

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia

UMBERTO DEMONER RAMOS

**EFEITO DE UM PROTOCOLO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM
APLICAÇÕES MÚLTIPLAS COMO ADJUVANTE AO TRATAMENTO
PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO EM DIABÉTICOS TIPO 2. ESTUDO CLÍNICO
E LABORATORIAL EM HUMANOS.**

Ribeirão Preto

2012

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia

UMBERTO DEMONER RAMOS

**EFEITO DE UM PROTOCOLO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM
APLICAÇÕES MÚLTIPLAS COMO ADJUVANTE AO TRATAMENTO
PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO EM DIABÉTICOS TIPO 2. ESTUDO CLÍNICO
E LABORATORIAL EM HUMANOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi

Ribeirão Preto

2012

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.

Ramos, Umberto Demoner

Efeito de um protocolo de terapia fotodinâmica com aplicações múltiplas como adjuvante ao tratamento periodontal não-cirúrgico em diabéticos tipo 2. Estudo clínico e laboratorial em humanos. Ribeirão Preto, 2012

68 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Grisi, Márcio Fernando de Moraes.

1. Introdução. 2. Material e Métodos. 3. Resultados.
4. Discussão. 5. Conclusões.

Folha de Aprovação

Umberto Demoner Ramos

Efeito de um protocolo de terapia fotodinâmica com aplicações múltiplas como adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico em diabéticos tipo 2. Estudo clínico e laboratorial em humanos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi

Aprovado em: ____/____/2012

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A meus pais por serem o exemplo de caráter, ética e excelência, em **nossa** profissão.*

*Ao meu pai, **Umberto Alfredo Ramos**, e mãe, **Norma Elisa Demoner Ramos**, por me influenciarem, mesmo que não sabendo, a seguir esta bela profissão; por me incentivarem a seguir o caminho da atualização e crescimento profissional em busca deste sonho. Sem eles, nada seria possível.*

À minha família, que mesmo distante, demonstrava o orgulho por minha luta.

Amo vocês!

Agradecimentos

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi**, pela disponibilidade e por ter me permitido o privilégio de levar em meu currículo e formação seu nome como orientador; por me ensinar a ter paciência e que tudo possui um tempo certo, além dos ensinamentos sobre planejamento e experiência clínica de anos de periodontia.*

*Aos Docentes do programa, **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.** pela disponibilidade, e pela confiança ganha com o tempo e trabalho. Ao **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza** pela amizade e abertura de oportunidades, além do bom convívio. Ao **Prof. Dr. Mário Taba Jr.** pelos agradáveis momentos e idéias sobre pesquisa, e também pelas famosas repostas-perguntas. À **Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto** pelos ensinamentos transmitidos.*

*Aos meus colegas de Mestrado, **Lívia (Liuva), Janine, Carolina Scanavez, Carolina Delmondes, Carolina Mandetta, Igor (Tints)** e em especial à minha dupla **Lauro Garrastazu Ayub**, pelos bons momentos de alegria e de suporte mútuos nas horas mais difíceis e árduas de nosso curso.*

*Aos Doutorandos **Priscila, Luciana Bastos, Adriana, Flávia, Patricia e Luciana Maia** pelo bom convívio na clínica de pós-graduação e fora dela; e em especial, a **Danilo Maeda Reino**, pelas conversas sobre pesquisa e periodontia e por toda a ajuda que sempre ofereceu.*

*As secretária do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia, **Tatiana Angeli Passos Fernandes (Tati)** e **Dulce de Oliveira Nergretti**, pela disposição em ajudar e pela amizade construída.*

*Às funcionárias da clínica de Pós Graduação **Zilda e Sueli (Su)** pela boa companhia diária e ajuda nos atendimentos.*

Ao **Roger**, do laboratório de cultura de células, pela paciência na hora de ter que se deslocar do laboratório para abrir o freezer -80, muitas vezes quando estava ocupado. E à **Fabiola Singaretti**, que além desta paciência, me ensinou muita coisa sobre rotina de laboratório e que possibilitou que grande parte deste trabalho obtivesse resultados.

Às Secretária da Seção de Pós Graduação, **Isabel Sola e Regiane Sacilotto**, pela disponibilidade e cordialidade no atendimento às nossas recorrentes necessidades.

Aos **Pacientes**, pois sem eles este estudo nunca poderia ser realizado, em especial a **D.A.S**, que, infelizmente não pode completar todo o acompanhamento por nós proposto e que me possibilitou assistir a mudança que a retomada da saúde bucal pode trazer à auto-estima do indivíduo.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** pela estrutura oferecida, que possibilita aos estudantes de Pós-graduação a realização de pesquisas de nível internacional.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo**, por me fornecer o conhecimento necessário para que eu tenha me tornado, antes de periodontista, Cirurgião-Dentista.

À **FAPESP** pelo auxílio financeiro ao projeto.

Lista de Abreviaturas e Siglas

DM: Diabetes Mellitus

HbA1c: Hemoglobina Glicada

MMPs: Metaloproteinases de Matriz

TFA: Terapia Fotodinâmica

DP: Doença Periodontal

AGEs: Produtos Finais da Glicosilação.

IL1- β : Interleucina 1 Beta

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral Beta

RAR: Raspagem e Alisamento Radicular

mg: miligrama

ml: mililitro

TPI: Tempo Pré Irradiação

mW: miliwatt

cm²: centímetro quadrado

J: Joules

nm: nanômetro

mm: milímetro

N: newtons

Sumário

Justificativa	10
Resumo	15
1. Introdução	17
2. Material e Métodos	22
2.1 Seleção dos Pacientes	22
2.2 Divisão de grupos e procedimentos realizados	22
2.3 Parâmetros Clínicos Utilizados	26
2.4 Coleta do Fluido Crevicular Gengival	28
2.5 Análise Estatística	29
3. Resultados	31
4. Discussão	39
5. Conclusões	45
6. Referências Bibliográficas	47
Artigo em Inglês.....	53

Justificativa

Justificativa

Em um estudo realizado em nove capitais brasileiras entre 1986 e 1988, observou-se a prevalência de 7,6% de diabetes mellitus numa população com idade entre 30 e 69 anos. Resultados parecidos foram obtidos em outros países como Estados Unidos, Itália e Argentina em período semelhante.^{1,2} Esta prevalência vem aumentando progressivamente com os anos. Recentemente, pesquisas demonstram que nos Estados Unidos sua prevalência atual é de 8,4% da população adulta. No Brasil, em 2000, encontrou-se 4.553.000 de diabéticos e estima-se que em 2030 existam 11.305.000³.

Está bem estabelecida pela literatura a influência negativa da DM sobre a condição periodontal dos pacientes portadores desta doença; contudo, vários estudos têm tentado estabelecer até que ponto o tratamento periodontal pode influenciar positivamente no controle metabólico de pacientes diabéticos. Esta relação pode ser avaliada de maneira mais evidente em pacientes que possuem DM tipo 2, já que os diabéticos tipo 1, por serem insulínodospendentes, possuem um controle muito próximo dos níveis de insulina e dos marcadores sistêmicos da doença, como a HbA1c. Desta forma, seria difícil avaliar possíveis alterações metabólicas nesses pacientes que possuem ajustes frequentes em suas medicações de controle⁴.

O controle glicêmico realizado por meios não medicamentosos tem um importante impacto no controle do diabetes e suas complicações, visto que os medicamentos geralmente utilizados podem induzir a crises hipoglicêmicas que, quando graves e/ou frequentes, trazem mais consequências que a hiperglicemia a qual se combatida. A severidade e frequência dessas crises pode ser uma indicação absoluta de redução da terapia medicamentosa e do aumento da tolerância quanto aos índices e HbA1c > 7%⁵.

Como exposto anteriormente, pacientes diabéticos descontrolados possuem uma resposta ao tratamento periodontal pobre em longo prazo. A associação entre a terapia periodontal não cirúrgica e o uso adjunto de doxiciclina sistêmica mostrou-se benéfica à melhora do estado periodontal em diabéticos tipo 2 pobremente controlados, mostrando reduções dos níveis de HbA1c médio de 1,5%⁶, um índice significativo, visto que a dieta e os exercícios físicos, geralmente prescritos pelo médico endocrinologista tem um impacto na redução de, respectivamente, 0,25 a 2,9% e 0,66%⁵.

O uso da doxiciclina sistêmica se justifica no manejo do paciente diabético descontrolado. Além de exibir concentrações subgingivais de 7 a 10 vezes maiores que as encontradas no soro, é um importante supressor de patógenos periodontais, possuem propriedades anticolagenolíticas devido a sua capacidade de inibição de Metaloproteinases (MMPs) relacionadas com a destruição periodontal⁷. Agindo em duas vertentes: na supressão do agente etiológico e na modulação da resposta do hospedeiro, ao contrário de outros antibióticos sistêmicos⁸.

A utilização de antibióticos sistêmicos, porém, aumenta a possibilidade de resistência bacteriana não só das bactérias alvo do tratamento, no caso, as periodontopatogênicas, como também de microorganismos que se encontram em outras localidades do corpo do hospedeiro⁹.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) possui efeito antibacteriano local¹⁰, o que pode ser positivo por aumentar o potencial de descontaminação sem gerar absorção da substância pelo organismo, devido às suas características locais, combatendo, inclusive, alguns fatores de virulência^{11,12} reduzindo a possibilidade de efeito adversos em outras áreas do corpo, diminuir as chances de produção resistência bacteriana, além de não apresentar danos aos tecidos adjacentes, visto que os corantes utilizados apresentam predileção por células de 20 a 100 vezes maior que as células humanas^{13,14}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco LJ, Malerbi DA. Multicenter Study of the Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in the Urban Brazilian Population Aged 30-69Yr. *Diabetes Care*. 1992, 15: 1509-16.
2. Morbidity and Mortality Weekly Report. Prevalence of Diabetes and Impaired Fasting Glucose in Adults – United States, 1999-2000. *JAMA*. 2003, 290: 1702-3.
3. Wild S, Roglis G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.
4. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res*. 2005;84:1154-1159.
5. Position Statement Standards of Medical Care in Diabetes, ADA 2009
6. O'Connell, PAA, Taba Jr M., Nomizo A., Freitas MCF., Suaid FA., Uyemura SA., Trevisan GL., Novaes Jr AB., Souza SLS., Palioto DB., Grisi MFM. Effects of Periodontal Therapy on Glycemic Control and Inflammatory Markers. *J Periodontol*. 2008; 49: 774-783.
7. Sasaki T, Ramamurthy NS, Yu Z, Golub LM. Tetracycline administration increases protein (presumably procollagen) synthesis and secretion in periodontal ligament fibroblasts of streptozocin-induced diabetic rats. *J Periodontal Res* 1992; 27: 631-39.
8. Rodrigues DC, Taba MJ, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF. Effect of nonsurgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol* 2003;74:1361-1367.
9. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004; 10(12): S122-S129.
10. Kömerik N, Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J. Appl Microbiol* 2002; 92: 618-623.
11. Packer S, Bhatti M, Burns T, Wilson M. Inactivation of Proteolytic Enzymes from *Porphyromonas gingivalis* Using Light-activated Agents. *Lasers Med Sci* 2000; 15: 24-30.

12. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The Effect of Photodynamic Therapy on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria. *Photochem Photobiol* 2000; 72: 676-68.
13. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted Antimicrobial Photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2595-2601.
14. Luan XL, Qin YL, Bi J, Hu CY, Zhang ZG, in J, Zhon CN. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 162-166.

Resumo

Resumo

Objetivos: Este Estudo randomizado duplo cego placebo controlado comparou, clínica, sistêmica e imunologicamente um protocolo de Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) de aplicações múltiplas com um protocolo já consagrada com o uso da Doxiciclina sistêmica no tratamento da doença periodontal em pacientes diabéticos tipo 2 descontrolados.

Materiais e Métodos: Vinte seis pacientes com HbA1c > 7% foram selecionados e randomicamente alocados em dois grupos que receberam raspagem e alisamento radicular. Um dos grupos recebeu a aplicação adjunta de aplicações múltiplas de TFA (n=12) e o outro utilizando a doxiciclina sistêmica na dose de 100mg (n=14). Os parâmetros monitorados foram índice de placa, Sangramento à sondagem, Profundidade de sondagem, Supuração, Recessão gengival e nível clínico de inserção relativo, o parâmetro sistêmico avaliado foi a HbA1c, medida antes e 3 meses pós tratamento. Os níveis de IL1- β , TNF- α e TGF- β foram medidos antes, 1 e 3 meses pós tratamento através da coleta de fluido crevicular gengival.

