the TG when compared to the CG for the 60-150 days variation. This difference can also be seen in the within-group analysis for the TG between 0-60 and 0-150 days and between 0-60 and 60-150 days. BOP showed statistical difference only in the within-group analysis: a significant difference was found in the TG between 0-60 and 0-150 days, and in the CG between 0-60 and 0-150 days and between 0-60 and 60-150 days. There were no statistically significant differences in PI both for within-group and between-group analyses.

In general, the volunteers treated in the present study had a high count of orange and red complex periodontopathogens at baseline. Figure 3 shows the mean total count ($\times 10^5$) of the 40 subgingival species throughout the experimental period in the CG and TG, as well as the statistically significant differences observed in the mean counts of each group at 60 and 150 days, when compared to baseline values. The experimental groups had similar results in the microbiological analysis, without any significant differences between them. In the within-group analysis, red complex bacteria did not show significant difference for any of the groups in the different experimental periods. The TG revealed a significant reduction in the count of *F. nucleatum* (orange complex) at 60 and 150 days compared to baseline. Both groups showed a significant increase in the count of orange complex bacterium *C. gracillis* at 150 days and in the count of blue complex bacterium *A. naeslundii* I when compared to baseline. Moreover, the counts of other bacteria also increased: *S. sanguinis* (yellow complex), *A. odontolyticus* (purple complex), and *S. anginosus* (non-oral bacterial complex).

Experimental groups showed a significant increase in the count of *C. gracillis* (orange complex), *A. naeslundii* I (blue complex), *S. sanguinis* (yellow complex), and *A.a* and other three species – *L. buccalis*, *S. anginosus*, and *T. Socranskii* – at 150 days when compared to 60 days. In addition, the CG had a significant increase in the count of *P. nigrescens* (orange complex), whereas the TG exhibited an increase in the count of *A. gerencseriae* and *A. viscosus* (blue complex).

The mean relative frequency of microbiological complexes is displayed in Figure 4. No statistical differences were observed in bacterial complexes between the groups in the different experimental periods. The within-group analysis revealed a significant increase in orange complex bacteria at 60 days when compared to baseline bot for the CG

and TG. Moreover, the non-oral bacterial complex showed a significant decrease at 60 days compared to baseline and an increase between 60 days and 150 days, but these differences were statistically significant only for the CG.

Discussion

The present double-blind randomized controlled split-mouth clinical trial assessed the efficacy of multiple sessions of aPDT as an adjunct to surgical periodontal treatment of severe chronic periodontitis, by analyzing clinical and microbiological parameters. Results indicate some beneficial clinical effects of multiple sessions of aPDT. Previous experiments that associated aPDT with conventional nonsurgical treatment yielded controversial results and had some discrepancies in their protocols.^{8,23-26} The conflicting results described in the literature might be due to the heterogeneity of aPDT protocols, differences in light sources, in photosensitizing agents, and in length of analysis, which hinders the comparison among studies.

Even though there are important studies on the association of SRP procedures with multiple sessions of aPDT,^{8,11,14} there is a paucity of studies that associate this therapeutic method with the surgical treatment of periodontal disease. Martins *et al.*¹² associated a single intraoperative session of aPDT with the surgical treatment of SCP, and observed a decrease in PD at 90 postoperative days when compared to baseline (with an average of 2.30 mm in the CG and 2.93 mm in the TG). These findings are in line with the ones obtained in the present study, which revealed mean reductions of 2.50 mm and 3.13 mm for the CG and TG, respectively, for the same time periods. Similar reductions were reported by Giannelli *et al.*,²⁷ who removed the inner epithelium of the periodontal pocket prior to aPDT using high-power laser, obtaining reductions of 0.9 mm (4.9 ± 0.1 to

4.0±0.1) for PD in the CG and of 3.0 mm (5.1±0.1 to 2.1±0.1) in the TG, when compared baseline to 350 days pos-treatment.

