



**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**  
**Área de concentração em Periodontia**

**RAPHAEL ANDRETO DIAS**

**TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA À RASPAGEM E  
ALISAMENTO RADICULAR E ANTIBIOTICOTERAPIA  
SISTÊMICA NO TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS FUMANTES  
COM PERIODONTITE CRÔNICA.**

Guarulhos

2012

**RAPHAEL ANDRETO DIAS**

**TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA À RASPAGEM E  
ALISAMENTO RADICULAR E ANTIBIOTICOTERAPIA  
SISTÊMICA NO TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS FUMANTES  
COM PERIODONTITE CRÔNICA.**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para  
obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro

Profa. Dra. Magda Feres

Guarulhos

2012

Dias, Raphael Andreto

Terapia fotodinâmica associada à raspagem e alisamento radicular e antibioticoterapia sistêmica no tratamento de indivíduos fumantes com periodontite crônica / Raphael Andreto Dias. Guarulhos, 2012.

96 f; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade de Guarulhos, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri

Bibliografia: f. 74 – 96

1. Fumantes 2. Doença Periodontal 3. Fatores de Risco 4. Terapia Fotodinâmica 5. Antibioticoterapia. I. Título. II. Universidade de Guarulhos.

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Gonçalo e Maria que sempre me demonstraram força e garra para vencer na vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sempre estar presente em minha, guiando-me e me dando força e inteligência.

A minha irmã Camila por sempre estar presente, e mesmo com a sua inocência eterna sempre transmitindo alegria de viver.

A minha irmã Patricia por todo o incentivo e ajuda nos momentos de desespero.

A minha noiva Keila por toda paciência neste período.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Faveri por toda a ajuda e paciência, tanto na clinica de periodontia, como na conclusão deste trabalho, me mostrando o que é ser realmente um mestre, sem você nada disso seria possível.

A Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana da Costa Ribeiro que não mediu esforços para realização dessa pesquisa, estando sempre disposta a ajudar e orientar.

A Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciene Figueiredo por todo o conhecimento transmitido e paciência tanto na sala de aula como na clinica.

A todo corpo docente do Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão do Curso de Odontologia da UnG: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Magda Feres, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, Prof. Dr. Jamil W. Shibli, Prof. Dr. André F. Reis, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra Cassoni, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Ota-Tsuzuki e Prof. Dr. Cesar Arrais, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Poliana M. Duarte, por todo o conhecimento concedido nesses anos.

À secretária da pós-graduação Cristina Zoucas por toda orientação.

Às funcionárias da Clínica de Estudos Avançados: Cinthia Lobo, Samantha A. C. Silva pela amizade e auxílio quando solicitado.

À bióloga Izilvânia Barreto pela competência e dedicação nos trabalhos laboratoriais, sua ajuda foi fundamental.

Aos meus amigos da turma de mestrado : Marcela Tucci, Renata Mairink, Jadson Almeida e Marcelo Guerra, por toda a ajuda e força que vocês me deram no período que convivemos juntos.

Aos amigos Josefa Mestnik, Raphael O. Dias, Tatiane Onuma e Luciana Cardoso pelas duvidas esclarecidas quando solicitados.

A acadêmica Ariane, por toda ajuda na clinica.

Aos pacientes que participaram deste estudo, obrigado pela compreensão e colaboração na pesquisa, sem os quais nada teria se realizado.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo duplo-cego, placebo-controlado foi avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos da terapia fotodinâmica (TFP) como adjuvante a utilização do metronidazol sistêmico (MTZ), amoxicilina (AMX) e raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento de fumantes com periodontite crônica generalizada. Trinta e seis indivíduos fumantes com periodontite crônica generalizada receberam RAR combinada com MTZ (400mg, 3x dia durante 14 dias) + AMX (500 mg, 3x dia durante 14 dias) e foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: grupo teste (n=18) com aplicação da TFD, e grupo controle (n=18) sem aplicação TFD. A RAR foi realizada em 14 dias e uma única TFD foi realizada imediatamente após RAR em todos os sítios subgengivais dos indivíduos do grupo teste. Nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas para análise por meio do Checkerboard DNA-DNA Hybridization. O monitoramento clínico e microbiológico foi realizado no início da terapia e 3 meses pós-terapia. Ambos os grupos foram eficazes em melhorar os resultados clínicos, entretanto sem grandes diferenças entre eles. A única diferença significativa observada foi uma redução maior na média da profundidade de sondagem (PS) nos sítios intermediários (PS 4-6mm) e nos dados de boca toda nos indivíduos que receberam a TFD. Ambas terapias reduziram igualmente a média de PS (Controle:  $2,72 \pm 0,54$  mm, Teste:  $3,05 \pm 0,58$  mm) e promoveram um ganho de inserção clínica (Controle:  $2,22$  mm  $\pm 0,52$  mm, Teste:  $2,32$  mm  $\pm 0,76$  mm) em sítios inicialmente profundos (PS  $\geq 7$  mm). A TFD promoveu a mudança mais benéfica no perfil microbiológico subgengival. Os indivíduos deste grupo demonstraram uma menor proporção de complexo vermelho e laranja além de um aumento na proporção de bactérias compatíveis com saúde. Não foram observados benefícios clínicos relevantes na associação da TFD a uso sistêmico de metronidazol e amoxicilina e RAR. Entretanto, a associação da TFD levou a benefícios microbiológicos na terapia periodontal de indivíduos fumantes com periodontite crônica aos 3 meses pós-terapia.

**Palavras chave:** Fumantes, Doença Periodontal, Fatores de Risco, Terapia Fotodinâmica, Antibioticoterapia.

## ABSTRACT

The aim of the present double-blinded, placebo-controlled clinical trial was to evaluate the clinical and microbiological effects of the photodynamic therapy (PDT) adjunctive to systemic metronidazole (MTZ), amoxicillin (AMX) and scaling and root planing (SRP) in the treatment of smokers with generalized chronic periodontitis (ChP). Thirty six smokers subjects with ChP were randomly assigned to receive SRP combined with MTZ (400mg,TID/14 days) + AMX (500 mg,TID/14 days) with (n=18, test group) or without (n=18, control group) PDT therapy. SRP was performed in 14 days and a single PDT was performed immediately after SRP in all subgingival sites of subjects from the test group. Nine subgingival biofilm samples were collect for microbiological analysis by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. Clinical and microbiological monitoring was conducted at baseline and at 3 months post-therapy. The two treatments were effective in improving the clinical outcomes evaluated without major differences between them. The only statistically significant difference observed was a greater reduction in mean probing depth (PD) in initially intermediate sites (PD 4-6 mm) as well as in the full-mouth data in subjects that receiving PDT. Both therapies equally reduced mean PD (Control: 2.72 mm  $\pm$  0.54 mm, Test: 3.05 mm  $\pm$  0.58 mm) and improved mean clinical attachment (Control: 2.22 mm  $\pm$  0.52 mm, Test: 2.32 mm  $\pm$  0.76 mm) in initially deep sites (PD $\geq$ 7 mm). PDT leads to the most beneficial change in the subgingival microbial profile. The subjects in this group showed a lower percentage of red and orange complex and an increase in the proportion of host compatible bacterial species. No clinical benefits was observed in the association of PDT to systemic metronidazole and amoxicillin and SRP. However, the association of PDT led to microbiological benefits in the periodontal therapy in smokers with chronic periodontitis at 3 months post-therapy.