Resultados: Não houveram diferenças significantes em nenhum dos parâmetros clínicos avaliados e nos níveis de HbA1c. O uso do antibiótico sistêmico demonstrou ser superior na redução de IL1- β até o período de 1 mês pós tratamento, porém, em 3 meses a TFA se mostrou superior. Não houve diferença na redução dos níveis de TNF- α e TGF- β entre os grupos.

Conclusões: Ambos tratamentos foram eficientes nas melhoras dos parâmetros clínicos e sistêmicos. A TFA parece possuir maior estabilidade na redução dos níveis de citocinas inflamatórias.

Introdução

1. Introdução

O estudo das inter-relações entre a Doença Periodontal (DP) e doenças sistêmicas tem estabelecido uma forte relação entre a saúde periodontal o diabetes mellitus¹. O Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada por anormalidades endócrino-metabólicas que podem promover danos às estruturas vasculares, oculares, renais, cardíacas e nervosas².

São observados fundamentalmente dois tipos de DM: Tipo 1 (insulinodependente) ou Tipo 2 (não insulinodependente). O DM Tipo 1 está relacionado à hipoprodução de insulina devido à destruição de células beta pancreáticas, enquanto o Tipo 2 envolve a resistência dos tecidos-alvos à ação da insulina devido a defeitos dessa molécula ou alterações nos receptores celulares desse hormônio³. O Diabetes Tipo 2 representa cerca de 90% dos casos da doença^{2,4}.

A periodontite é uma doença de etiologia bacteriana que tem sido referida como a sexta complicação do diabetes⁵. Estudos epidemiológicos têm demonstrado sua maior prevalência em diabéticos do que em sujeitos com tolerância normal à glicose, sugerindo então que o diabetes, principalmente quando não controlado, é um fator de risco para doença periodontal^{6,7}.

Os pacientes diabéticos podem ser divididos em controlados, moderadamente controlados ou pobremente controlados, havendo diferenças significantes quanto à perda de inserção periodontal e à profundidade de bolsa em doentes pobremente controlados, quando comparados a um grupo controle não diabético. Esses dados sugerem que a condição do DM modifica a evolução da DP^{8,9}, sendo necessária, por isso, uma atenção especial para a condição dos tecidos periodontais em diabéticos, particularmente quando a doença não está bem controlada^{10,11}.

Alterações biológicas inerentes ao diabetes, como microangiopatia, metabolismo do colágeno com excessiva atividade colagenolítica, modificações na resposta inflamatória do

hospedeiro (elevados números de mediadores inflamatórios) e predisposição genética, alteram a propensão do indivíduo diabético à doença periodontal. Por outro lado, existem evidências de que a infecção periodontal pode predispor ou exacerbar o diabetes, apresentando características bidirecionais, e que, por conseguinte, seu controle pode apresentar influência mútua^{12,13}.

Foi proposta uma relação de dois caminhos entre DP e DM. A base bioquímica por meio da qual a hiperglicemia pode levar a complicações microvasculares vistas em diabéticos é decorrente do crescente acúmulo de produtos finais da degradação da glicose (AGEs) no plasma e tecidos desses pacientes. A ligação destes produtos a receptores de macrófagos inicia um ciclo de supra-regulação de citocinas, com a síntese principalmente de IL-1 e TNF- α . Por outro lado, é reconhecido que a DP, devido à presença de periodontopatógenos e seus produtos de virulência, induz a secreção de IL-1 e TNF- α ¹⁵, além de aumentar a resistência à insulina. A síntese e secreção de citocinas mediadas pela infecção periodontal podem amplificar a resposta dos produtos finais de glicosilação, os quais induzem uma maior produção de citocinas, o que por sua vez exacerba a DP. Desta forma, e de maneira similar a outras infecções bacterianas, a relação entre diabetes mellitus e infecção periodontal torna-se bi-direcional^{16,12}.

A IL1- β e o TNF- α são potentes citocinas inflamatórias produzidas por monócitos e macrófagos ligadas ao processo de reabsorção óssea^{16, 17,18}. Há uma relação direta entre a diminuição dos níveis desses marcadores e a redução dos sinais clínicos da DP. Estudos anteriores realizaram a quantificação dessas citocinas no fluido gengival através de método imunoenzimático (ELISA), demonstrando haver uma quantidade suficiente neste fluido para sua identificação e quantificação^{18,19}. Alguns autores têm relacionado os níveis de IL1- β no fluido crevicular gengival com o controle glicêmico em diabéticos tipo 2¹⁸.

O aumento das concentrações de TGF- β_1 no fluido crevicular tem sido associado a melhora dos parâmetros clínicos periodontais²⁰. A TGF- β_1 é um mediador crítico na resolução da inflamação e indica reparo tecidual em progressão e resposta do hospedeiro à inflamação crônica²¹. Tem sido demonstrado que a concentração de TGF- β_1 é maior em sítios sadios que em sítios com periodontite avançada²². Os níveis de TGF- β_1 também tendem a aumentar de forma transiente durante o período de cicatrização periodontal cirúrgica, sendo indicado como um bom marcador de monitoramento do reparo periodontal²³.

Embora pacientes diabéticos apresentem melhoras clínicas periodontais no período imediato pós tratamento, quando o controle glicêmico é deficiente há um grande risco de rápida recorrência de sítios doentes²⁴. Além disso, pacientes diabéticos, apresentando periodontite severa, quando comparados a diabéticos periodontalmente saudáveis ou com periodontite leve ou moderada, demonstraram risco 3,2 vezes maior de mortalidade por complicações cardiorrenais⁴.

O controle glicêmico realizado por meios não medicamentosos tem um importante impacto no controle do diabetes e suas complicações, visto que os medicamentos geralmente utilizados podem induzir a crises hipoglicêmicas que, quando graves e/ou frequentes, trazem mais consequências que a hiperglicemia a qual se combatida. A severidade e frequência dessas crises pode ser uma indicação absoluta de redução da terapia medicamentosa e do aumento da tolerância quanto aos índices e HbA1c > 7%²⁵.

Estudos em animais demonstraram superioridade da TFA quando associada à raspagem e alisamento radicular na periodontite induzida em ratos²⁶, em áreas desafiadoras tais como lesões de furca²⁷ e na periodontite modificada por fatores sistêmicos em roedores com diabetes mellitus induzida²⁸.

Estudos clínicos ainda divergem sobre a contribuição da TFA como adjuvante à terapia periodontal não cirúrgica. O número de aplicações parece estar associado com os

resultados positivos. Em protocolo de aplicação única, alguns autores encontraram superioridade a TFA associada à raspagem e alisamento radicular²⁹. Por outro lado, algumas publicações não relataram diferenças entre o uso ou não da TFA, com diferenças apenas na redução do sangramento à sondagem^{30,31}.

Um estudo recente avaliou o efeito da TFA como adjuvante à terapia periodontal não cirúrgica em diabéticos tipo 2 descontrolados na redução dos níveis de HbA1c e demonstrou superioridade do tratamento com a doxiciclina sistêmica frente a aplicação única de TFA³².

Contrariando a maior parte dos resultados envolvendo protocolos de aplicação única de TFA, um ensaio clínico duplo cego placebo controlado demonstrou superioridade do protocolo de aplicações múltiplas de terapia fotodinâmica antimicrobiana frente à raspagem e alisamento radicular apenas³³.

Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1 Seleção dos Pacientes

Este estudo teve a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (Processo nº2010.1.157.58.0). Foram selecionados 26 indivíduos diagnosticados com Diabetes Mellitus Tipo 2, sendo triados do setor de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, do Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Saúde Escola Cuiabá da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e da triagem da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Todos diabéticos há pelo menos 5 anos e com valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c) > 7%.

Como critério para inclusão no estudo os pacientes possuíam 2 ou mais dentes, com nível de inserção clínica ≥ 6 mm, um ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm³⁴ e presença de no mínimo 15 dentes remanescentes. Foram excluídos do estudo tabagistas, grávidas ou lactantes, HIV positivos, portadores de desordens sanguíneas, inflamações crônicas ou condição imunológica alterada, usuários regulares de drogas como antiinflamatórios, antibióticos, imunossupressores, anticoagulantes, pacientes com histórico de tratamento periodontal a menos de 6 meses ou uso de antibióticos nos últimos 6 meses.

2.2 Divisão de grupos e procedimentos realizados

O mesmo Cirurgião Dentista, especialista em Periodontia realizou todas as intervenções em todos os pacientes. A alocação randomizada foi realizada através de um programa de computador (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) em um bloco aleatoriamente permutado pelo programa. A alocação foi escondida em envelopes opacos até imediatamente antes do procedimento de raspagem de cada paciente entre os grupos Teste e Controle formando 2 grupos iguais de 14 indivíduos. Durante o

estudo, dois pacientes que haviam sido alocados no grupo teste se recusaram a participar da pesquisa, e receberam tratamento periodontal após serem encaminhados ao curso de especialização em periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

I – Intervenção no Grupo Controle

Todos os pacientes, num total de 14, receberam terapia periodontal não cirúrgica incluindo orientação sobre higiene bucal para o controle de placa. A terapia periodontal básica foi realizada por um especialista (periodontista), em um intervalo de 24 horas^{35,36}, através de raspagem (supragengival e subgengival) e aplainamento radicular de toda a boca com a utilização de instrumentos manuais (curetas de Gracey) e ultra-sônicos. A instrumentação foi realizada quadrante por quadrante, até adequada limpeza da área e alisamento radicular, que foi verificado com auxílio de uma sonda exploradora. Neste grupo, foi associado a um protocolo de doxiciclina sistêmica, sendo esta prescrita na dosagem de 100mg e o paciente orientado a ingerir uma dose inicial de duas cápsulas, seguindo a dose de apenas uma cápsula nos dias seguintes, até que se completasse 14 dias de tratamento³⁷. Os indivíduos receberam profilaxia profissional mensal após finalizada a terapia periodontal para o controle da placa supragengival^{37,38}. Nas visitas mensais de controle e avaliação, a cooperação do paciente ao estudo foi monitorada verificando-se o estado de higiene bucal e a correta utilização das medicações prescritas. Neste grupo realizado procedimento “sham” simulando o tratamento com a TFA, porém, sem a ativação pelo laser visando cegar o paciente quanto ao tratamento.

Além da coleta de dados anterior ao tratamento foram coletados os seguintes dados pós tratamento:

30 dias pós tratamento - Parâmetros clínicos periodontais, amostras de fluido gengival.

90 dias pós tratamento - Parâmetros clínicos periodontais, amostras de fluido gengival e coleta de sangue para uma segunda dosagem de hemoglobina glicosilada.

II – Intervenção no Grupo Teste

Todos os pacientes, num total de 12, receberam, além da terapia periodontal não cirúrgica, idêntica a realizada no Grupo Teste (RAR+TFA), substituindo-se a terapia antimicrobiana com Doxicilina pela aplicação da terapia fotodinâmica no dia da instrumentação, sendo o tratamento repetido por mais 3 vezes durante duas semanas (tempos 0, 2, 7 e 14 dias), respeitando o mesmo tempo utilizado na terapia controle com a Doxiciclina 100mg. O protocolo utilizado para a aplicação da TFA constitui da irrigação da bolsa periodontal a partir da sua parte mais apical em movimentos apico coronais com o corante (Cloreto de Fenotiazina 10mg/ml Helbo Blue, Helbo Medizintechnik GmbH, Áustria), espera de um tempo pré irradiação (TPI) de 5 minutos²⁶, seguida irrigação com soro fisiológico para remoção do excesso do corante e exposição com o laser através de uma fibra ótica difusora de 8mm de comprimento e uma angulação de 60°, comprimento de onda de 660nm, 70 mW de potência, perfazendo uma densidade de potência de 28mW/cm²,) 10 segundos por sítio, 6 sítios por dente afetado, totalizando uma densidade energética de 2.79J/cm² por ponto (16.72 J/cm² por dente) (HELBO® *TheraLite Laser*, Helbo Medizintechnik GmbH, Áustria) 10 segundos por sítio, 6 sítios por dente afetado (Figura 1).