When aPDT was used as an adjunct to nonsurgical periodontal treatment, there were less remarkable reductions than those observed in studies in which surgical techniques are combined.^{3, 28} A possible explanation for the larger reductions in the present study, comparatively to those which described nonsurgical treatment, is that surgical debridement itself contributes to reducing PD.^{29, 30} Moreover, surgical access can enhance the penetration of photosensitizing agents into epithelial and connective tissues, thus eliminating periodontopathogens found therein.³¹ Also, there could be a biomodulatory effect triggered by low-power laser on local cells during tissue healing, improving tissue repair and reducing periodontal inflammation.³²

Another important finding of the present study concerns the significant CAL gain in the TG in different time periods, as well as in the comparison between the TG and CG at 90 days post-surgery. This suggests clinical superiority of multiple sessions of aPDT in the surgical treatment of SCP, since there were significant differences in PD but not in CAL in a previous study that evaluated a single session of aPDT.¹²

Despite the favorable clinical findings obtained herein, studies on nonsurgical clinical SRP procedures combined with multiple aPDT sessions have yielded controversial results.^{8, 33} However, a study addressing the clinical outcomes obtained from one or more sessions of aPDT as an adjunct to nonsurgical SRP showed that after 3 and 6 months no periodontal site had PD greater than 4 mm or presence of BOP in the group of multiple sessions, but three sites with large PD and BOP remained after the single session.³⁴

According to the American Academy of Periodontology,³⁵ current evidence indicates that laser therapies, such as aPDT, in isolation or as an adjunct, are unpredictable and inconsistent in their ability to reduce subgingival microbial loads beyond that achieved by SRP alone. Studies demonstrating significant reductions in periodontopathogens^{19, 36}, as well as studies showing no significant changes in the subgingival microbiota^{24, 37}, are described in the literature.

The present study did not show significant differences in subgingival bacterial complexes between the experimental groups at 150 days. Nevertheless, there were decreases, albeit nonsignificant, in the percentage of red complex bacteria during the follow-up period both for the TG and CG. Periodontal sites with a high count of red complex bacteria are at a greater risk for attachment loss³⁸ and also show more severity and progression of periodontal disease.³⁹ On the other hand, significant increases were observed in the count of bacteria in the orange complex (*C. gracillis*), yellow complex (*S. sanguinis*), and blue complex (*A. naeslundii* I) in both groups. The increase of these bacterial complexes at 150 days suggests possible subgingival recolonization at 90 days. In a recent review, Mombelli⁴⁰ asserted that treated sites are prone to be recolonized with a similar microbiota to that which had been detected prior to therapy, and that the level and speed of recolonization depend on the treatment protocol, on the patterns of distribution of periodontal microorganisms in other areas of the oral cavity, and on the patient's oral hygiene. Magnusson *et al.*⁴¹ demonstrated possible subgingival recolonization after SRP within 4 to 8 weeks.

According to the within-group analysis in the present study, the CG had a significant increase in the count of *P. nigrescens* (orange complex) at 150 days, which has been associated with a large percentage of sites with BOP,⁴² observed more frequently

in the subgingival microbiota of patients with CP.⁴³ In the TG, aPDT led to a significant increase in the count of *A. gerencseriae* and *A. viscosus*, which are associated with periodontal health. These positive changes in the rates of host-compatible bacterial species, observed only in the TG, play an important role in the efficacy of periodontal treatment.⁴⁴

Although there is a cause and effect relationship between the buildup of microbial deposits and gingival inflammation,⁴⁵ environmental factors,⁴⁶ as well as host-specific factors that modulate inflammatory response to microbial colonization,⁴⁷ may play a key role in the development of periodontal disease. Despite the hypothesis of the subgingival microbiota recolonization at the end of the study, significant clinical improvement of PD and CAL in the TG was maintained at 90 postoperative days. A possible explanation for this finding is the potential beneficial effect of low-power laser on tissue healing, which inhibits the expression of proinflammatory cytokines, reducing local inflammatory reactions.⁴⁸

Among the limitations of the present study, probably the 90-day interval for reassessment of the therapeutic effects is too long for confirmation of microbiological results and should therefore be reconsidered.⁴⁹ A suggestion for future studies is to consider additional 30 and/or 60 postoperative days. Furthermore, the experimental design might have influenced the results: placement of a cannula for application of the photosensitizing agent and insertion of an optical fiber for laser irradiation at subgingival sites in early postoperative periods (2, 7, and 14 days) might have had a deleterious effect during the critical period of epithelial neoformation and of postoperative periodontal repair,⁵⁰ facilitating the penetration of periodontopathogens and subgingival bacterial recolonization. Finally, given the good clinical outcomes, future studies could include

immunological assessments of possible changes in the expression of cytokines at the treated sites.