**Key-words:** Smokers, Periodontal Disease, Risk Factor, Photodynamic Therapy, Antibiotic Therapy.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Média de contagem ( $\times 10^5$ ) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças significativas entre o exame inicial e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon (\*  $p < 0,05$ ). 33
- Figura 2 Média da proporção das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças significativas entre o exame inicial e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon (\*  $p < 0,05$ ). 34
- Figura 3 Proporção dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e aos 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon (\*  $p < 0,05$ ). Diferenças significativas entre os grupos experimentais em cada tempo foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney (Letras diferentes representam  $p < 0,05$ ). 36
- Figura 4 Média da proporção de espécies patogênicas (complexos vermelho e laranja) e espécies compatíveis com o hospedeiro (complexos roxo, verde e amarelo e *Actinomyces*) presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças significativas entre o exame inicial e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon. Diferenças significativas entre os grupos experimentais em cada tempo foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. 37



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de placa subgengival.....	26
Tabela 2	Média ( $\pm$ DP) dos parâmetros clínicos, no exame inicial e 3 meses pós-terapia para os indivíduos nos 2 grupos terapêuticos.....	28
Tabela 3	Média ( $\pm$ DP) da alterações de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção ocorridas entre a consulta inicial e 3 meses pós terapia nos dados da avaliação de boca toda, bem como de sítios inicialmente moderados (PS 4-6mm) e profundos (PS $\geq$ 7mm) nos 2 grupos terapêuticos.....	29
Tabela 4	Média e percentual ( $\pm$ DP) do número de sítios com PS < 5 mm e $\geq$ 5 mm com e sem sangramento a sondagem, bem como sítios com PS $\geq$ 6mm no exame inicial e 3 meses pós-terapia.....	30
Tabela 5	Número (%) de indivíduos apresentando baixo ( $\leq$ 4 sítios com PS $\geq$ 5 mm), moderado (5-8 sítios com PS $\geq$ 5 mm) e alto ( $\geq$ 9 sítios com PS $\geq$ 5 mm) risco para progressão de doença periodontal segundo Lang e Tonetti (2003), bem como apresentando 0, $\leq$ 4, 5-8 ou $\geq$ 9 sítios com PS $\geq$ 6 mm 3 meses pós-terapia.....	31

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>ETIOLOGIA.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>TERAPIA FOTODINÂMICA.....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	Seleção da amostra.....	<b>18</b>
<b>3.2</b>	Critério de inclusão e exclusão.....	<b>18</b>
<b>3.3</b>	Delineamento do estudo.....	<b>19</b>
<b>3.4</b>	Seleção do sitio teste.....	<b>20</b>
<b>3.4.1</b>	Coleta das amostras de placa subgengival.....	<b>20</b>
<b>3.5</b>	Monitoramento clínico.....	<b>21</b>
<b>3.6</b>	Procedimento terapêutico.....	<b>22</b>
<b>3.6.1</b>	Terapia periodontal básica.....	<b>22</b>
<b>3.6.2</b>	Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos.....	<b>22</b>
<b>3.6.3</b>	Aplicação de terapia fotodinâmica.....	<b>23</b>
<b>3.7</b>	Monitoramento microbiológico.....	<b>23</b>
<b>3.7.1</b>	Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	<b>23</b>
<b>3.7.2</b>	Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	<b>24</b>
<b>3.8</b>	Análise estatística.....	<b>27</b>
<b>3.8.1</b>	Monitoramento clínico.....	<b>27</b>
<b>3.8.2</b>	Monitoramento microbiológico.....	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

# 1INTRODUÇÃO

## 1.1.Etiologia

A doença periodontal caracteriza-se como uma doença infecciosa pois tem como fator etiológico microorganismos específicos presentes no biofilme bucal, que acometem as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando a perda de inserção de tecido ósseo que envolve o elemento dental (Løe et al.,1965; Socransky,1970; Listgarten et al.,1978; Loesche et al.,1985; Socransky; Haffajee,1994a; Haffajee ; Socransky,1994; Socransky et al.,1988; Armitage,1999). A comprovação da natureza infecciosa da periodontite foi definida na década de 60, através de estudos epidemiológicos, clínicos e microbiológicos (Lovdal et al.,1958; Løe et al.,1965). O experimento clássico de Løe demonstrou que o acúmulo de biofilme microbiano durante três semanas resultou no desenvolvimento de gengivite generalizada (Løe et al. 1965). Por um longo período de tempo, questionavam se a destruição dos tecidos periodontais era causada pela quantidade ou pela especificidade das bactérias presentes no sulco gengival, desta maneira surgiram as teorias conhecidas como hipótese da placa específica, e hipótese da placa não específica (Newman et al.,1976; Slots,1976; Newman; Socransky, 1977;Listgarten; Hellden, 1978; Armitage et al.,1982).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de detecção de microorganismos que formam o biofilme oral, tais como técnicas imunológicas e de biologia molecular, descrições mais precisas das espécies bacterianas relacionadas às diferentes formas de periodontite foram relatadas (Christersson et al ., 1987; Socransky et al., 1994; Faveri et al., 2009). Socransky et al.(1994) descreveram a técnica de diagnóstico microbiológico do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* que utiliza sondas genômicas de DNA para o diagnóstico microbiológico, e analisaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes no biofilme de indivíduos com periodontite crônica (Socransky et al.,1998). Esses autores observaram a presença de diferentes espécies bacterianas que foram divididas em 5 complexos bacterianos, de acordo com a relação entre as espécies, sendo dividido em complexo vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo. O complexo vermelho, composto pelas espécies

bacterianas *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, foi fortemente relacionado com o aumento da profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS), assim relacionado diretamente a periodontite.

Nas infecções periodontais, assim como em todas as doenças, podem se atribuir fatores que favorecem o agravamento da doença que são denominados fatores de risco. No caso das periodontites os principais fatores de risco são o diabetes e o tabagismo (Löe H, 1993; Bergström; Preber, 1994, 1996; Grossi et al., 1996). O tabagismo é apontado como o principal fator de risco para as doenças periodontais (Bergström; Preber, 1994; Kaldahl et al., 1996; Grossi et al., 1996; Rivera-Hidalgo, 2003; Kim et al., 2004; Meisel et al., 2004; Palmer et al., 2005). Estudos mostraram que indivíduos fumantes apresentam um risco relativo que varia de 2,0 a 6,0 para o desenvolvimento da periodontite em relação aos não-fumantes (Kim et al., 2004). A principal relação pelos quais o fumo parece afetar os tecidos periodontais são pela alteração do ecossistema bucal (Umeda et al., 1998), alteração do calibre dos vasos sanguíneos (Mirbod et al., 2001), na resposta inflamatória (Rezavandi et al., 2002), na resposta imune (Sopori; Kozak, 1998), além da alteração da homeostase e do potencial cicatricial dos tecidos periodontais (Typton; Dabbous, 1995; Checci et al., 1999). Grande parte dos efeitos prejudiciais dos produtos liberados pelo fumo resulta da exposição sistêmica da droga, por meio da absorção pulmonar, mas pode ocorrer também pela absorção tópica na cavidade bucal (Palmer et al., 2000). Mavropoulos et al. (2001) relataram um aumento no fluxo sanguíneo gengival após a aplicação tópica de fumaça de tabaco no sulco gengival. O monóxido de carbono é um dos produtos liberados pelo fumo, este produto afeta a saturação de oxigênio da hemoglobina (Palmer et al., 2005). Hanioka et al. (2000), examinando a tensão de oxigênio nas bolsas periodontais de indivíduos fumantes e não-fumantes encontraram uma tensão de oxigênio menor nas bolsas dos fumantes. Palmer et al. (2005) salientam que essa propriedade pode ter um impacto na microbiota subgengival.