Figura 1. a) Inserção da agulha para irrigação no fundo da bolsa; b) Irrigação com o cloreto de fenotiazina a 10mg/ml com movimentos apico coronais e espera de 5 minutos; c) após a irrigação para remoção dos excessos do corante, aplicação do Laser 660nm com a fibra ótica difusora pelo período de 10 segundos por sítio, seis sítios por dente afetado.

Uma curva de absorção foi realizada para a comprovação de que o corante utilizado possuía ressonância com a fonte luminosa (Figura 2).

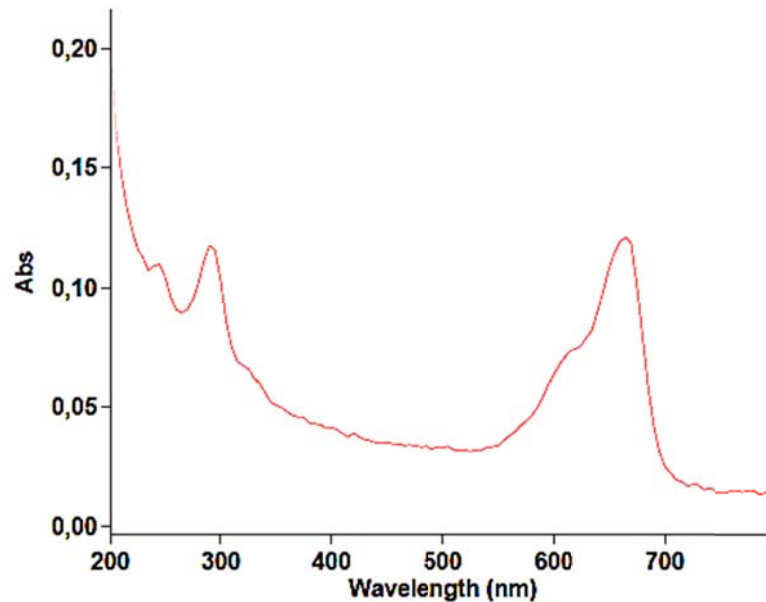


Figura 2. Curva de absorção do corante Helbo Blue[®] com o pico de absorção na região do espectro vermelho (660 nm).

Os indivíduos receberam profilaxia profissional mensal até o ultimo tempo de coleta (3 meses) para o controle da placa supragengival^{37,38}. Nas visitas mensais de controle e avaliação, a cooperação do paciente ao estudo será monitorada verificando-se o estado de higiene bucal e a correta utilização das medicações prescritas. Neste grupo foram fornecidos ao paciente uma receita idêntica à de prescrição do antibiótico do grupo controle (Doxiciclina 100mg, dose inicial de 2 cápsulas seguidas de doses diárias de uma cápsula até que se complete 14 dias de tratamento antibióticos, num total de 15 cápsulas), acompanhada do medicamento, idênticas a do grupo controle (Figura 3). A terapia fotodinâmica antimicrobiana foi aplicada em todos os sítios que possuíam profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm no exame clínico inicial.



Figura 3. Cápsulas de Doxiciclina maceradas e cápsulas de Placebo.

Além da coleta de dados anterior ao tratamento foram coletados os seguintes dados pós tratamento:

30 dias pós tratamento - Parâmetros clínicos periodontais, amostras de fluido gengival.

90 dias pós tratamento - Parâmetros clínicos periodontais, amostras de fluido gengival e coleta de sangue para uma segunda dosagem de hemoglobina glicosilada e foram realizados.

2.3 Parâmetros Clínicos Utilizados

Cada paciente foi moldado com alginato para obtenção dos modelos de gesso dos arcos dentários e confecção de placa guia em acetato (0,5 mm) com sulcos de referência criados para a padronização da inserção e inclinação da sonda periodontal computadorizada de pressão constante, calibrada em 0.25N de força (Florida Probe Corporation Gainesville, FL, USA).

Parâmetros clínicos periodontais analisados: foram avaliados em 6 sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual), por um examinador cego, alheio aos tratamentos realizados sendo os seguintes parâmetros analisados:

- Presença de placa avaliada dicotomicamente³⁹;
- Profundidade de sondagem da bolsa periodontal;
- Nível de inserção;
- Sangramento à sondagem avaliada dicotomicamente⁴⁰;
- Supuração avaliada dicotomicamente.

Estado de higiene bucal: Depósitos de placa foram corados com solução evidenciadora para medir a porcentagem das superfícies dos dentes com placa. Concomitantemente a esse procedimento os pacientes receberam instruções de higiene oral, incluindo a técnica de escovação, uso de fio dental e escova interdental.

Profundidade de sondagem: A profundidade de sondagem foi medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa, através da sonda periodontal computadorizada (Florida Probe Corporation Gainesville, FL, USA), seis sítios por dente.

Sangramento à sondagem: A presença do sangramento e supuração foi considerada positiva quando ocorrer em até 20s após a inserção da sonda para medida da profundidade de sondagem. Sendo as porcentagens calculadas para cada indivíduo.

Nível de inserção relativo: O nível de inserção relativo foi mensurado a partir da face oclusal da placa-guia ao fundo da bolsa, com sonda eletrônica computadorizada, em seis sítios por dente.

Avaliação radiográfica: O exame radiográfico consistiu em uma série periapical completa de cada paciente com objetivo de diagnóstico e planejamento de exodontias prévias ao tratamento.

2.4 Coleta do Fluido Crevicular Gengival

Foi coletado o fluido crevicular gengival dos 4 dentes que apresentaram maior profundidade de sondagem de cada paciente para análise quantitativa das citocinas IL1- β , TGF- β e TNF- α . Na existência de vários dentes com mesma profundidade foi escolhido o dente mais anterior, visando evitar a contaminação salivar e facilitar a coleta ⁴¹. A coleta do fluido gengival foi realizada uma semana após a sondagem periodontal em todos os tempos experimentais, visando evitar o descarte excessivo de periopapers por contaminação pelo potencial sangramento provocado pela sondagem. O dente selecionado foi secado com ar e isolado com rolos de algodão. A placa supragengival foi cuidadosamente removida e o fluido gengival coletado com tiras de papel filtro de metilcelulose (Periopaper, Amityville, NY) por 30 segundos, sendo então retirada e transferida para um tubo de Eppendorf. Após 3 minutos o procedimento de coleta foi repetido mais 3 vezes por sítio, totalizando 4 periopapers por sítio selecionado em um pool de 12 filtros de papéis por tempo experimental. A avaliação do volume do fluido gengival foi realizado através de um dispositivo de mensuração eletrônico (Periotron 8000, Interstate Drug Exchange, Amityville, NY) (Figura 4). Uma curva padrão correlacionando volumes conhecidos com valores obtidos pelo aparelho foi obtida e, a partir de um programa para análises estatísticas GraphPad Prism, demo version 5.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), uma regressão polinomial de quarta ordem foi aplicada ponto a ponto para determinar o volume colhido em cada periopaper.

Tiras contaminadas por sangue ou saliva foram descartadas. Cada amostra foi estocada a uma temperatura de - 80C° até a análise⁴¹, realizada através de kits de imunoenensaio Milliplex MAG[®] (Billerica, MA, EUA) e analisados pelo método Multiplex (Luminex Corporation Austin, TX, EUA), em duplicata. As amostras foram processadas pelo laboratório Genese (São Paulo, SP) e os resultados das médias das duplicatas normalizados de acordo com a quantificação de fluido crevicular coletado.

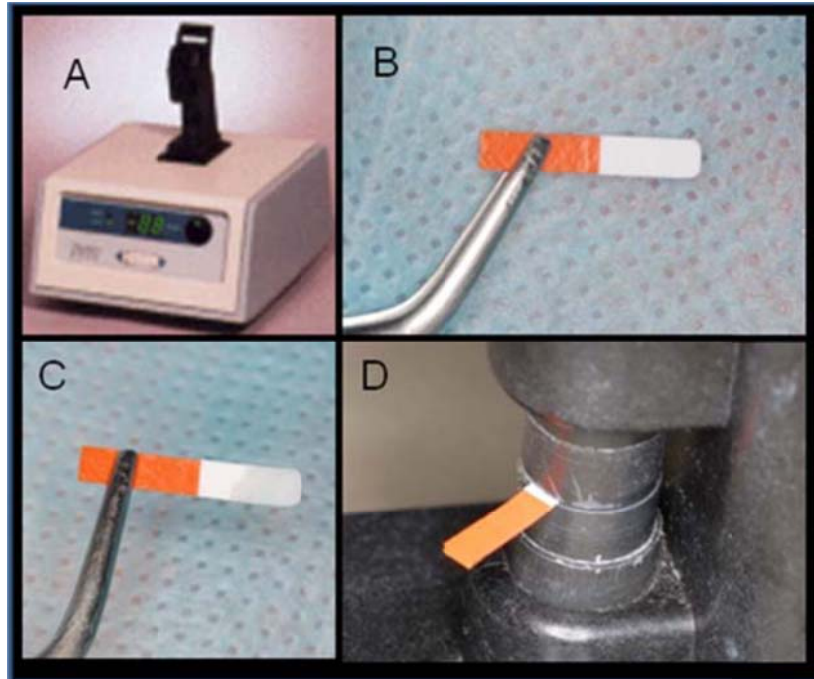


Figura 4. a) Periotron 8000; b) Filtro de papel antes da coleta; c) Periopaper após a coleta; d) Mensuração da umidade.

2.5 Análise Estatística

O teste de normalidade de Lilliefors foi aplicado para todas as variáveis estudadas e os resultados demonstraram anormalidade dos dados, sendo escolhidos testes não paramétricos. Foi utilizado o teste de Friedman para análise intra e entre grupos para o Índice de sangramento à sondagem, índice de biofilme microbiano e análise de fechamento de bolsa periodontal. O teste de Mann Whitney foi utilizado para análises intra e entre grupos para estratificação de bolsa periodontal, redução de 2mm em bolsa periodontal, nível clínico de inserção e quantificação da recessão gengival total. Para $\text{IL-1-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{TGF-}\beta$ foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para análise intra grupo e o teste de Mann-Whitney para análise entre grupos.

Resultados

3. Resultados

Dois dos 28 pacientes incluídos na fase inicial do estudo não completaram os tempos experimentais por não aceitarem a participação na pesquisa. Todos os participantes relataram ter utilizado todos os medicamentos prescritos da forma correta. Nenhum incomodo e efeito adverso foi relatado em relação a ambos tratamentos durante todo o período experimental, denotando segurança dos tratamentos. Nenhum individuo relatou desconforto com a aparência ou estética dos dentes em relação ao manchamento dental pelo corante utilizado.

Não houve diferenças na prevalência entre os gêneros, sendo o grupo teste constituído por 6 homens e 6 mulheres e o grupo controle por 7 homens e 7 mulheres. Como exposto na Tabela 1.

Tabela 1. Dados demográficos

Gênero	RAR+Doxi	RAR+TFA
Masculino	7	6
Feminino	7	6
Idade (em anos)	52,29 ± 7,41	48,67 ± 7,41

Não houve diferença entre os níveis de HbA1c iniciais entre os grupos, apresentando igualdade entre as condições de controle da glicemia no tempo 0 entre os grupos. Após a realização das terapias houve uma melhora significativa dos níveis de HbA1c no grupo teste ($p=0.0209$) e no grupo controle ($p=0.0128$) quando feita a análise intagrupos. Porém os resultados intergrupos, quando comparados, não apresentaram diferenças significantes (Tabela 2).

Tabela 2. Reduções da HbA1c durante o estudo.

HbA1c (em %)	RAR+Doxi	RAR+TFA
Inicial	9,7 ± 1,94	10,8 ± 2,69
3 meses	8,8 ± 1,62	9,4 ± 2,11
Diferença	0,9 ± 0,9	1,3 ± 1,63
<i>Valor de p</i>	<i>p</i> < 0,02	<i>p</i> < 0,02

Após a realização das terapias houve uma redução significativa dos parâmetros clínicos avaliados entre o exame inicial e as reavaliações de 1 e 3 meses ($p < 0,05$). Porém entre as reavaliações de 1 e 3 meses não houve diferença estatística na análise intragrupo.