The present study assessed the association of multiple sessions of aPDT as an adjunct to the surgical treatment of severe chronic periodontitis. Significant improvements were observed in clinical parameters, with a reduction in PD and gain in CAL as well as a numerical decrease in the percentage of red complex bacteria at 90 postoperative days. Moreover, despite the increase in the count of some bacterial species, suggesting the onset of recolonization of the subgingival microbiota, the TG exhibited a larger number of bacteria associated with periodontal diseases at the end of the experiment. It would be interesting to perform a larger number of microbiological assessments in earlier periods and to evaluate the results longitudinally in order to check whether the improvements in the clinical parameters will remain in the long run.

Conflict of Interest and Sources of Funding Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study. This study was financially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES, Brazil.

References

1. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):821-78.
2. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2011 Feb;55(1):36-47.

3. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Taba M. 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.
4. 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 Aug;29(8):724-35.
5. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010 Jan;81(1):4-14.
6. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005 May;79(2):159-70.
7. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):412-8.
8. Moreira AL, Novaes AB, Grisi MF, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2015 Mar;86(3):376-86.
9. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2008 Apr;43(2):162-7.
10. Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *J Periodontol*. 1978 Mar;49(3):119-34.
11. Bassir SH, Moslemi N, Jamali R, et al. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2013 Jan;40(1):65-72.

12. Martins SHL, Novaes AB, Taba M, et al. Effect of surgical periodontal treatment associated to antimicrobial photodynamic therapy on chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2017 Jul;44(7):717-28.
13. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.
14. Ramos UD, Ayub LG, Reino DM, et al. 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 Feb;43(2):147-55.
15. O'Leary TJ, Koerber LG, Catherman JL. Preparing dental hygiene students for expanded functions. *J Dent Educ*. 1972 Oct;36(10):18-24.
16. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994 Oct;17(4):788-92.
17. Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl*. 1994 (18):S684-5, 8-93; quiz S714-7.
18. Sampaio E, Rocha M, Figueiredo LC, et al. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011 Sep;38(9):838-46.
19. Novaes AB, 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.
20. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol*. 1988 Aug;15(7):440-4.

21. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol*. 1991 Nov;18(10):766-75.
22. Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol*. 1996 May;67(5):478-85.
23. 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 Oct;35(10):877-84.
24. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2008 Sep;79(9):1638-44.
25. Balata ML, Andrade LP, Santos DB, et al. 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 2013 Mar-Apr;21(2):208-14.
26. Vohra F, Akram Z, Bukhari IA, Sheikh SA, Javed F. Short-term effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in obese patients with chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Mar;21:10-5.
27. Giannelli M, Formigli L, Lorenzini L, Bani D. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012 Oct;39(10):962-70.
28. Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2010 Jul;25(4):605-13.

29. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L, Bratthall G. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study. *J Clin Periodontol*. 1982 Mar;9(2):115-28.
30. Westfelt E, Bragd L, Socransky SS, Haffajee AD, Nyman S, Lindhe J. Improved periodontal conditions following therapy. *J Clin Periodontol*. 1985 Apr;12(4):283-93.
31. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Mar;47(3):932-40.
32. Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. 2005 Jul;32(7):714-9.
33. Monzavi A, Chinipardaz Z, Mousavi M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Jun;14:93-7.
34. Müller Campanile VS, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombelli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lasers Med Sci*. 2015 Jan;30(1):27-34.
35. American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease. *J Periodontol*. 2011 Apr;82(4):513-4.
36. Nastri L, Donnarumma G, Porzio C, et al. Effects of toluidine blue-mediated photodynamic therapy on periopathogens and periodontal biofilm: in vitro evaluation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010 Oct-Dec;23(4):1125-32.

37. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 Jul;36(7):575-80.
38. Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, et al. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):232-5.
39. Beck JD, Koch GG, Rozier RG, Tudor GE. Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J Periodontol*. 1990 Aug;61(8):521-8.
40. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):85-96.
41. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol*. 1984 Mar;11(3):193-207.
42. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol*. 2000 Jan;71(1):14-21.
43. Stingu CS, Schaumann R, Jentsch H, Eschrich K, Brosteanu O, Rodloff AC. Association of periodontitis with increased colonization by *Prevotella nigrescens*. *J Invest Clin Dent*. 2013 Feb;4(1):20-5.
44. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):85-98.
45. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965 May-Jun;36:177-87.
46. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003 Nov;30(11):996-1002.