O tratamento periodontal mais utilizado atualmente é a raspagem e alisamento radicular (RAR). Apesar de ser eficaz para uma boa parcela dos pacientes, muitas vezes não leva a uma melhora dos parâmetros clínicos e

microbiológico necessários para manter os benefícios conseguidos pela terapia em longo prazo. Um dos principais motivos da falta de eficácia da RAR são dificuldades técnicas de intervir no biofilme em áreas de difícil acesso, como bifurcações, concavidades radiculares e bolsas periodontais profundas. Com o objetivo de potencializar os efeitos da RAR, outras formas de tratamento, tais como a associação de antibióticos sistêmicos têm sido propostas no tratamento de indivíduos com periodontite (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003). Outro ponto interessante, é que indivíduos tabagistas apresentam uma resposta menos favorável do que os não-fumantes ao tratamento periodontal com RAR (Haffajee et al., 1997; Palmer et al., 1999; Söder et al., 1999; Winkel et al., 2001; Van der Velden et al., 2003; Mascarenhas et al., 2005). Van der Velden et al. (2003) avaliaram a influência do fumo no tratamento da periodontite e na composição da microbiota subgengival utilizando RAR. Os autores demonstraram que os não-fumantes exibiram um maior ganho de inserção e uma redução mais acentuada na prevalência das bactérias patogênicas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra*) do que os fumantes.

Estudos vêm relatando um efeito benéfico da associação sistêmica da amoxicilina e do metronidazol à RAR na resposta clínica e na composição da microbiota subgengival em indivíduos com periodontite crônica pós-terapia (Berglundh et al., 1998; Winkel et al., 1998; Winkel et al., 2001; Serino et al., 2001; Rooney et al., 2002; Silva et al., 2011). Matarazzo et al. (2008) avaliaram o tratamento periodontal em 43 indivíduos fumantes com periodontite crônica tratados por meio da RAR isoladamente, comparado com RAR associado com metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias) e RAR combinado com metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias) e amoxicilina (500mg, 3x/dia, durante 14 dias), e concluíram que a associação de metronidazol a RAR e principalmente de ambos os antibióticos a RAR melhoram consideravelmente os parâmetros clínicos e microbiológicos 3 meses após a terapia. Entretanto, nestes indivíduos, apesar da melhora clínica e microbiológica, todos os grupos apresentaram altas proporções de espécies do complexo laranja após a terapia (principalmente espécies de *Fusobacterium ssp.*) e sugeriram que isto poderia

ser um fator contribuinte para a recidiva da periodontite nestes pacientes a longo prazo.

Diante das informações que indivíduos fumantes com periodontite respondem melhor ao tratamento periodontal com o uso associado de metronidazol e amoxicilina sistêmicos associado à RAR, mas que entretanto, o remanescente microbiano, principalmente espécies do complexo laranja, poderiam favorecer a recidiva da infecção periodontal, existe há necessidade de se estudar alternativas terapêutica apropriadas tanto no tratamento, quanto na prevenção da recorrência da periodontite nestes indivíduos.

## **1.2.Terapia Fotodinâmica**

Recentemente, a Terapia Fotodinâmica (TFD) pode ser citada como terapia coadjuvante a terapia periodontal. Trata-se de um procedimento que leva a morte de microorganismos usando uma fonte de luz que pode ser um laser (light amplification by stimulated emission of radiation). Por mais de três décadas, a TFD foi direcionada como alternativa ao tratamento do câncer, mostrando-se igualmente favorável ao tratamento de infecções microbianas, fúngicas e virais. Configura-se como uma terapia promissora, especialmente quando a crescente multi-resistência às drogas antimicrobianas e antifúngicas é considerada. Trata-se de uma modalidade de tratamento que requer a sensibilização de células/tecido alvo por um agente fotossensibilizador, normalmente exógeno, que será posteriormente ativado por uma fonte de luz resultando, na presença do substrato oxigênio, na formação de moléculas de oxigênio altamente reativas capazes de promover a morte celular (Goulart et al., 2010; Sigush et al., 2010). As reações fotoquímicas envolvidas no processo iniciam quando o fotossensibilizador absorve os fótons de uma fonte de luz, com comprimento de onda ressonante à banda de absorção, e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato oxigênio, os elétrons do fotossensibilizador ao retornar ao estado fundamental transferem a energia ao substrato, formando espécies altamente reativas, como oxigênio singleto e radicais livres, que podem comprometer a viabilidade celular. As moléculas neste estado podem sofrer dois tipos de reações: tipo I: as moléculas interagem diretamente com os substratos biológicos para formar radicais livres

como super-óxido, hidroxila e peróxido; e tipo II: as moléculas transferem sua energia diretamente para o oxigênio, formando o oxigênio singleto altamente reativo e responsável pela morte celular (Freitas,1991; Marthy, 1990; Tromberg et al.,1990). Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do fotossensibilizador, substratos intracelulares e a concentração de oxigênio do meio. A produção de oxigênio singleto é o mecanismo mais importante para a TFD, porém existe um outro importante mecanismo que é a indução da morte celular por apoptose. Esta reação pode ocorrer por uma alteração da membrana plasmática (Oleinick et al., 2002). Além disso, é importante ressaltar, que o fotossensibilizador por si só é um agente reativo dentro da célula, destruindo vários substratos celulares importantes. Durante a exposição à luz, o fotossensibilizador em contato com a bactéria pode induzir a apoptose, enquanto aquela localizada nos lisossomos e membranas celulares podem causar a necrose (Castano et al., 2006). O efeito apoptótico amplia a eficácia da reação. Além disso, a reação é acompanhada por uma resposta imune inflamatória complexa (Dougherty et al., 1998). Observou-se uma invasão de neutrófilos, mastócitos e monócitos/macrófagos durante e após a aplicação da TFD em modelos de tumor em ratos (Krosi et al., 1995). Além disso, autores relataram que isto pode ser seguido de uma ativação de linfócitos T (Nowis et al., 2005).

As vantagens da terapia fotodinâmica em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais são: eliminação rápida (imediate) da célula bacteriana, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo como ocorre com os agentes anti-sépticos e antimicrobianos; a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microorganismos improvável; o uso do fotossensibilizador ou da luz sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica (Wilson, 2004; Allison et al., 2006; Konopka et al., 2007).

A efetividade da ação antimicrobiana da TFD é influenciada pela diferente fisiologia entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Enquanto a parede das bactérias Gram-positivas favorece o transporte das moléculas neutras e aniônicas dos fotossensibilizadores, a parede celular nas bactérias Gram-negativas, composta não somente pelo peptídeoglicano, mas também pela membrana externa e periplasmática, que constituem uma barreira física e funcional à ligação e à transposição das moléculas do fotossensibilizador do meio externo para o citoplasma (Friedrich et al., 2000). Os fotossensibilizadores catiônicos demonstram rápida associação às células microbianas, com boa afinidade pelas bactérias Gram-negativas, favorecendo a relação de seletividade e preservando a integridade das células hospedeiras (Malik et al., 1992; Nitzan et al., 1992). Além disso, foram sugeridas manobras auxiliares que favoreçam o uso de agentes não catiônicos, como substâncias ativadoras da membrana (ex. Tris-EDTA) ou conjugação do fotossensibilizador com um anticorpo monoclonal específico a antígenos da superfície celular (Bertoloni et al., 1990). Por outro lado, a necessidade de difusão do fotossensibilizador ao citoplasma celular pode ser questionada, visto que espécies reativas de oxigênio quando produzidas nas proximidades da superfície externa celular podem difundir ao citoplasma, causando efeitos citotóxicos (Maisch et al., 2007; Bhatthi et al., 1998).