Neste estudo, foram analisados para comparação apenas os sítios cuja profundidade de sondagem era igual ou superior a 4 mm na sondagem clínica inicial. As bolsas periodontais foram então divididas entre dentes unirradiculares e posteriormente estratificadas em bolsas de 4 mm, bolsas de 5 a 6 mm e bolsas maiores ou iguais a 7 mm. O efeito das terapias na redução dessas bolsas foi analisado individualmente. Dentro dos tempos experimentais propostos, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos dois tempos de reavaliação (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Porcentagem de redução para profundidade de sondagem ≤ 3 mm em dentes Unirradiculares

	RAR+Doxi	RAR+TFA	*Valor de p
4 mm	-	-	
1 mês	90,66 \pm 27,88	86,05 \pm 16,43	NS
3 meses	76,92 \pm 37,47	85,03 \pm 18,85	
5 a 6 mm	-	-	
1 mês	68,37 \pm 27,70	68,81 \pm 32,78	NS
3 meses	69,93 \pm 26,02	85,03 \pm 18,85	
≥ 7mm			
1 mês	50 \pm 43,3	24,36 \pm 25,02	NS
3 meses	62,5 \pm 54,49	48,72 \pm 50,05	

Tabela 4. Porcentagem de redução para profundidade de sondagem ≤ 3 mm em dentes Multiirradiculares.

	RAR+Doxi	RAR+TFA	*Valor de p
4 mm	-	-	
1 mês	83,29 \pm 21,61	71,50 \pm 31,10	NS
3 meses	87,34 \pm 19,16	84,75 \pm 25,12	
5 a 6 mm	-	-	
1 mês	72,76 \pm 37,81	63,09 \pm 40,08	NS
3 meses	85,15 \pm 29,33	77,65 \pm 29,08	
≥ 7mm			
1 mês	50 \pm 70,71	70,45 \pm 47,75	NS
3 meses	50 \pm 70,71	72,73 \pm 48,67	

A capacidade das duas terapias testadas em reduzir a profundidade de sondagem em pelo menos 2 mm em dentes multi e unirradiculares, independente de sua profundidade de sondagem inicial também não apresentou diferenças em nenhum dos tempos experimentais como pode ser observado no Gráficos 1 e 2, respectivamente.

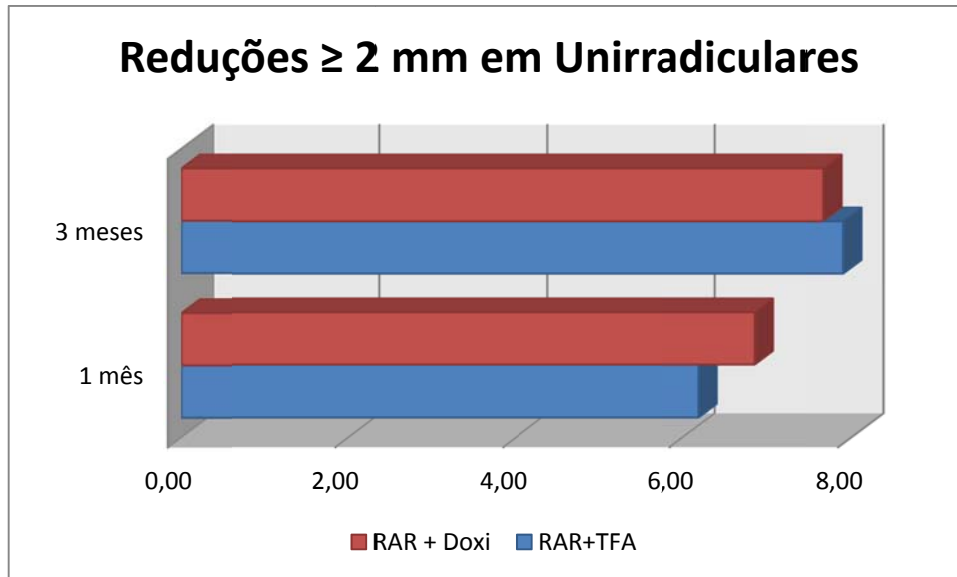


Grafico 1. Média de bolsas periodontais em dentes unirradiculares que sofreram redução ≥ 2 mm.

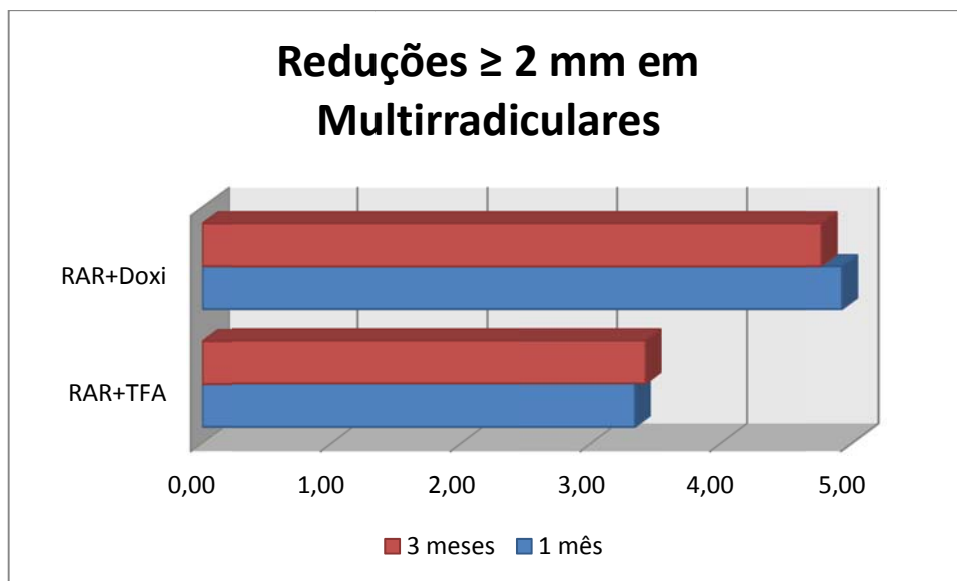


Grafico 2. Média de bolsas periodontais em dentes multirradiculares que sofreram redução ≥ 2 mm.

Os índices de placa apresentaram reduções significantes entre Baseline e 3 meses em ambos os grupos, não apresentando diferença entre eles. Quando foram comparadas as reduções do sangramento à sondagem, também não houve diferença entre os grupos no exame clínico inicial. Porém, quando a redução do Índice de Sangramento à Sondagem (ISS) foi comparada em 1 mês, houve diferença a favor do grupo teste (RAR+TFA), como se pode visualizar no Gráfico 3.

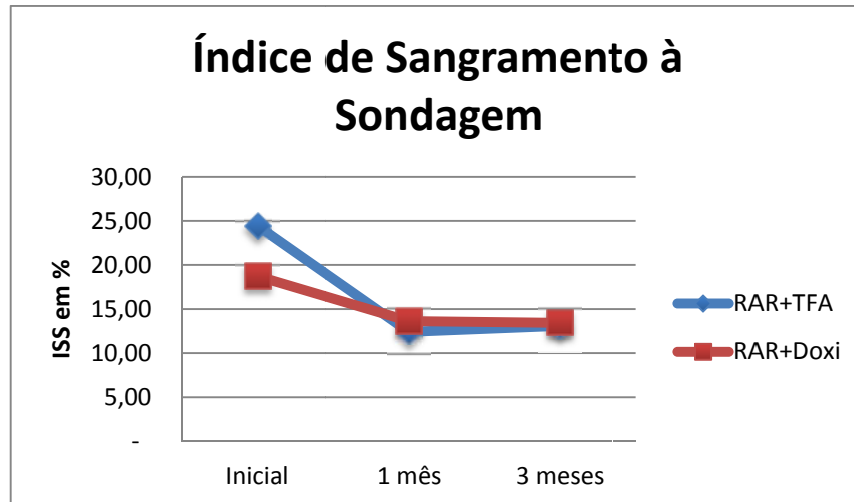


Gráfico 3. Índice de Sangramento à Sondagem dos grupos em seus respectivos tempos experimentais. Apesar do valor absoluto não apresentar diferença entre grupos, houve diferenças a favor do grupo teste na redução do sangramento à sondagem.

Quando a recessão gengival foi comparada, não houve diferença entre os grupos e o aumento da recessão gengival não foi estatisticamente significante (Tabela 5). Quando o ganho de inserção foi comparado, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos tempos experimentais. Na análise intragrupo houve diferença entre o ganho de inserção entre os tempos de 1 e 3 meses para o grupo RAR+Doxi ($p=0.0339$).

Tabela 5. Recessão gengival média nos tempos experimentais.

	RAR+Doxi	RAR+TFA	Valor de <i>p</i>
Inicial	0,71 ± 0,69	0,81 ± 0,67	NS
1 mês	0,91 ± 0,81	1,07 ± 0,70	NS
3 meses	1,02 ± 0,80	1,09 ± 0,61	NS

A mensuração dos níveis de TGF- β no fluido crevicular gengival falhou em demonstrar diferença entre os dois grupos durante todos os tempos experimentais como demonstrado no gráfico 4.

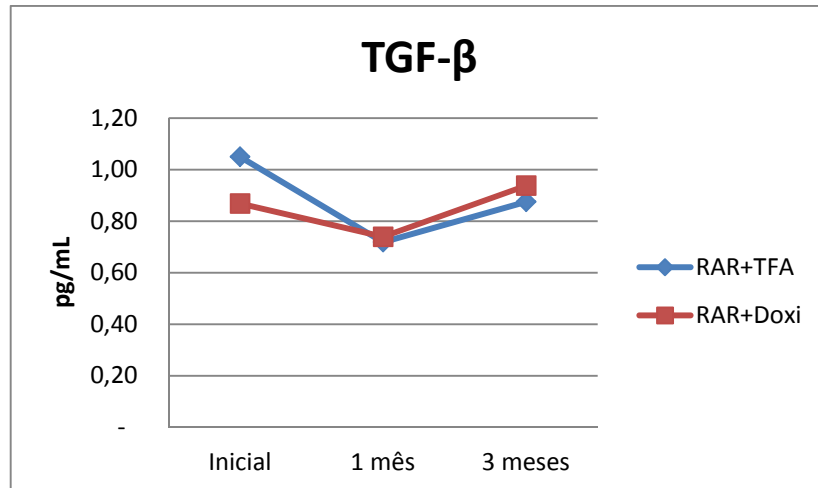


Gráfico 4. Níveis de TGF- β no fluido crevicular gengival. Não houve diferença entre os dois grupos.

Quando analisados os níveis de TNF- α , embora não tenha sido encontrada diferença entre os grupos na análise dos tempos entre-grupos, no grupo RAR+Doxi houve aumento dos níveis da citocina em 1 mês enquanto no grupo RAR+TFA houve redução. Em 3 meses os níveis de TNF- α seguiram a tendência crescente no grupo RAR+Doxi sendo significativamente maiores que os de 1 mês ($p=0.0004$), enquanto apresentaram significativa ($p=0.01$) redução no grupo RAR+TFA em relação a 1 mês, a diferença estatística, porém, não foi significativa entre os grupos (Gráfico 5).

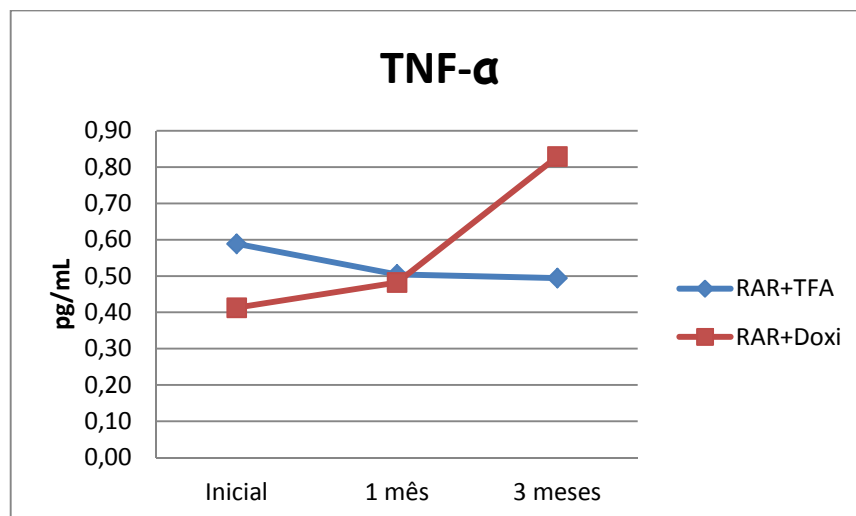


Gráfico 5. Discreta redução nos níveis de TNF- α no primeiro mês no grupo RAR+TFA, enquanto o grupo RAR+Doxi apresentou aumento, seguindo a tendência ao aumento até o terceiro mês. No grupo RAR+TFA a redução permaneceu, embora discreta.