47. Que ML, Andersen E, Mombelli A. Myeloid-related protein (MRP)8/14 (calprotectin) and its subunits MRP8 and MRP14 in plaque-induced early gingival inflammation. *J Clin Periodontol*. 2004 Nov;31(11):978-84.
48. Lee JH, Chiang MH, Chen PH, Ho ML, Lee HE, Wang YH. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy on human periodontal ligament cells: in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2018 Apr;33(3):469-77.
49. Segelnick SL, Weinberg MA. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? *J Periodontol*. 2006 Sep;77(9):1598-601.
50. Caton JG, Zander HA. The attachment between tooth and gingival tissues after periodic root planing and soft tissue curettage. *J Periodontol*. 1979 Sep;50(9):462-6.

Figure legends

Figure 1. Experimental design

Figure 2. Figure 2: Surgical Therapy Description - Test Group: A) Initial case. Upper first premolar; B) Intra-sulcular incision with n° 15c blade; C) Total flap elevated exposing calculus and granulation tissue; D) decontaminated area and the bone defect; E) Application of phenothiazine hydrochloride photosensitizer; F) Irrigation with saline solution; G) Removal of excess photosensitizer; H) Activation of the diode laser on the dental surface (60s per site); I) Single sutures with 5-0 mononylon. J) Post-operative of 14 days; K) Application of the photosensitizer; L) Activation of the diode laser on the dental surface (10s per site).

Figure 3. Mean count ($\times 10^5$) of 40 bacterial species found in subgingival biofilm samples at baseline, at 60, and 150 postoperative days in both groups, as well as the results for the within-group comparisons. Significant differences when compared to baseline: (Ψ) Control Group – 150 days; (£) Test Group – 150 days. Significant differences when compared to 60 days (T2): (Υ) Control Group – 150 days; (Ω) Test Group – 150 days. (Repeated-measures ANOVA, Bonferroni's post-hoc test, $p < 0.05$).

Figure 4. Relative frequencies of the means in % of bacterial complexes in different experimental periods, ($\P$) significant difference when compared to baseline values; (2) significant difference when compared to 60 days (Repeated-measures ANOVA, Bonferroni's post-hoc test, $p < 0.05$).

Tables

Table 1. Comparisons of means $\pm$ standard deviations.

VARIABLE	TIME	EXPERIMENTAL GROUPS			BETWEEN-GROUP COMPARISONS	
		Control	Test	Mean differences	95%CI	Student's <i>t</i> test <i>P</i> value
PD (mm)	T1	6.56 $\pm$ 0.20	6.43 $\pm$ 0.21	0.13	-0.42 0.67	0.6680
	T2	5.87 $\pm$ 0.22	6.21 $\pm$ 0.21	-0.34	-0.18 0.87	0.1558
	T3	4.06 $\pm$ 0.23 ^{a, b}	3.31 $\pm$ 0.18 ^{a, b}	0.75	-1.05 -0.44	0.0007
CAL (mm)	T1	6.90 $\pm$ 0.36	7.00 $\pm$ 0.27	-0.10	-0.77 0.96	> 0.9999
	T2	6.25 $\pm$ 0.54	6.90 $\pm$ 0.32	-0.65	-0.67 1.98	0.3221
	T3	5.59 $\pm$ 0.54	5.03 $\pm$ 0.36 ^{a, b}	0.56	-1.95 0.83	0.3365
GR (mm)	T1	0.50 $\pm$ 0.22	0.56 $\pm$ 0.22	-0.06	-0.53 0.66	> 0.9999
	T2	0.71 $\pm$ 0.26	0.71 $\pm$ 0.23	0.00	-0.60 0.60	0.7461
	T3	1.84 $\pm$ 0.37 ^{a, b}	1.71 $\pm$ 0.29 ^{a, b}	0.13	-1.15 0.90	0.7937
BOP (%)	T1	84.38 $\pm$ 30.10	68.75 $\pm$ 44.25	15.63	-36.76 a 5.50	0.2500
	T2	78.13 $\pm$ 31.46	65.63 $\pm$ 39.66	12.50	35.32 a 10.32	0.3984
	T3	18.75 $\pm$ 30.96 ^{a, b}	9.37 $\pm$ 27.20 ^{a, b}	9.38	-23.87 a 5.116	0.9100
PI (%)	T1	71.88 $\pm$ 44.60	62.50 $\pm$ 42.82	9.38	-25.92 a 9.249	0.5313
	T2	31.25 $\pm$ 40.31 ^a	34.38 $\pm$ 39.66	-3.13	-18.92 a 24.47	> 0.9999
	T3	21.88 $\pm$ 36.37 ^a	15.63 $\pm$ 35.21 ^a	6.25	-13.60 a 2.485	0.5000

PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; GR: gingival recession; BOP: bleeding on probing; PI: plaque index; CI: confidence interval; a: significant difference when compared to the value at T1 in the same group; b: significant difference when compared to the value at T2 in the same group (Repeated-measures ANOVA, Bonferroni's post-hoc test, $p < 0.05$).

Table 1. Between-group and within-group comparisons of means $\pm$ standard deviations of clinical parameters at T1 (baseline), T2 (60 days), and T3 (150 days).

Table 2. Comparison of variations $\pm$ standard deviations.

		Δ 0-60	%	Δ 0-150	%	Δ 60-150	%
BETWEEN-GROUP COMPARISONS	PD (mm)						
	Control	-0.69 $\pm$ 1.09	-10.48 $\pm$ 14.97	-2.5 $\pm$ 1.40 a	-38.83 $\pm$ 17.59	-1.81 $\pm$ 1.03 a	-30.85 $\pm$ 15.69
	Test	-0.22 $\pm$ 0.68	-3.52 $\pm$ 9.78	-3.13 $\pm$ 1.06 a	-76.92 $\pm$ 12.01	-2.91 $\pm$ 0.92 a	-87.74 $\pm$ 11.05
	<i>p value</i>	0.15		0.16		0.0035	
	CAL (mm)						
	Control	-0.66 $\pm$ 1.93	-9.50 $\pm$ 33.95	-1.31 $\pm$ 1.75	-18.75 $\pm$ 27.45	-0.66 $\pm$ 1.47	-10.50 $\pm$ 23.94
	Test	-0.09 $\pm$ 0.99	-1.36 $\pm$ 15.59	-1.97 $\pm$ 1.07 a	-35.20 $\pm$ 16.02	-1.88 $\pm$ 1.04 a	-37.27 $\pm$ 15.12
	<i>p value</i>	0.30		0.21		0.0111	
	GR (mm)						
	Control	0.22 $\pm$ 0.52	43.75 $\pm$ 43.66	1.34 $\pm$ 1.26 a	238.89 $\pm$ 56.84	1.13 $\pm$ 1.20	156.52 $\pm$ 51.59
	Test	0.16 $\pm$ 0.51	21.74 $\pm$ 50.25	1.16 $\pm$ 1.08 a	62.71 $\pm$ 54.68	1.00 $\pm$ 1.03 a	58.18 $\pm$ 53.14
	<i>p value</i>	0.0030		0.6542		0.7548	
	BOP (%)						
	Control	-6.25 $\pm$ 35.19		-65.63 $\pm$ 48.06 a		-59.38 $\pm$ 47.06 a	
	Test	-18.75 $\pm$ 45.51		-59.38 $\pm$ 53.00 a		-56.25 $\pm$ 39.94	
	<i>p value</i>	0.3874		0.7256		0.8385	
	PI (%)						
	Control	-40.63 $\pm$ 48.06		-50.00 $\pm$ 48.06		-9.38 $\pm$ 48.80	-13.03
	Test	-28.13 $\pm$ 45.51		-46.88 $\pm$ 42.26		-18.75 $\pm$ 36.84	-30.00
	<i>p value</i>	0.4566		0.8476		0.5745	
PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; GR: gingival recession; BOP: bleeding on probing; PI: plaque index; SD: standard deviation; %: Delta percentage; Δ 0-60: comparison of absolute delta between T1 and T2; Δ 0-150: comparison of absolute delta between T1 and T3; Δ 60-150: comparison of absolute delta between T2 and T3; a: Significant within-group difference when compared to Δ 0-60 (Repeated-measures ANOVA, Bonferroni's post-hoc test, $p < 0.05$).							

Table 2. Comparison of variations $\pm$ standard deviations of clinical parameters between and within groups at T1 (baseline), T2 (60 days), and T3 (150 days).

Figures

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

Supplementary Figure