Inúmeros agentes fotossensibilizadores têm sido utilizados, destacando-se o azul de toluidina, cristal violeta, fitalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirinas, tionina, protoporfirina e azul de metileno (Garcia et al., 2010). As principais características dos agentes fotossensibilizadores devem ser: alta seletividade, baixa toxicidade no escuro, facilidade de obtenção e simplicidade na formulação, alta estabilidade, favorável farmacocinética de eliminação e alta absorção de luz (Konopka et al., 2007). Dentre os diferentes agentes fotossensibilizadores, o azul de metileno (AM), um corante catiônico, pertencente à classe dos fenotiazinos, é bastante utilizado na Medicina e na Odontologia, especialmente pela sua eficiência contra diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos. A utilização do agente em concentrações elevadas 1% (w/vol), cuja equivalência aproxima-se a 26 mmol/L, não revela toxicidade às células humanas (Soukos et al., 1996; Wainwright et al., 1998). Estudos prévios demonstraram a efetividade da atividade antimicrobiana da TFD, contra importantes periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*,



*Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) em culturas planctônicas ou em biofilme (Nastri et al., 2010). A quantificação da bactéria no biofilme de *A. actinomycetemcomitans* após sensibilização com AM e fotoativação alcança 54% (1 mmol/L; 2 J/cm<sup>2</sup>), mostrando-se a atividade antimicrobiana dose-dependente (Goulart et al., 2010). Com o objetivo de avaliar a eficácia do azul de toluidina e do azul de metileno na fotossensibilização letal de microorganismos patogênicos, Usacheva et al. (2001) utilizaram o azul de metileno e o azul de toluidina em diversas concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150,++ 200 µM sobre diferentes bactérias, como *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pneumoniae*; *Enterococcus faecalis*; *Hemophilus influenzae*; *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginos*. Os autores utilizaram duas diferentes fontes de luz, Laser de Argônio (630 nm) e o Laser diodo (664 nm), variando a intensidade de potência de 50 a 100 mW/cm<sup>2</sup>. Os autores observaram que ambos os corantes foram eficazes em eliminar todas as bactérias estudadas. Quando o efeito dos corantes foi comparado a concentração necessária para eliminar as espécies estudadas, o azul de toluidina foi de 1,5 a 7 vezes maior que a concentração do azul de metileno. Os autores concluíram que o azul de toluidina é mais eficaz para o uso na terapia fotodinâmica.

Recentemente, tem-se observado muitos estudos tanto *in vitro* (Wilson et al., 1995; Soukos et al., 1996; Bhatthi et al., 1997; Matevski et al., 2003; Prates et al., 2011) como *in vivo* em animais (Sigusch et al., 2005; Almeida et al., 2007; Almeida et al., 2008) e poucos estudos *in vivo* em humanos que analisaram a ação da TFD em periodontia (Andersen et al., 2007; Cristodoulides et al., 2008; Chondros et al., 2009;). De acordo com estes estudos, a TFD é uma abordagem não invasiva efetiva no tratamento da periodontite crônica e pode ser usada em associação á métodos tradicionais como RAR e ainda ser visto como uma alternativa promissora em associação à antibioticoterapia. Revisões sistemáticas publicadas recentemente apresentam opiniões divergentes quanto à recomendação do uso da TFD na rotina clínica do tratamento periodontal, em associação aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular. Enquanto alguns autores não são favoráveis à recomendação da TFD como terapia coadjuvante (Ruhling et al.,2009; Polansky et al.,2009), outros concluem que a associação das terapêuticas contribuiu

positivamente ao aumento dos níveis clínicos de inserção e na redução da profundidade de sondagem (Prates et al., 2011;Herrera et al.,2011). Em concordância, os autores discutem sobre o reduzido número de estudos publicados e as falhas de delineamento experimental (Andersen et al., 2007; Chondros et al., 2008; Christodoulides et al.,2008; Braun et al., 2008; Al Zahrani et al., 2011). Todavia, até o presente momento nenhum estudo clínico randomizado, cego e controlado foi realizado em humanos com o objetivo de avaliar a TFD como tratamento adjuvante a RAR associada à antibioticoterapia em indivíduos fumantes com periodontite crônica.

## **2. PROPOSIÇÃO**

Avaliar clínica e microbiologicamente o efeito da TFD como coadjuvante à RAR associada ao uso de metronidazol e amoxicilina sistêmicos, no tratamento periodontal de indivíduos fumantes portadores de periodontite crônica generalizada.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1. Seleção da amostra**

Trinta e seis indivíduos com periodontite crônica generalizada foram selecionados na Clínica de Estudos Avançados da Universidade Guarulhos para a participação no estudo no período correspondente a maio/2010 a agosto/2011. A triagem e seleção dos indivíduos foram realizadas por um profissional com experiência seguindo os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Os participantes foram informados dos objetivos do estudo, bem como de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas e terapias realizadas. Um profissional experiente explicou os procedimentos odontológicos que seriam realizados durante o estudo e os pacientes que concordaram em participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, responderam a um questionário de saúde/anamnese e receberam a terapia periodontal gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

#### **3.2. Critérios de inclusão e exclusão**

##### Critérios de inclusão

Para a inclusão no estudo, a seleção dos participantes respeitou os seguintes critérios:

- Indivíduos portadores de periodontite crônica generalizada;
- Idade superior a 30 anos;
- Possuir no mínimo 20 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal apresentando PS e nível clínico de inserção (NCI)  $\geq$  5mm em dentes não contíguos.
- Fumantes que fazem uso de pelo menos 10 cigarros por dia por um período mínimo de 5 anos (Ammenheuser et al., 1997).

##### Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Pacientes grávidas ou lactantes;
- História de tratamento periodontal nos últimos 12 meses;
- História de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- História de uso constante de anti-sépticos bucais nos últimos seis meses;
- História de doenças sistêmicas que comprometa a resposta do hospedeiro ou exija medicação profilática ao tratamento (ex: diabetes);
- Relato de alergia à amoxicilina e metronidazol;
- Relato de alergia à azul de metileno.

### **3.3. Delineamento do estudo**

Foram selecionados 36 indivíduos para participar deste estudo duplo-cego foram aleatoriamente distribuídos, por meio de uma tabela de números equiprováveis, em dois grupos terapêuticos. Cada grupo apresentou 18 indivíduos, sendo um grupo controle e um grupo teste. Os indivíduos foram distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo controle (C): RAR + amoxicilina (500mg, 3x/dia durante 14 dias) e metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias) + TFD placebo (azul de metileno + simulação da aplicação de laser).

Grupo teste (T): RAR + amoxicilina (500mg, 3x/dia durante 14 dias) e metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias) + TFD (azul de metileno + laser baixa potência)

Inicialmente, todos os pacientes receberam monitoramento clínico e microbiológico, seguido de raspagem supragengival (RSP) de todos os dentes e instrução de higiene oral. Todos os sujeitos da pesquisa foram orientados a utilizar o mesmo dentífrico contendo triclosan/gantrez (Colgate Total®, Anakol Ind. Com. Ltda- Kolynos do Brasil - Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brazil). A terapia básica de raspagem (RAR) foi realizada de 4 a 6 sessões e finalizada em 14 dias. Os indivíduos dos dois grupos experimentais (controle e teste) foram orientados a iniciar o uso da antibioticoterapia no

primeiro dia do tratamento periodontal, seguindo este tratamento por 14 dias. Ao final da RAR e da antibioticoterapia sistêmica os indivíduos do grupo teste foram submetidos a TFD e do grupo controle a TFD placebo (azul de metileno + simulação da aplicação de laser). Os pacientes foram monitorados clínica e microbiologicamente 3 meses após a terapia.

Devido à característica duplo-cego do estudo os profissionais responsáveis pelo tratamento e os indivíduos participantes não tiveram conhecimento sobre a terapia periodontal recebida. Além disto, o profissional que tratou os indivíduos e realizou os exames clínicos e microbiológicos não foi o mesmo que realizou os procedimentos da TFD.