Os níveis de IL1- β não apresentaram diferença entre grupos antes do tratamento (tempo 0). Na análise de redução entre os tempos de 0 e 1 mês, houve diferença em favor do grupo RAR+Doxi, com níveis mais baixos da citocina para esse grupo. Porém, na análise do tempo de 3 meses, a situação se inverteu, devido a um pico de aumento da detecção da citocina no fluido crevicular gengival do Grupo RAR+Doxi, enquanto notou-se apenas um discreto aumento dos níveis do grupo RAR+TFA. Com esses aumentos de diferentes proporções, houve diferença significativa entre os níveis de detecção em 3 meses (Gráfico 6)

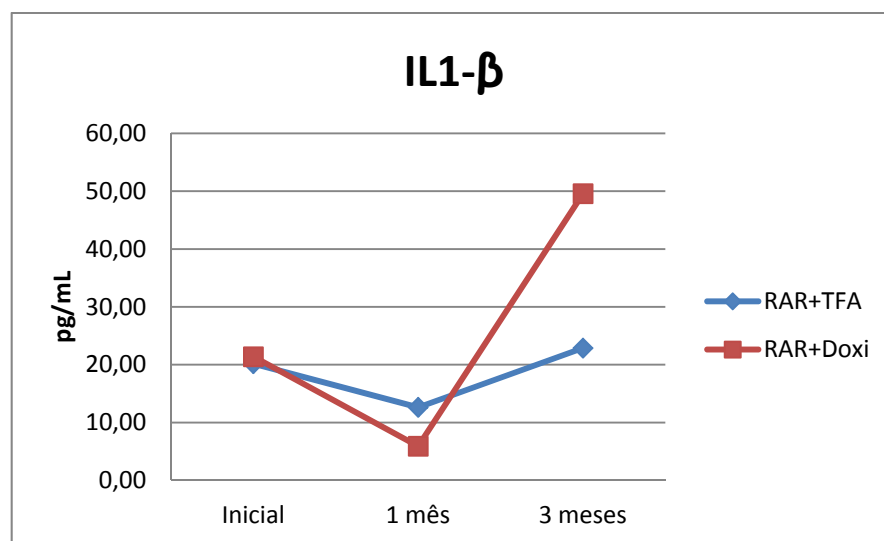


Gráfico 6. Níveis iniciais de IL1- β semelhantes para os dois grupos, sendo uma diferença nas reduções e nos níveis visualizada no tempo de 1 mês em favor do grupo RAR+Doxi, tendo essa situação invertida na avaliação de 3 meses.

Discussão

4. Discussão

Os resultados clínicos demonstraram similaridade entre os grupos em todos os parâmetros avaliados. Outros estudos que utilizaram a TFA como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento a periodontite crônica obtiveram resultados conflitantes entre si, sendo que a maior parte demonstra igualdade nos parâmetros clínicos, apresentando apenas diferenças quando avaliado o sangramento à sondagem^{30,31}. Uma outra publicação apresentou superioridade da aplicação adjunta de TFA em todos os parâmetros avaliados²⁹. Por outro lado, alguns autores não mostraram superioridade em nenhum dos parâmetros⁴².

Os protocolos utilizados nestes estudos consistiram na irrigação com cloreto de fenotiazina 10mg/ml após a raspagem e alisamento radicular, espera do tempo pré-irradiação de 1 a 3 minutos, variando entre os estudos, irrigação com soro fisiológico e aplicação de TFA 10 segundos por sítio com o laser vermelho de 660nm. Neste estudo, foi utilizado um tempo de pré irradiação de 5 minutos, tempo considerado ótimo para a absorção da fenotiazina pelas bactérias²⁶.

O único estudo utilizando a TFA no tratamento periodontal em diabéticos descontrolados comparou a Raspagem e Alisamento Radicular sem associação, associada à Doxíciclina sistêmica, ou associada à TFA. O protocolo utilizado foi de aplicação única, também com um laser vermelho, porém o corante possuía uma concentração e tempo de exposição diferentes, de 0.01 mg/ml e 60 segundos³². Os resultados diferiram dos apresentados no presente estudo, com uma superioridade do protocolo de doxíciclina sistêmica sobre os grupos sem o uso de antibiótico, inclusive na redução dos níveis de HbA1c. Uma possível explicação reside na utilização das aplicações múltiplas durante o mesmo tempo de ação do antibiótico sistêmico³³, além da maior concentração do corante⁴³.

A redução dos níveis de HbA1c após o tratamento periodontal em diabéticos tipo 2 tem sido relatada extensivamente^{44,45}, principalmente, devido à redução da área inflamada⁴⁶, variando de acordo com os protocolos de tratamento realizados^{37,32,44}.

O fato de não haver diferenças estatísticas nas reduções dos níveis de HbA1c foi outro fator que igualou as terapias. Apesar de não apresentar diferença estatística, numericamente, a redução da hemoglobina glicosilada foi maior no grupo em que foi aplicada a TFA (1.3% sendo 11% do total) em comparação com o grupo Doxi (0.9% sendo 8% do total), correspondendo a reduções médias em um valor de mais de 10% dos níveis iniciais, o que é considerado clinicamente relevante em termos de controle glicêmico⁴⁵. Ambos os tratamentos conseguiram reduções maiores do que as alcançadas com ações não farmacológicas de controle glicêmico como exercícios físicos ou dieta (0.66% e 0.25 a 2.5%, respectivamente)²⁵.

As reduções da HbA1c encontradas no grupo Doxi do presente trabalho foram diferentes que a de estudos anteriores^{37,32}, sendo menor que o alcançado por O'Connell (2008)³² e maior que os alcançados por Al-Zarhani (2009)³⁷. No entanto, os níveis de HbA1c iniciais também foram diferentes, sendo menores (8.42%) no estudo de Al-Zarhani (2009)³⁷ e maior (11.7%) no estudo de O'Connell (2008)³². As reduções absolutas e proporcionais, portanto, parecem estar relacionadas com os níveis iniciais de Hemoglobina Glicada.

Quando comparamos os grupos de tratamento com a TFA, a mesma diferença ocorre. Al-Zarhani obteve níveis iniciais de 9.25% de HbA1c, conseguindo reduções de 0.46% (5% do total inicial). Esses números divergem do presente estudo que obteve níveis médios iniciais de 10.8% e reduções médias de 1.3% (11% do total inicial). Essa divergência pode ser explicada pelas diferenças de HbA1c nos tempos 0, somado às múltiplas aplicações de TFA.

Deve-se lembrar, porém, que nos dias atuais existe uma grande preocupação com administração de antibióticos sistêmicos, principalmente no que tange o desenvolvimento de resistência bacteriana em sítios distantes dos sítios alvo. A resistência bacteriana aos

antimicrobianos tem sido referida como um problema de saúde pública^{47,48}. Com isso, a equivalência entre uma terapia local e uma sistêmica nos permite optar por uma técnica com menores riscos de resistência bacteriana em longo prazo e, por isso, benéfica ao paciente.

Os níveis aumentados de IL1- β no período pré-tratamento está de acordo com relatos anteriores⁴⁹ e sua redução após o tratamento era esperada devido à sua correlação com a severidade da doença⁴⁹. A maior redução em favor do grupo Doxi pode ser explicada devido às propriedades da doxiciclina em inibir metaloproteinases⁵⁰. A diferença relevante em curto prazo pode ser também explicada devido a coleta de fluido crevicular ter ocorrido apenas 15 dias após o término da terapia antibiótica em ambos grupos. Assim, a doxiciclina provavelmente manteve suas propriedades anticologenolíticas durante esse tempo. A redução no grupo TFA foi menor provavelmente devido as propriedades locais da terapia e, mesmo o laser de baixa potência possuindo propriedade anti-inflamatórias⁵¹, possivelmente a dose luminosa absorvida pelos tecidos na aplicação da TFA também não foi suficiente para promover este efeito, visto que a presença do corante também dificulta a entrega da luz aos tecidos devido a penetração do mesmo nas camadas mais superficiais do epitélio⁵².

No tempo de 3 meses, porém, as reduções alcançadas em um mês pelo grupo Doxi, não se mostrou estável, produzindo inclusive uma elevação dos níveis que chegaram ao dobro dos iniciais, denotando aumento do perfil inflamatório. Este aumento também ocorreu no grupo TFA, no entanto, em proporções muito menores, não chegando a ser significativamente maior do que os níveis de baseline. Não há na literatura atual estudos comparando resultados de 1 mês pós terapia no que tange os níveis de IL1- β . Um estudo anterior mensurou os níveis de IL1- β 3 meses após a terapia sem a associação da terapia antibiótica sistêmica e não apresentou aumento dos níveis de IL1- β em relação ao tempo 0⁵³. No entanto, alguns autores demonstraram níveis mais elevados de concentração da citocina após três meses de tratamento⁵⁴. Os níveis de HbA1c, porém, não acompanharam a alta da IL1- β , ao contrario do

apresentado em um estudo transversal anterior, que demonstrou correlação entre os níveis de HbA1c e IL-1 β ¹⁸.

Os níveis de TNF- α no grupo Doxi seguiram uma tendência de aumento, enquanto no grupo TFA houve queda dos níveis, mesmo que insignificantes, muito provavelmente pela inativação do TNF- α pela TFA⁵⁵ e vai de acordo com estudos anteriores utilizando a TFA como única terapia⁵⁶. Estudos anteriores demonstraram que o tratamento periodontal não cirúrgico associados à terapia antibiótica local reduziram os níveis plasmáticos de TNF- α e de HbA1c⁵⁷ essas reduções também foram apresentadas quando a terapia periodontal foi realizada sem a utilização de antimicrobianos adjuvantes⁵⁸.

Ao contrário do encontrado no grupo Doxi, a terapia periodontal sem a utilização de antimicrobianos sistêmicos apresentou redução dos níveis de TNF- α no fluido crevicular gengival⁵³ encontrando diferenças entre baseline e 3 meses assim como foi encontrado no grupo TFA do presente estudo e também em um trabalho que utilizou doses subantimicrobianas de doxiciclina como adjuvante à raspagem e alisamento radicular em pacientes não diabéticos⁵⁹.

O TGF- β tem sido considerado como uma citocina anti-inflamatória, demonstrando-se estimuladora da produção da IL-11 por fibroblastos do ligamento periodontal, que parece ser importante na homeostase do osso alveolar⁶⁰. Os níveis de TGF- β tem seus níveis aumentados em tecidos periodontais inflamados em relação a tecidos periodontais saudáveis, sendo considerado como um contrabalanceador da inflamação tecidual⁶¹. A terapia com doses subantimicrobianas adjunta à raspagem e alisamento radicular apresentou aumento dos níveis de TGF- β no fluido crevicular gengival em 3 meses⁶². Esses resultados vão de acordo com o presente estudo, porém, não há na literatura estudos relatando os níveis de TGF- β em tempos menores que 1 mês após a terapia periodontal não cirúrgica. Há relatos, porém, de aumento dos níveis de TGF- β em sítios que receberam terapia periodontal cirúrgica no período de 2

semanas pós operatórias, permanecendo até a sétima semana quando utilizada a Regeneração Tecidual Guiada, esse aumento, no entanto, correspondeu à presença da membrana nos tecidos, visto que os níveis de TGF- β declinaram até se igualarem a Baseline quando da retirada da membrana⁶³.

A redução na concentração de TGF- β no fluido crevicular, encontrada neste trabalho, pode ser explicada pelo perfil hiperinflamatório encontrado em pacientes diabéticos descontrolados, visto que, em trabalhos realizados em pacientes não diabéticos que receberam tratamento cirúrgico os níveis de TGF- β aumentaram em curto prazo⁶³.

Conclusões

5. Conclusões

Com os limites deste estudo, pode-se concluir que as duas terapias utilizadas foram efetivas na melhoras das condições periodontais e sistêmica dos pacientes.

A utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana parece ser uma opção viável, em conjunto com a raspagem e alisamento radicular, para o tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes diabéticos tipo 2 descontrolados.

A utilização da TFA como alternativa ao uso da Doxicilina Sistêmica parece ser a opção de primeira escolha devido a redução dos riscos de desenvolvimento de resistência bacteriana a antimicrobianos, considerando que pacientes diabéticos descontrolados possuem maior propensão a infecções do que paciente não diabéticos e diabéticos com controle glicêmico satisfatório.

As reduções mais significantes em marcadores inflamatórios podem ser indicativas de maior estabilidade dos resultados obtidos com a TFA, porém, mais estudos com maior duração de acompanhamento serão necessários para a confirmação desta hipótese.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. Scannapieco FA. Periodontal disease as a potencial risk factor for systemic diseases. *J Periodontol* 1998;69:841-850.
2. The Expert Comitee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*.1997, 20: 1183-97.
3. Mealey B. Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:935-49
4. Saremi A, Nelson RG, Tulloch-Reid M, Hanson RL, Taylor GW, Shlossman M, Bennett PH, Genco R, Knowler WC. Periodontal Disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28: 27-32
5. Loe H. Periodontal disease.The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care* 1993;16:329-334.
6. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontol disease in non-insulin- dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-130.
7. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, Nauck M, Kocher T. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 765–774.
8. Novaes AB, Jr., Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I-- Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996;7:65-73.
9. Novaes AB, Jr., Pereira AL, de Moraes N, Novaes AB. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J Periodontol* 1991;62:116-122.
10. Christgau M, Palitzsch K-D, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results.*J Clin Periodontol* 1998;25:112-124.
11. Westeflt E, Rylander H,Blohmé G, Jonasson P, Lindhe J.The effect of periodontal therapy in diabetics.Results after 5 years.*J Clin Periodontol* 1996;23:92-100.

12. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001;6:99-112.
13. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2001;28:306-310.
14. Engebretson S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R, Grbic J. Plasma levels of tumour necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 18–24.
15. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann periodontol.* 2001; 6(1): 125-137
16. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991;26:230-42.
17. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003;74:391-401.
18. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster IB. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004 ;75:1203-8.
19. Kurtis B, Tuter G, Serdar M, et al. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- α in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:1849-1855.
20. Gürkan A, Emingil G, C, Çınarcık S, Berdeli A. Post-treatment effects of subantimicrobial dose doxycycline on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor- β 1 in severe, generalized chronic periodontitis. *Int J Dent Hygiene* 2008; 6:84–92.
21. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF- β (transforming growth factor- β) in chronic inflammatory conditions—a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit* 2002; 8:145—51.
22. Gürkan A., Emingil G., Çınarcık S., Berdeli A. Gingival crevicular fluid transforming growth factor- β 1 in several forms of periodontal disease *Archives of Oral Biology*, 2006; 51: 906-912.

23. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Changes in transforming growth factor- β 1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 527–533.
24. Tervonen T, Karjalainen K. Periodontal Disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol*. 1997; 24; 505-510.
25. Position Statement Standards of Medical Care in Diabetes, ADA 2009
26. Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhong C, Zhang Z. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens for supragingival plaques. *Lasers Med Sci* 2008; 23: 49-54.
27. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *J Periodontol* 2008; 79: 1081-1087.
28. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of Experimental Periodontal Disease by Photodynamic Therapy in Diabetes. *J Periodontol* 2008; 79: 2156-2165.
29. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 877–884.
30. Chondros P, Nikolidakis D, Christoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2008.
31. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Scharwz F, Rössler E, et al. Photodynamic Therapy as Adjunct to Nonsurgical Periodontal Treatment. A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol* 2008; 79: 1638-1644.
32. Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term Effects of Photodynamic Therapy on Periodontal Status and Glycemic Control of Patients With Diabetes. *J Periodontol* 2009; 80; 1568-1573.
33. Lulic M, Görög IL, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical Trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 661-666.

34. Machtei EE, Christersson LA, Grossi SG, Dunford R, Zambon JJ, Genco RJ. Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol.* 1992; 63:206-214.
35. Quirynen M., Bollen CML, Vandekerckhove BNA, Dekeyser C, Pappaioanou W, Eysen H. Full- vs. Partial-mouth Disinfection in the Treatment of Periodontal Infections: Short-term Clinical and Microbiological Observations *J Dent Res.* 1995; 74: 1459-1467.
36. Santos VR, Lima JA, De Mendonça AC, Maximo MBB, Faveri M, Duarte PM. Effectiveness of full-mouth and partial-mouth scaling and root planing in treating chronic periodontitis in subjects with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2009; 80: 1237-1245.
37. O'Connell, PAA, Taba Jr M., Nomizo A., Freitas MCF., Suaid FA., Uyemura SA., Trevisan GL., Novaes Jr AB., Souza SLS., Palioto DB., Grisi MFM. Effects of Periodontal Therapy on Glycemic Control and Inflammatory Markers. *J Periodontol.* 2008; 49: 774-783.
38. Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A preliminary Randomized Controlled Clinical Study/ *J Periodol* 2007; 78: 965-973.
39. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol* 1972;43:38
40. Ainamo J, Bay I. [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet* 1976;80:149-152.
41. Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Sutcu R, Delibas N, Demirel R. Gingival crevicular fluid leptin levels in periodontitis patients with long-term and heavy smoking. *J Periodontol* 2006;77:634-640.
42. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis *J Clin Periodontol* 2009; 36: 575-580.
43. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B. Speight P. Wilson M. In Vivo Killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue-Mediated Photosensitization in an Animal Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 932-940.
44. Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 142–147.

45. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. (2005) Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res.* 200584:1154-1159.
46. Nesse W, Linde A, Abbas F, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, de Brabander EC, Gerstenbluth I, Vissink A. Dose–response relationship between periodontal inflamed surface area and HbA1c in type 2 diabetics. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 295–300. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01377.x.
47. World Health Organization. Antimicrobial resistance. *Essent Drugs Monit.* 2000; 28 & 29: 7-19.
48. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004; 10(12): S122-S129.
49. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB: GCF IL-1b profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 48–53
50. Golub LM, Sorsa T, Lee H-M, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995; 22:100-109.
51. Yu M, Naim JO, Lanzafame RJ. Effects of Photostimulation on Wound Healing in Diabetic Mice. *Lasers in Surg Med* 1997; 20: 56-63.
52. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In Vivo Killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue-Mediated Photosensitization in an Animal Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 932-940.
53. Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 835–843.
54. Correa FOB, Gonçalves D, Figueredo CMS, Gustafsson A, Orrico SRP. The Short –Term Effectiveness of Non-Surgical Treatment in Reducing Levels of Interleukin-1 β in Crevicular Fluid From Patients With Type 2 Diabetes Mellitus an Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79: 2143-2150.
55. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial Photodynamic Therapy May Promote Periodontal Healing Trough Multiple Mechanisms. *J Periodontol* 2009; 80: 1790-1798.

56. Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr., Garlet GP, Souza RF, Taba M Jr. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: Cytokine Profile in Gingival Crevicular Fluid, Preliminary Results. *J Periodontol* 2009 80: 98-105.
57. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, Fukuda T, Tsuji T, Iwamoto M, Murayama Y The Effect of Antimicrobial Periodontal Treatment on Circulation Tumor Necrosis Factor-Alpha and Glycated Hemoglobin Level in Patients With Type 2 Diabetes. *J Periodontol* 2001; 72:774-778.
58. Correa FOB, Gonçalves D, Figueredo CMS, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SRP. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 53–58.
59. Emingil G, Gürkan A, Atilla G, Kantarc A. Subantimicrobial-Dose Doxycycline and Cytokine –Chemokine Levels in Gingival Crevicular Fluid. *J Periodontol* 2011;82:452-461.
60. Yashiro R, Nagasawa T, Kiji M, Hormdee D, Kobayashi H, Koshy G, Nitta H, Ishikawa I. TGF- β stimulates IL-11 production by human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 165–171
61. Steinsvoll S, Halstensen TS, Schenck K. Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 366–373.
62. Gürkan A, Çınarık C, S, Hüseyinov A. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline: effect on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor β 1 levels in severe, generalized chronic periodontitis. *J Clin Peridontol* 2005; 32: 244–253.
63. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. (2004) Changes in transforming growth factor- β 1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol* 31: 527–533.

Artigo em Inglês

Antimicrobial Photodynamic Therapy as an alternative to Systemic Antibiotics: Results from a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Study on type 2 Diabetic Patients.

Umberto D. Ramos, Graduate student of Periodontology¹

Lauro G. Ayub, Graduate student of Periodontology¹

Danilo M. Reino, Graduate student of Periodontology¹

Arthur B. Novaes Jr., Chairman of Periodontology¹

Mário Taba Jr., Professor of Periodontology¹

Sérgio L.S. Souza, Professor of Periodontology¹

Daniela B. Palioto, Professor of Periodontology¹

Márcio F.M. Grisi, Professor of Periodontology¹

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

Running title: aPDT reduces IL1- β

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy; type 2 diabetes mellitus; doxycycline; glycated haemoglobin A; interlekin-1.

Correspondence address: Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. do Café, S/N, 14040-904, Ribeirao Preto, SP, Brazil. Daytime Telephone: +55-16-3602-3980; Fax: +55-16-3602-4788.

E-mail: mfgrisi@netsite.com.br

Conflict of Interest and Sources of Funding Statement: The authors declare that there are no conflicts of interest in this study. This study was financial supported by the State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP: protocol numbers 2010/07326-0).

Abstract

Aim: This randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study compared a multiple application Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) treatment protocol with systemic doxycycline as adjuvant to scaling and root planning, to treat chronic periodontitis on type 2 diabetic patients on clinical, systemic and immune-inflammatory outcomes.

Materials and Methods: Twenty six patients with Hba1c >7% were randomly allocated in two groups, SRP+Doxy (n=14) using systemic doxycycline 100 mg and SRP+aPDT (n=12) with multiple applications (0, 3, 7 and 14 days). Monitored parameters of plaque score (PS), bleeding on probe (BOP), probing depth (PD), suppuration (S), gingival recession, and relative clinical

attachment level (RCAL), glycated haemoglobin (HbA1c) were measured at baseline and 3 months after therapy, the cytokine profile was assessed at 0, 1 and 3 month to measure IL1- β , TNF- α and TGF- β on Gingival Crevicular Fluid.

Results: There were no statistically significant differences on intergroup on clinical parameters and HbA1c levels. Systemic doxycycline shoed difference in reduction of IL1- β at 1 month, but aPDT better results at 3 months IL1- β levels. There were no differences between TNF- α and TGF- β trough experimental times

Conclusions: Both treatments were effective to improve clinical and systemic outcomes and aPDT seems to have a great stability on of IL1- β reductions. (Clinicaltrials.gov Identifier: NCT01175720).

Clinical Relevance

Scientific rationale for study: An increasing worry with bacterial resistance has raised the question of alternative therapies such as antimicrobial photodynamic therapy. This study compared a protocol of multiple application of aPDT and a systemic antibiotic protocol on treatment of type 2 uncontrolled diabetic patients.

Principal findings: At 3 months, the proposed technique was statistically better on reducing IL1- β levels and numerically better on reducing HbA1c.

Practical implications: The proposed technique was found to be achieving more stable results on cytokine profiles and the same clinical outcomes than standard technique; it is a possible alternative to the use of systemic antibiotics on periodontology.

INTRODUCTION

Periodontitis is defined as a polymicrobial inflammatory disease of the gingiva and the adjacent attachment apparatus, characterized by loss of clinical attachment due to destruction of the periodontal ligament and loss of the adjacent supporting bone. Diabetic patients are more susceptible to periodontal disease and have a greater progression, specially, those with poor glycemic control (HbA1c>7%) (Bandyopadhyay et al., 2010; Mealey & Oates, 1998; Position Statement ADA, 2009).