### **3.4. Seleção dos sítios-teste**

Foram selecionados 9 amostras de biofilme subgingival de cada indivíduo, distribuídos uniformemente de acordo com a PS inicial nas seguintes categorias de bolsa (3 sítios por categoria): rasas ( $PS \leq 3\text{mm}$ ), moderadas ( $PS 4-6\text{ mm}$ ), e profundas ( $PS \geq 7\text{mm}$ ). Estes sítios estavam localizados nas faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os 4 quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme subgingival foram coletadas no início e 3 meses pós-terapia.

#### **3.4.1. Coleta das amostras de placa subgingival**

Após a remoção da placa supragingival a coleta de amostras de biofilme subgingival foi realizada com curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy, USA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. As amostras foram depositadas em tubos plásticos individuais (eppendorf) contendo 100  $\mu\text{l}$  de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). Imediatamente após a coleta da amostra, está foi homogeneizada por 1 minuto em vortex e posteriormente acrescida de 100  $\mu\text{l}$  de solução de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo para análise por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Estes tubos foram identificados e armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5. Monitoramento clínico

O monitoramento clínico foi realizado no momento inicial (-14 dias) e 3 meses após o término da terapia de RAR por meio de sondas periodontais manuais (PCPUNC - BR15, HuFriedy do Brasil, RJ, Brasil). Um examinador foi treinado e calibrado com o objetivo de se conseguir a melhor reprodutibilidade nas medições realizadas. A metodologia utilizada para a calibração foi preconizada por Araujo et al. (2003) onde se avaliou o erro padrão da medida (e.p.m) e o erro médio percentual (e.m.p) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção). O e.p.m e e.m.p intra-examinador demonstrou que o examinador obteve e.p.m. de 0,15mm e 0,19mm para a PS e NCI, respectivamente. Esses valores de e.p.m. indicam uma reprodutibilidade aceitável dentro dos parâmetros de pesquisa clínica periodontal. Para as variáveis categóricas (índice de placa visível e índice de sangramento gengival), considerando somente a presença ou a ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de concordância e o examinador apresentou uma concordância intra-examinador igual a 91% (Teste Kappa).

As mensurações clínicas foram realizadas em 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados:

\* *Índice de Placa Visível – IPV* (Ainamo; Bay, 1975): Observou-se a presença ou ausência de placa dentária supragengival visível, após lavagem e secagem dos dentes. A ausência de placa recebeu o escore 0 (não-visível) e a presença de placa recebeu o escore 1 (visível).

\* *Índice de Sangramento Gengival – ISG* (Ainamo; Bay, 1975): Observou-se a presença ou ausência de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente com a sonda periodontal ao longo do sulco gengival. A ausência de sangramento recebeu o escore 0 e a presença de sangramento recebeu escore 1.

\* *Profundidade de Sondagem – PS*: Distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

\* *Nível Clínico de Inserção – NIC*: Distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

\* *Sangramento à Sondagem – SS*: Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.

\* *Supuração – SUP*: Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de supuração até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.

### **3.6. Procedimentos terapêuticos**

#### **3.6.1. Terapia periodontal básica**

Após o exame clínico e coleta de placa dentária subgengival para análise microbiológica, os indivíduos foram submetidos à RSP e instruções de higiene oral (IHO). Em seguida, receberam 4 a 6 sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy, Chicago, EUA), sob anestesia local com BioPressin<sup>®</sup> - cloridrato de prilocaína a 3%, felipressina 0,03UI (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Estas sessões de RAR tiveram uma duração de aproximadamente 1 hora e foram realizadas em 14 dias. O tratamento periodontal recebido foi gratuito durante toda a duração do estudo. As outras necessidades de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da Clínica de Graduação da Universidade Guarulhos.

#### **3.6.2. Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos**

Os indivíduos do estudo receberam RAR e administração de 1,2 g/dia de metronidazol (400 mg de 8/8 hs) combinado com 1,5 g/dia de amoxicilina (500 mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, iniciada em conjunto a terapia periodontal básica. Os antibióticos foram manipulados especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação Ervanário (Maringá, PR, Brasil), e fornecido gratuitamente aos indivíduos do estudo. Os indivíduos foram monitorados de 3 em 3 dias quanto a reações adversas da medicação e para controle da cooperação na ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, por um aluno de iniciação científica.



### 3.6.3. Aplicação da terapia fotodinâmica

No grupo Teste , a TFD foi realizada no dia seguinte ao término da RAR (15 dias) segundo preconizado por (Prates et al., 2011; Cristodoulides et al., 2008). Foi utilizado como fotossensibilizador solução de azul de metileno (100µM). A solução foi inserida nas bolsas periodontais pelo auxílio de seringa hipodérmica e permaneceu na bolsa por período de 5 minutos, obedecendo ao tempo de pré-irradiação. Um laser de diodo em baixa potência (Photon/ DMC-Brasil), com comprimento de onda em 660nm foi utilizado para ativação do fotossensibilizador em cada uma das bolsas periodontais (P=100mW, E=9J/cm<sup>2</sup>). Cada elemento dental, incluindo as faces vestibular e lingual/palatina foi irradiada pelo período de 60 segundos. Nos indivíduos do grupo Controle, a solução de azul de metileno foi inserida nas bolsas periodontais, entretanto a mesma não foi ativada com laser de diodo em baixa potência.

## 3.7. Monitoramento microbiológico

### **Análise microbiológica por meio da técnica do *Checkerboard DNA DNA Hybridization***

#### 3.7.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas que foram utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA foram descritas previamente no estudo de Mestnik et al. (2010). Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, USA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue de

ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

### 3.7.2. Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas multi-genômicas (*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 38 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do random primer digoxigenin labeling kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, in, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983). As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Haffajee; Socransky, 1994).

#### Hibridização DNA-DNA

As suspensões contidas nos tubos 1 foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de placa bacteriana contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do Minislot (Immuntics, Cambridge, MA,

USA- Figura 2) ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x 15cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do Minislot (Immunetics) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microorganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky et al., 1994; Haffajee et al., 1997). A membrana então foi removida do Minislot (Immunetics) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

A membrana foi pré-hibridizada a  $42^\circ\text{C}$ , por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x *standard saline citrate* -SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim).

Em seguida, a membrana foi posicionada no Miniblotter (Immunetics, Figura 3) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. E em cada canaleta do Miniblotter (Immunetics) adicionado uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130  $\mu\text{l}$  de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a  $42^\circ\text{C}$ .

#### Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do Miniblotter (Immunetics) lavada por 40 minutos, a  $65^\circ\text{C}$  numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ ), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana depois foi lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de

NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, pH 9,5.

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England,UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20°C.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de  $10^5$  células; 2 equivaleu a aproximadamente  $10^5$  células; 3, entre  $10^5$  e  $10^6$  células; 4 aproximadamente  $10^6$  células e 5, mais de  $10^6$  células (Tabela 1). Estes registros então foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios e indivíduos do estudo.

**Tabela 1.** Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de placa subgengival.

<i>ÍNDICE</i>	<i>NÍVEL DO MICROORGANISMO</i>
0	Não detectado
1	Menos de $10^5$ células
2	Aproximadamente $10^5$ células
3	Entre $10^5$ e $10^6$ células
4	Aproximadamente $10^6$ células
5	Mais de $10^6$ células

### 3.8. Análise estatística

#### 3.8.1. Monitoramento clínico

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração,  $PS \geq 5\text{mm}$  e  $PS \geq 6\text{mm}$  foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças dentro de cada grupo, entre os tempos experimentais foram avaliadas utilizando o teste Wilcoxon. O teste Mann–Whitney foi utilizado para examinar diferenças entre os 2 grupos terapêuticos nos diferentes tempos experimentais.