Diabetes Mellitus is one of a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. Based this, it can be classified in Type I, characterized by the lack of insulin production due to β pancreatic cells, or type II, characterized by insulin resistance due to defect on insulin molecule or on cell receptors.

The hyperglycemic condition has been correlated with the severity of periodontal disease, plasmatic levels of TNF- α , and has a positive correlation with high levels of IL1- β on Gingival Crevicular Fluid (GCF) in diabetic and non-diabetic patients (Nesse et al., 2009; Wolff et al., 2009; Correa et al., 2008; Navarro-Sanchez et al., 2007; Engebretson et al., 2007).

Glycemic condition has shown to improve with periodontal treatment, specially, when associated with systemic doxycycline (O'Connell et al., 2008; Al-Zahrani et al., 2009). However, the use of systemic antimicrobial therapy may have some adverse effects such as gastrointestinal disturbance, allergies, headache and dizziness. In addition, the recurrent use of antibiotics may lead to bacterial resistance and possible future complication in future infections (Haffajee, 2006; Levy & Marshall, 2004; WHO, 2000).

Thus, local antibiotics have been proposed as adjunct to scaling and root planning on periodontal treatment of type 2 diabetic patients (Iwamoto et al., 2001). Although local antibiotic therapy reduces the possibility of bacterial resistance, this method can be technically difficult to apply cases with multiple deep pockets (Greenstein, 2006). To overcome those problems, Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) has been proposed as adjunctive to mechanical therapy, and has ability to inactivate periodontal pathogens (Packer et al., 2000; Kömerik et al., 2003).

Some authors compared aPDT as unique treatment and SRP, finding similar clinical and immunological results between both therapies, when treating aggressive periodontitis (Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2009). The use of a single episode of aPDT presented divergent results when treating chronic periodontitis. Some authors achieved superior clinical outcomes (Braun et al., 2008). However, the commonly results presented differences only on bleeding on probing evaluation (Chondros et al., 2009; Christodoulides et al., 2008). The best clinical result was achieved using multiple aPDT application (Lulic et al., 2009). Single applications of aPDT as adjunctive to SRP haven't shown additional benefits on treatment of uncontrolled diabetic patients (Al-Zahrani et al., 2009).

The aim of this double blind randomized placebo-controlled randomized clinical trial was to compare, clinically and immunologically in humans, a protocol of multiple aPDT applications and the use of systemic doxycycline as adjuvant to SRP on the treatment of uncontrolled type 2 diabetic patients.

MATERIAL AND METHODS

Experimental population and Study Design

This study is a parallel group, double blind placebo-controlled, randomized clinical trial designed to compare two treatment protocols for treatment of periodontal disease on uncontrolled type 2 diabetic patients. The study was conducted, according to the principles outlined in Declaration of Helsinki on experimentation involving human subjects, after the approval of the Institution's Human Research Committee (protocol 2010.1.157.58.0).

Two thousand of medical records were reviewed between 2010 and 2012 to select 150 patients aged 40 to 70 with HbA1c >7% and, 28 patients followed the inclusion criteria of this study: type 2 DM diagnosed for >5 years and HbA1c >7%, at least one site with probing depth (PD) \geq 5mm on each quadrant and two teeth with attachment loss \geq 6mm. Exclusion criteria were: use of antibiotics or periodontal treatment in previous 6 months, smoking within the past 5 years, pregnancy or lactation, major diabetic complications, and concomitant medical therapy to the others systemic complications. The selected patients had a minimum of 15 teeth (Figure 1).

Twenty six patients agreed to participate and provided informed consent after explanation of all risks and benefits involved in the procedures, 2 patients from aPDT group did not accepted all terms and received periodontal treatment as regular patients at University of São Paulo. The patient were randomly assigned in two groups: SRP+aPDT (applications on 0, 3, 7 and 14 days post-therapy with a placebo medication) and SRP+Doxy (Systemic Doxycycline 100mg/day for 14 days with a first dose of 200mg and the same protocol used on aPDT group, without light exposure). The SRP sessions were performed by the same operator, UDR, in one to two sessions within 24 hours using hand instruments and an ultrasonic device while the subjects were under local anesthesia. The aPDT was performed on every tooth with PD > 4mm and furcations were considered as two unirradicular teeth. A phenothiazine chloride solution 10mg/ml (Helbo Blue®, Helbo Medizintechnik GmbH, Austria) irrigating the pocket apico-coronally, 5 minutes of pre irradiation time (Qin et al., 2008), followed by irrigation with saline solution (approximately 1 ml per tooth), and irradiation with a red laser (HELBO® *TheraLite Laser*, Helbo Medizintechnik GmbH, Austria) for 10 seconds each site (70 mW of power, and a power density of 28mW/cm²), with an optic fiber angulated 60°, 0.06mm diameter, 8mm length, delivering a total energy of 2.79J/cm² per site (16.72

J/cm² per tooth). Patients from both groups received dental prophylaxis monthly until the third month.

Randomization Procedure

The randomized allocation was performed by a single examiner (U.D.R.) using a software program (SPSS Inc., Chicago, IL USA) by a computer-generated randomly permuted block. Allocation was concealed with opaque envelopes until one session before the scaling root planning session because of the need to prescribe the antibiotic therapy.

The randomization process resulted in comparable mean values of all investigated clinical parameters at baseline in both groups.

Clinical Parameters and Gingival Crevicular Fluid Collection

Each patient contributed with four samples of different sites that were pooled. GCF was collected from the deepest periodontal pocket from the maxillary anterior area of each quadrant to avoid salivary contamination and because of easy fluid collection (Bozkurt et al., 2006). Briefly, teeth were air-dried and isolated with cotton rolls. Supra gingival plaque was gently removed, and GCF was sampled with a pre-cut methylcellulose filter papers strips for 30 seconds (Oliveira et al., 2009). Strips were measured for fluid volume and then moved to micro centrifuge tubes. The absorbed GCF volume of each strip was determined by an electronic gingival fluid measuring device. The readings from the electronic instrument were converted to an actual volume (microliters) by reference to the standard curve. After this measurement, the samples of each patient were pooled, transferred to Eppendorf tubes isolated with parafilm and stored at -80C.

Measurements of cytokines in GCF were performed as previously described. The concentrations of the cytokine were determined by Multiplex immunoassay (Luminex Corporation Austin, TX, EUA), using commercially available kits (Milliplex MAG® Billerica, MA, EUA) according to the manufacturer's instructions. Calculation of the IL1- β concentration in each GCF sample was performed by dividing the total amount of IL1- β by the volume of the sample. The results are expressed as picograms of cytokine per microliter of GCF, from duplicate measurements (Oliveira et al., 2009).

The clinical parameters were recorder by a blinded experienced examiner with no contact to treatment performed, LGA. A computerized periodontal probe (Florida

Probe Corporation Gainesville, FL, USA) was used to perform the periodontal measurements. Six sites per tooth were recorded at baseline, at 1 and 3 months post-treatment. The parameters recorded were probing depth (PD), relative clinical attachment level (RCAL), bleeding on probing (BOP), suppuration (SUP), and the presence or absence of biofilm at four sites per tooth (plaque index [PI]). BOP was assessed simultaneously with the pocket measurements, and the presence or absence of bleeding up to 30 seconds after probing was recorded (O'Connell et al., 2008).

For the metabolic assessment, peripheral blood samples were analyzed for HbA1c. The samples were analyzed by the same laboratory on the same enzymatic method (O'Connell et al., 2008). HbA1c was expressed as a percentage, and it was measured by high-pressure liquid chromatography (Labtest Sistemas para Diagnóstico, Lagoa Santa, MG, Brazil.).

Statistical Analysis

The Lilliefors normality test was applied for all variables studied and the results showed the necessity of non-parametric tests. The intergroup analysis for bleeding on probing, plaque index, and pocket closure was performed with the Friedman test. Mann-Whitney test was used for intergroup analysis of stratified periodontal pockets, reductions above 2mm, Relative Clinical Attachment Level and Gingival Recessions. For inter and intragroup cytokine analysis, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used, respectively.

RESULTS

No adverse effects or discomfort were reported by any of the subjects. The final enrolled sample consisted of 26 subjects (14 on the Doxy group and 12 on the aPDT group) with poorly controlled diabetes with an elevated mean HbA1c serum level of 9.7% and 10.8%, respectively, with no statistical difference between groups. There was no difference in gender distribution (6 men and 6 women on Doxy group and 7 men and 7 women on aPDT group). The age ranged from 40 to 70 years old and did not achieve statistical significance.

There were statistical differences between HbA1c level at Baseline and 3 months analysis for both groups, aPDT ($p=0.0209$) and Doxy ($p=0.0128$), with mean reductions of 0.9 ± 0.9 for Doxy group, and 1.3 ± 1.63 for aPDT group. Nevertheless, there was no statistical difference in the intergroup analysis, regarding the Hb1c reductions.

Regarding clinical findings there was a significant reduction on PD, RCAL, PI and BOP between baseline, 1 and 3 months ($p < 0.05$). Both groups showed no difference between them on the clinical parameters evaluated on all experimental times.

This study separated uni and multiradicular teeth periodontal pockets in three categories according to PD: 4mm, 5 and 6 mm and more than 6 mm (≥ 7 mm) (Wennström et al., 2005). The therapy effectivity was analyzed individually as the percentage of periodontal pockets that achieved more than 2mm of reduction (Table 2). There was no statistical difference between groups at various times. At 1 and 3 month examination the percentage of sites that reached successful treatment endpoint of 'pocket closure' (Wennström et al., 2005) was examined showing no difference between groups (Table 3). Gingival recession and Clinical Attachment level showed no difference between groups on intergroup analysis. Intragroup analysis showed significant difference between baseline and 1 month at both groups, but between 1 and 3 month analysis, only group Doxy showed significant differences ($p = 0.0339$).

The evaluation of BOP showed no difference when considering absolute numbers. Nevertheless, the reduction of BOP on the first month showed statistical difference in favor of aPDT group. On third month there was no difference between BOP reductions (Figure 2).

There were no significant differences between groups on TGF- β levels on GCF in all experimental times, with baseline concentration of 1.05 ± 0.66 pg/ml for aPDT group and 0.87 ± 0.55 pg/ml for Doxy group. At 1 month collection, TGF- β level reduced to 0.72 ± 0.53 pg/ml and 0.74 ± 0.67 pg/ml, respectively. At 3 months, these levels raised to 0.88 ± 0.54 pg/ml on aPDT group and 0.94 ± 0.80 pg/ml on Doxy group.

The levels of TNF- α did not reached intergroup significant difference on all experimental times. The levels showed a time dependent increase on Doxy group, with baseline concentration of 0.41 ± 0.31 pg/ml, 0.48 ± 0.18 pg/ml at 1 month, and 0.83 ± 0.59 pg/ml at 3 months. The proportional increase from baseline and 3 month, in comparison with 1 month reached statistical significance ($p = 0.0004$). On the other hand, on aPDT group, the baseline level of TNF- α (0.59 ± 0.66 pg/ml) decreased at 1 month (0.50 ± 0.39 pg/ml) and remained almost stable at 3 months (0.49 ± 0.22 pg/ml), this group presented a significant difference when the comparing the proportional decrease of TNF- α in 1 and 3 months ($p = 0.01$).

The levels of IL1- β did not showed significant difference between groups on baseline levels, 20.18 ± 13.33 pg/ml on aPDT group and 21.38 ± 20.70 pg/ml on Doxy group. The levels had decayed significantly in both groups to 12.63 ± 7.66 pg/ml and 5.90 ± 6.44 pg/ml, respectively, with intergroup difference in favor to the Doxy group ($p=0.0168$). The GCF levels of IL1- β at 3 months have increased in different proportions on both groups reaching significant higher levels at Doxy group ($p=0.0037$). This increase reached higher levels than baseline on doxy group (49.57 ± 26.83 pg/ml). The cytokine levels are exposed on figure 3.

DISCUSSION

The clinical results founded on this study demonstrated similarity between the proposed treatment protocols. However, it is important to highlight that there is an increasing worry with systemic antibiotic administration and bacterial resistance. Bacterial resistance has been referred as public health issue (WHO, 2000; Levy & Marshall, 2004). Thus, the similarity of a local and systemic therapy would be desirable in order to avoid risk of resistance.

Other studies have used aPDT as adjuvant to scaling and root planning to treat chronic periodontitis with conflicting results, most of them show only differences regarding bleeding on probing in favor of aPDT (Chondros et al., 2009; Christodoulides et al., 2008). Braun et al. (2008) showed superior results in favor of aPDT in all parameters evaluated. On the other hand, Polansky et al. (2009) did not found difference in any of the clinical parameters.

The aforementioned studies had used the same photosensitizer used in this paper (phenothiazine chloride 10mg/ml) and the protocols consisted on irrigation of the pocket and a pre-irradiation time ranging 1 to 3 minutes, followed by irrigation with saline solution and red laser application for 10 seconds per site. On our study a pre irradiation time of 5 minutes was used in accordance to a previous publication that considered it the optimal preirradiation time (Qin et al., 2008).

A previous study compared SRP, aPDT as adjuvant to SRP and SRP combined with systemic doxycycline to treat periodontal disease on type 2 diabetic patients. It was used a single application of aPDT. However, there was used a different photosensitizer concentration and light dose. The results were different from those of the present study and showed superiority of systemic doxycycline on HbA1c reduction and on clinical

outcomes (Al-Zahrani et al., 2009). A possible explanation for the difference is the use of multiple applications respecting the same period of systemic antibiotics and a higher concentration of photosensitizer, used on the present study (Kömerik et al., 2003).

On the other hand, the use of multiple applications of aPDT adjunctive with SRP demonstrated higher treatment efficiency than only SRP in chronic periodontitis patients with residual pockets (Lulic et al., 2009), a possible explanation for the difference between the present study and previous studies (Chondros et al., 2009; Christodoulides et al., 2008; Polansky et al., 2009; Al-Zahrani et al., 2009).

The effect of periodontal treatment on HbA1c reduction has been extensively reported on literature (Koromantzos et al., 2011; Janket et al., 2005) and has been associated with the reduction of total inflamed area (Nesse et al., 2009). The reduction had shown to differ in accordance to treatment protocol (O'Connell et al., 2008; Al-Zarhani et al., 2009; Koromantzos et al., 2011).

The HbA1c reductions on the present study did not differ between therapies. Although, there was no statistical difference, the Hba1c reduction was numerically higher on aPDT group (1.3%, and, when considering the proportion, 11%), in comparison with Doxy group (0.9% of reduction and, 8% in proportion). Another important data is that the reductions on aPDT group reached more than 10%, proportionally. A mean 10% reduction is considered as clinically relevant when considering glycemic control (Janket et al., 2005). Both treatments reached higher reduction than is achieved with physical exercise or dietary control (0.66% and 0.25 to 2.5%, respectively) (Position Statement ADA, 2009).

The HbA1c reductions founded on Doxy group on present study were different than previous publications (O'Connell et al., 2008; Al-Zarhani et al., 2009). O'Connell et al. (2008) reached higher reductions, while Al-Zahrani et al. (2009) achieved lower reductions. These differences seems to be related to HbA1c baseline levels: 8.42% (Al-Zarhani et al., 2009), 11.7% (O'Connell et al., 2008), and 9.7% on the present study.

However, it is important to highlight that there is an increasing worry with systemic antibiotic administration and bacterial resistance. Bacterial resistance has been referred as public health issue (WHO, 2000; Levy & Marshall, 2004). Thus, the similarity of a local and systemic therapy would be desirable in order to avoid risk of resistance.

The high levels of IL1- β on pretreatment are in accordance to anterior studies (Engebretson et al., 2002). The higher reduction on 1 months analysis in favor of Doxy

group can be explained due to capacity to inhibit matrix metalloproteinase (Golub et al., 1995), and the short time between the last systemic doxycycline dose and the GCF collection (14 days), thus, the anticollagenolytic property was, probably, still active. The minor reductions on aPDT group, although the anti-inflammatory properties of low laser therapy (Yu et al., 1997), the light dose delivered probably did not reach therapeutic levels due to photosensitizer absorption on superficial epithelial layers (Kömerik et al., 2003).

On 3 months analysis, the effects achieved in a short time were not maintained at Doxy group. The GCF levels of IL1- β have risen substantially until reach 2 fold baseline level, presenting an inflammatory exacerbation. On aPDT group, there was an increase of IL1- β on GCF but in minor proportions and did not reach significant difference from baseline levels. The increase of IL1- β levels on GCF is in accordance to previous studies when antibiotics weren't used (Correa et al., 2008), but did not happen when antibiotics were used (Navarro-Sanchez et al., 2007). Although a transversal study have found positive correlation between levels of IL1- β and HbA1c (Engebretson et al., 2004), the increase of cytokine detection did not present an increase on plasmatic HbA1c.

Gingival crevicular fluid levels of TNF- α on Doxy group had an increasing tendency, while aPDT group presented reduction on TNF- α detections, probably, due to inactivation of TNF- α by aPDT (Braham et al., 2009) and are in accordance with previous studies (Oliveira et al., 2009). Previous studies with the use of antibiotic and use doxycycline subantimicrobial doses founded reduction on 3 months after treatment (Navarro-Sanchez et al., 2007; Emingil et al., 2011).

TGF- β has been considered an anti-inflammatory cytokine and seems to stimulate IL-11 production by periodontal ligament fibroblasts (Yashiro et al., 2006). TGF- β has its levels increased on inflamed periodontal tissues and contra balances proinflammatory cytokines such as IL1- β (Steinsvoll et al., 1999). Subantimicrobial doxycycline therapy as an adjunct to SRP seems increase detection of TGF- β on GCF after 3 months (Gürkan et al., 2005), being in accordance with present study. Unfortunately, there are not data on literature regarding 1 month levels of TGF- β , but it seems increase 2 weeks after periodontal surgery, remaining high until the seventh week, when guided tissue regeneration is performed (Kuru et al., 2004).

CONCLUSION

Within the limits of this study it was possible to conclude that both therapies were effective to improve periodontal and systemic condition of uncontrolled type 2 diabetic patients. Antimicrobial photodynamic therapy seems to be a tangible as an adjunctive therapy on treatment of type 2 diabetic patients and an option to avoid the possibility of bacterial resistance to antibiotics

The long term reductions of inflammatory cytokine may indicate a better stability of clinical outcomes achieved by aPDT. Although, longer follow up studies are needed to prove this hypothesis.

REFERENCES

- Bandyopadhyay D, Marlow NM, Fernandes JK, Leite RS (2010) Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. *J Clin Periodontol* 37, 501–509. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01564.x.
- Mealey BL, Oates TW. (2006) Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 77, 1289-1303.
- The Expert Comitee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*.1997, 20: 1183-97.
- Wolff RE, Wolff LF, Michalowicz BS. (2009) A Pilot Study of Glycosilated Hemoglobin Levels in Periodontitis Cases and Healthy Controls. *J Periodontol* 80, 1057-1061.doi:10.1902/jop.2009.080664.
- Nesse W, Linde A, Abbas F, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, de Brabander EC, Gerstenbluth I, Vissink A. (2009) Dose–response relationship between periodontal inflamed surface area and HbA1c in type 2 diabetics. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 295–300. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01377.x.
- Correa FOB, Gonçalves D, Figueredo CMS, Gustafsson A, Orrico SRP. (2008) The Short – Term Effectiveness of Non-Surgical Treatment in Reducing Levels of Interleukin-1 β in Crevicular Fluid From Patients With Type 2 Diabetes Mellitus an Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 79: 2143-2150.
- Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. (2007) Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol* 34: 835–843.
- Engebretson S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R, Grbic J. (2007) Plasma levels of tumour necrosis factor-a in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 34: 18–24.
- O’Connell, PAA, Taba Jr M., Nomizo A., Freitas MCF., Suaid FA., Uyemura SA., Trevisan GL., Novaes Jr AB., Souza SLS., Palioto DB., Grisi MFM. (2008) Effects of Periodontal Therapy on Glycemic Control and Inflammatory Markers. *J Periodontol*. 49: 774-783.
- Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. (2009) Short-term Effects of Photodynamic Therapy on Periodontal Status and Glycemic Control of Patients With Diabetes. *J Periodontol* 80; 1568-1573.

- Haffajee AD. (2006) Systemic antibiotics: To use or not to use in the treatment of periodontal infections. That is the question. *J Clin Periodontol* 33:359-361.
- Levy SB, Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10(12): S122-S129.
- World Health Organization. (2000) Antimicrobial resistance. *Essent Drugs Monit.* 28 & 29: 7-19.
- Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, Fukuda T, Tsuji T, Iwamoto M, Murayama Y (2001) The Effect of Antimicrobial Periodontal Treatment on Circulation Tumor Necrosis Factor-Alpha and Glycated Hemoglobin Level in Patients With Type 2 Diabetes. *J Periodontol* 72:774-778.
- Greenstein G. (2006) Local drug delivery in the treatment of periodontal diseases: Assessing the clinical significance of the results. *J Periodontol* 77:565-578.
- Packer S, Bhatti M, Burns T, Wilson M. (2000) Inactivation of Proteolytic Enzymes from *Porphyromonas gingivalis* Using Light-activated Agents. *Lasers Med Sci* 15: 24-30.
- Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. (2003) In Vivo Killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue-Mediated Photosensitization in an Animal Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 932-940.
- Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. (2007) Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A preliminary Randomized Controlled Clinical Study. *J Periodontol* 78: 965-973.
- Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr., Garlet GP, Souza RF, Taba M Jr. (2009) Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: Cytokine Profile in Gingival Crevicular Fluid, Preliminary Results. *J Periodontol* 80: 98-105.
- Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. (2008) Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 35: 877-884.
- Chondros P, Nikolidakis D, Christoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. (2009) Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 24(5): 681-688.

- Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Scharwz F, Rössler E, et al. (2008) Photodynamic Therapy as Adjunct to Nonsurgical Periodontal Treatment. A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol* 79: 1638-1644.
- Lulic M, Görög IL, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. (2009) One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical Trial. *J Clin Periodontol* 36: 661-666.
- Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhon C, Zhang Z. (2008) Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens for supragingival plaques. *Lasers Med Sci* 23: 49-54.
- Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Sutcu R, Delibas N, Demirel R. (2006) Gingival crevicular fluid leptin levels in periodontitis patients with long-term and heavy smoking. *J Periodontol* 77:634-640.
- Wennström JL, Tomasi C, Bertelle A, Dellasega E. (2005) Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planning as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 32: 851–859. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00776.x.
- Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. (2009) Short-term Effects of Photodynamic Therapy on Periodontal Status and Glycemic Control of Patients With Diabetes. *J Periodontol* 80; 1568-1573.
- Koromantzios PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. (2011) A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 38: 142–147.
- Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. (2005) Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res*. 84:1154-1159.
- Nesse W, Linde A, Abbas F, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, de Brabander EC, Gerstenbluth I, Vissink A. (2009) Dose–response relationship between periodontal inflamed surface area and HbA1c in type 2 diabetics. *J Clin Periodontol* 36: 295–300. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01377.x.
- Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB (2002) GCF IL-1b profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 29: 48–53.

- Golub LM, Sorsa T, Lee H-M, et al. (1995) Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 22:100-109.
- Yu M, Naim JO, Lanzafame RJ. (1997) Effects of Photostimulation on Wound Healing in Diabetic Mice. *Lasers in Surg Med* 20: 56-63.
- Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster IB. (2004) Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol*. 75:1203-8.
- Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. (2009) Antimicrobial Photodynamic Therapy May Promote Periodontal Healing Through Multiple Mechanisms. *J Periodontol* 80: 1790-1798.
- Emingil G, Gürkan A, Atilla G, Kantarc A. (2011) Subantimicrobial-Dose Doxycycline and Cytokine –Chemokine Levels in Gingival Crevicular Fluid. *J Periodontol* 82:452-461.
- Steinsvoll S, Halstensen TS, Schenck K. (1999) Extensive expression of TGF- β 1 in chronically- inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol* 26: 366–373.
- Gürkan A, Çınarık C, S, Hüseyinov A. (2005) Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline: effect on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor β 1 levels in severe, generalized chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 32: 244–253.
- Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. (2004) Changes in transforming growth factor- β 1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol* 31: 527–533.