A significância estatística foi estabelecida em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 3.8.2. Monitoramento microbiológico

Os dados microbiológicos da análise das 40 espécies bacterianas em 9 amostras de biofilme subgengival por indivíduo foram expressos em contagem (níveis) e proporção. Para comparar os níveis médios de cada uma das espécies bacterianas, os dados foram expressos como contagem  $\times 10^5$  em cada sítio e avaliados por indivíduo e depois entre indivíduos, dentro de cada grupo, em cada tempo do estudo. De maneira semelhante, a proporção e a prevalência de cada espécie foram computadas para cada sítio, e depois calculadas as médias entre os sítios em cada indivíduo, e então entre os indivíduos de um mesmo grupo terapêutico em cada tempo experimental. Todos os dados iniciais e de 3 meses pós-terapias (níveis e proporções) foram analisados pelo teste de Mann–Whitney para detectar possíveis diferenças significantes entre os 2 grupos terapêuticos. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microorganismos dentro de cada grupo, entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia, foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, considerando  $p < 0,00125$  ( $p < 0,05$ ), como proposto por Socransky et al. (1991).

A significância estatística foi estabelecida em 5%.

## 4 RESULTADOS

A tabela 2 apresenta as características demográficas e os parâmetros clínicos no início do estudo e 3 meses após a terapia periodontal para ambos os grupos terapêuticos. Foram triados 456 indivíduos entre maio/2010 e agosto/2011, sendo que destes, 36 foram selecionados e distribuídos aleatoriamente no grupo controle (n=18) e no grupo teste (n=18). Os resultados demonstram que no início do estudo os grupos eram homogêneos em relação aos parâmetros clínicos, bem como para a média de idade, tempo de tabagismo e número de cigarros/dia ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Média ( $\pm$ DP) dos parâmetros clínicos, no **exame inicial e 3 meses pós-terapia** para os indivíduos nos 2 grupos terapêuticos.

Variável	Tempo	Grupos de Tratamento		MH p-valor
		RAR MTZ+AMX (n=18)	RAR MTZ+AMX+TDP (n=18)	
Gênero (M/F)	Inicial	7/11	8/10	0,52301*
Idade(anos)	Inicial	45,7 $\pm$ 6,7	46,5 $\pm$ 5,0	0,83520
Cigarros (por dia)	Inicial	16,8 $\pm$ 5,2	17,2 $\pm$ 4,1	0,36910
Anos de fumo	Inicial	24,6 $\pm$ 6,7	24,3 $\pm$ 5,9	0,92340
PS (mm)	Inicial	4,23 $\pm$ 0,51 <sup>A</sup>	4,44 $\pm$ 0,43 <sup>A</sup>	0,24172
	3 meses	3,27 $\pm$ 0,37 <sup>B</sup>	3,12 $\pm$ 0,33 <sup>B</sup>	0,22310
NCI (mm)	Inicial	4,69 $\pm$ 0,67 <sup>A</sup>	5,15 $\pm$ 0,74 <sup>A</sup>	0,39516
	3 meses	3,88 $\pm$ 0,70 <sup>B</sup>	4,22 $\pm$ 0,77 <sup>B</sup>	0,09046
% sitios com				
IPV	Inicial	80,1 $\pm$ 9,7 <sup>A</sup>	74,3 $\pm$ 17,3 <sup>A</sup>	0,57963
	3 meses	49,3 $\pm$ 25,9 <sup>B</sup>	40,0 $\pm$ 16,0 <sup>B</sup>	0,36672
ISG	Inicial	69,6 $\pm$ 25,8 <sup>A</sup>	66,8 $\pm$ 27,3 <sup>A</sup>	0,73962
	3 meses	35,4 $\pm$ 28,8 <sup>B</sup>	21,8 $\pm$ 14,9 <sup>B</sup>	0,21281
SS	Inicial	84,8 $\pm$ 23,2 <sup>A</sup>	81,1 $\pm$ 23,0 <sup>A</sup>	0,26678
	3 meses	41,8 $\pm$ 20,1 <sup>B</sup>	39,1 $\pm$ 10,8 <sup>B</sup>	0,75796
SUP	Inicial	1,0 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>	1,6 $\pm$ 2,4 <sup>A</sup>	0,11869
	3 meses	0,3 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>	0,7 $\pm$ 1,9 <sup>B</sup>	0,90770

As diferenças significantes entre os tempos experimentais nos 2 grupos terapêuticos foram testadas pelo teste Wilcoxon (Letras maiúsculas indicam as diferenças existentes entre os tempos experimentais  $p < 0,05$ ). As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pelo teste Mann-Whitney (MH). Diferenças na distribuição do gênero entre os grupos foi testada pelo teste Qui-quadrado (\*).

M; masculino, F, feminino; RAR, raspagem e alisamento radicular, MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; TFD, terapia fotodinâmica; PS, profundidade de sondagem; NCI, nível clínico de inserção; IPV, índice de placa visível; ISG, índice de sangramento gengival; SS, sangramento à sondagem; SUP, supuração.

Ambos os grupos terapêuticos promoveram melhoras em todos os parâmetros clínicos analisados 3 meses após a terapia periodontal empregada ( $p < 0,05$ , Teste Wilcoxon). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo que associou a TFD e o grupo que foi submetido à TFD placebo ( $p > 0,05$  Teste Mann-Whitey).

**Tabela 3.** Média ( $\pm$ DP) da alterações de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção ocorridas entre a consulta inicial e 3 meses pós terapia nos dados da avaliação de boca toda, bem como de sítios inicialmente moderados (PS 4-6mm) e profundos (PS  $\geq 7$ mm) nos 2 grupos terapêuticos.

	Variável	Tempo	Grupo de tratamento		MH (valor-p)
			RAR MTZ+AMX (n=18)	RAR MTZ+AMX+TFD (n=18)	
Boca total	PS (mm)	0-3 meses	0,97 $\pm$ 0,43	1,32 $\pm$ 0,39	<b>0,01764</b>
	NCI (mm)	0-3 meses	0,81 $\pm$ 0,37	0,93 $\pm$ 0,43	0,27498
PSi 4-6mm	PS (mm)	0-3 meses	1,16 $\pm$ 0,33	1,46 $\pm$ 0,31	<b>0,00716</b>
	NCI (mm)	0-3 meses	0,95 $\pm$ 0,39	1,01 $\pm$ 0,35	0,56900
PSi $\geq 7$ mm	PS (mm)	0-3 meses	2,72 $\pm$ 0,54	3,01 $\pm$ 0,58	0,08973
	NCI (mm)	0-3 meses	2,22 $\pm$ 0,52	2,32 $\pm$ 0,76	0,48606

As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pelo teste Mann-Whitney (MH).

RAR, raspagem e alisamento radicular, MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; TFD, terapia fotodinâmica; PSi, profundidade de sondagem no exame inicial.

A Tabela 3 apresenta para ambos os grupos as alterações ocorridas entre a consulta inicial e 3 meses pós-terapia, nas médias dos parâmetros de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, para a avaliação de boca toda, bem como para sítios inicialmente moderados (PS 4-6mm) e profundos ( $\geq 7$ mm). Ambas as terapias proporcionaram reduções nas médias dos parâmetros avaliados, sendo que o grupo teste mostrou uma média de redução da profundidade de sondagem na avaliação de boca toda e para sítios inicialmente moderados significativamente maior do que o grupo controle. Não foram observadas diferenças para o ganho de inserção clínica entre os grupos.

**Tabela 4.** Média e percentual ( $\pm$ DP) do número de sítios com PS < 5 mm e  $\geq$  5 mm com e sem sangramento a sondagem, bem como sítios com PS  $\geq$  6mm no exame inicial e 3 meses pós-terapia.

Variável	Tempo	Grupos de Tratamento		MH (valor-p)
		RAR MTZ+AMX (n=18)	RAR MTZ+AMX+TFD (n=18)	
PS<5mm	Tempo 0	81,72 $\pm$ 26,99 60,3 $\pm$ 16,6	68,44 $\pm$ 23,44 55,3 $\pm$ 14,5	0,12433
	3 meses	122,5 $\pm$ 21,2 90,4 $\pm$ 5,9	112,7 $\pm$ 22,0 91,8 $\pm$ 5,7	0,19975
PS $\geq$ 5mm (sem SS)	Tempo 0	4,22 $\pm$ 10,15 4,0 $\pm$ 11,3	6,61 $\pm$ 11,09 6,1 $\pm$ 11,7	0,12744
	3 meses	6,55 $\pm$ 8,12 4,8 $\pm$ 3,1	5,78 $\pm$ 3,92 5,1 $\pm$ 3,7	0,64344
PS $\geq$ 5mm (com SS)	Tempo 0	49,72 $\pm$ 29,05 35,7 $\pm$ 19,1	47,33 $\pm$ 20,42 38,6 $\pm$ 16,6	0,98747
	3 meses	6,61 $\pm$ 5,05 4,8 $\pm$ 5,7	3,72 $\pm$ 4,25 3,1 $\pm$ 3,7	0,82409
PS $\geq$ 5mm (com + sem SS)	3 meses	13,16 $\pm$ 9,01 9,6 $\pm$ 5,9	9,50 $\pm$ 6,31 8,2 $\pm$ 5,7	0,19882
PS $\geq$ 6mm	3 meses	3,50 $\pm$ 3,77 2,5 $\pm$ 2,3	3,00 $\pm$ 3,03 2,6 $\pm$ 2,5	0,73728

As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pelo teste Mann-Whitney (MH).

RAR, raspagem e alisamento radicular MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; TFD, terapia fotodinâmica; PS, profundidade de sondagem; SS, sangramento à sondagem.

A tabela 4 apresenta o número e o percentual médio de sítios com PS  $\geq$  5mm, com e sem sangramento à sondagem no início do estudo e 3 meses pós-terapia, além do número e percentual médio de sítios com PS  $\geq$  6 mm 3 meses após o tratamento. Ambos os grupos apresentavam um perfil de doença generalizada, conforme observado pelo percentual médio de bolsas com PS  $\geq$  5mm com SS no início do estudo para ambos os grupos (controle: 35,7  $\pm$  19,1 e teste: 38,6  $\pm$  16,6). Ambos os grupos reduziram o número de bolsas com PS  $\geq$



5mm e PS  $\geq$  6mm com sangramento a sondagem. Não foram observadas diferenças entre os grupos no número e no percentual médio de sítios com PS  $\geq$  5mm e PS  $\geq$  6mm aos 3 meses pós-terapia ( $p>0,05$ ).

**Tabela 5.** Número (%) de indivíduos apresentando baixo ( $\leq$  4 sítios com PS $\geq$ 5 mm), moderado (5-8 sítios com PS $\geq$ 5 mm) e alto ( $\geq$ 9 sítios com PS $\geq$ 5 mm) risco para progressão de doença periodontal segundo Lang & Tonetti (2003), bem como apresentando 0,  $\leq$ 4, 5-8 ou  $\geq$ 9 sítios com PS $\geq$ 6 mm 3 meses pós-terapia.

Categoria de PS	Número de sítios:	Grupos de Tratamento		Qui-Quadrado Valor-p
		RAR MTZ+AMX	RAR MTZ+AMX+TFD	
PS $\geq$ 5mm	0	0(0%)	0(0%)	0,585
	$\leq$ 4	03 (16,6%)	04 (22,2%)	
	5-8	03 (16,6%)	05 (27,8%)	
	$\geq$ 9	12 (66,6%)	09 (50,0%)	
PS $\geq$ 6mm	0	03 (16,6%)	03 (16,6%)	1,000
	$\leq$ 4	11 (61,1%)	11 (61,1%)	
	5-8	03 (16,6%)	03 (16,6%)	
	$\geq$ 9	01 (5,5%)	01 (5,5%)	

As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pelo teste Qui-quadrado.

RAR, raspagem e alisamento radicular, MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; TFD, terapia fotodinâmica; PS, profundidade de sondagem

O número e o percentual de indivíduos apresentando baixo ( $\leq$  4 sítios com PS  $\geq$  5mm), moderado (5-8 sítios com PS  $\geq$  5mm) e alto ( $\geq$  9 sítios com PS  $\geq$  5mm) risco para progressão de doença periodontal de acordo com Lang e Tonetti (2003), bem como apresentando 0,  $\leq$  4, 5-8 ou  $\geq$ 9 sítios com PS  $\geq$  6mm 3 meses após a terapia estão apresentados na Tabela 5. Não foram observadas diferenças entre os grupos na distribuição de indivíduos nos diferentes níveis de risco para a progressão da doença periodontal. Observa-se que 66.6% (12 indivíduos) e 50% (9 indivíduos) do grupo controle e teste, respectivamente, apresentam um risco alto para progressão de doença 3 meses após a terapia periodontal.

A Figura 1 apresenta as médias de contagem ( $\times 10^5$ ) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início e 3 meses pós-terapia nos dois grupos terapêuticos. As alterações microbiológicas provocadas por ambas às terapias foram similares. Ambos os grupos reduziram significativamente as médias de contagem das três espécies do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*), bem como de duas espécies do complexo laranja (*Eubacterium nodatum* e *Prevotella intermedia*). *Capnocytophaga gingivalis* (complexo verde) e *Campylobacter gracilis* (complexo laranja) apresentaram um aumento significativo em ambos os grupos 3 meses pós-terapia. Espécies compatíveis com o hospedeiro, *Actinomyces israeli*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus gordonii* e *Capnocytophaga ochracea* aumentaram significativamente 3 meses após a terapia somente no grupo que foi submetido a TFD. As mudanças na proporção das 40 espécies bacterianas avaliadas entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia estão apresentadas na Figura 2. Seis espécies alteraram significativamente no grupo Controle enquanto que dezesseis espécies bacterianas foram alteradas no grupo Teste (TFD). As proporções dos três patógenos do complexo vermelho foram reduzidas entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia nos dois grupos. Aos 3 meses pós-terapia, apenas a proporção de *E. nodatum* apresentou uma redução significativa nos indivíduos submetidos a TFD. Por outro lado, *C. gracilis* em ambos os grupos e *Campylobacter showae* e *Fusobacterium nucleatum* ssp. *vincentii* no grupo Controle estavam significativamente aumentados 3 meses pós-terapia. Em relação às espécies compatíveis com o hospedeiro, indivíduos que receberam TFD apresentaram um aumento significativo na proporção de *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israeli*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *C. gingivalis*, *Campylobacter ochracea*.

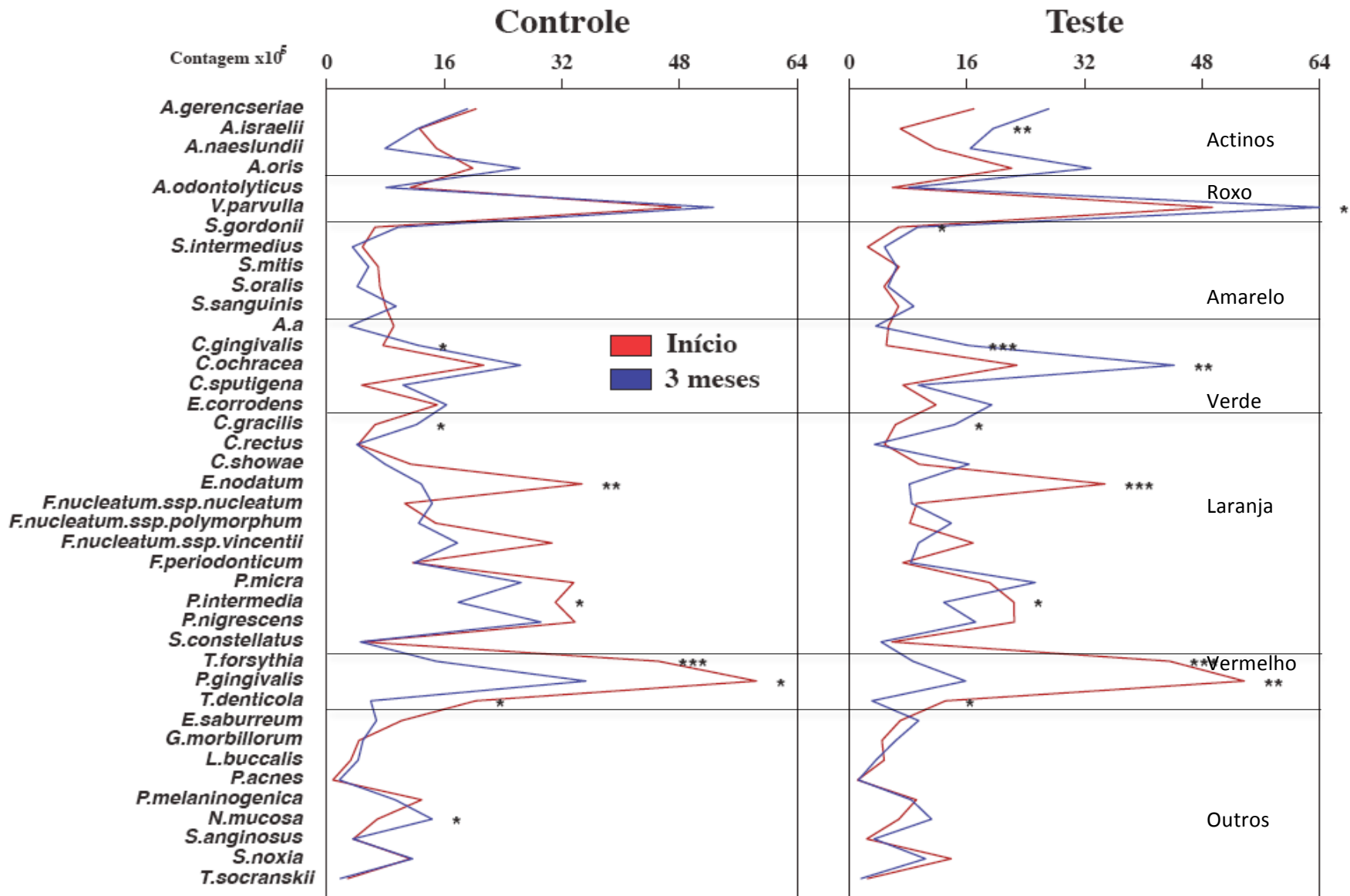


Figura 1. Média de contagem ( $\times 10^5$ ) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças significativas entre o exame inicial e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon (\*  $p < 0.05$ ).

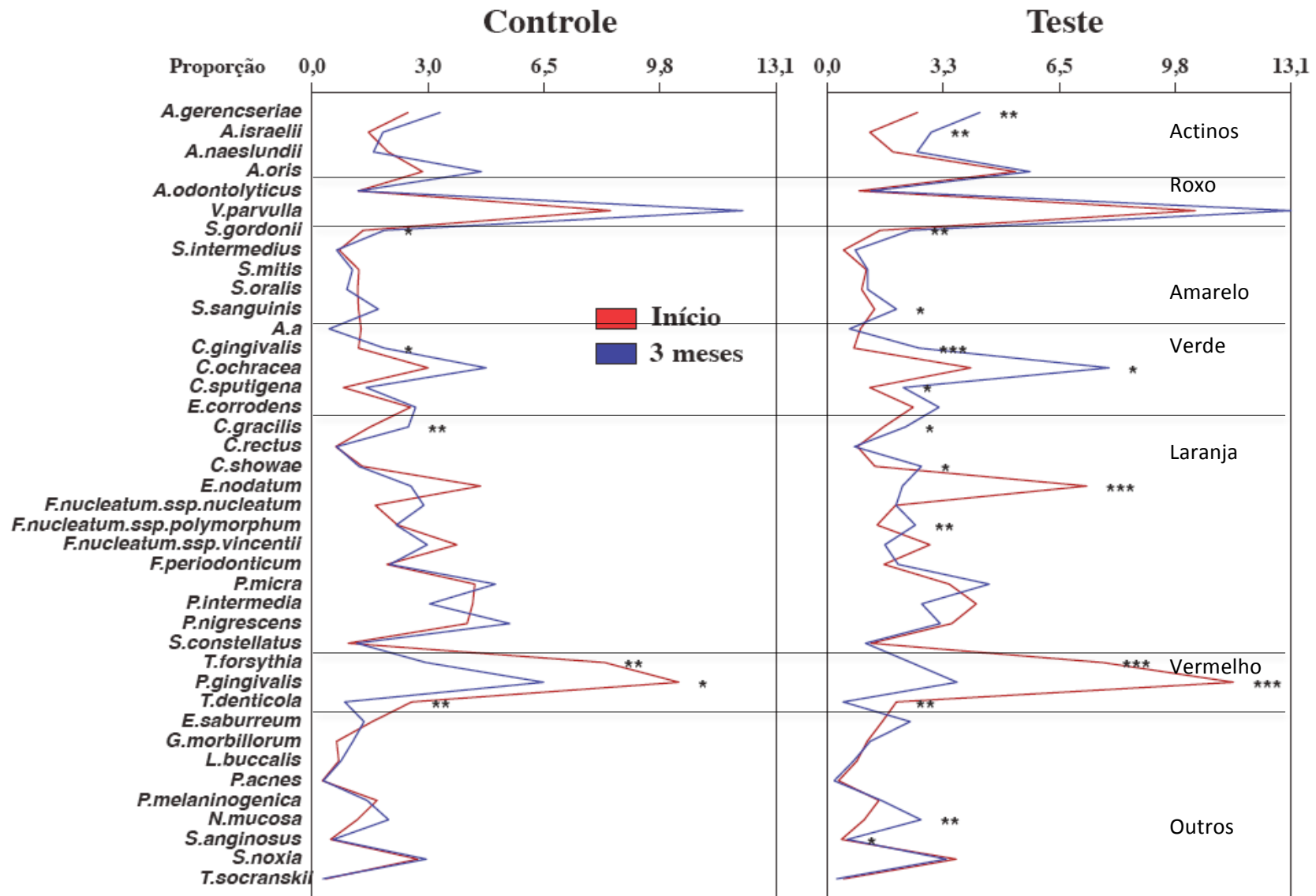


Figura 2. Média da proporção das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças significativas entre o exame inicial e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon (\*  $p < 0,05$ ).

A Figura 3 mostra as alterações ocorridas nas proporções dos complexos microbianos após os tratamentos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no início do estudo. Todas as terapias levaram a uma redução significativa nas proporções do complexo vermelho que passou de 21,36% para 10,64% das espécies avaliadas no grupo Controle, e de 21,14% para 6,46% no grupo Teste, sendo que os indivíduos que receberam a TFD apresentaram uma média de proporção de complexo vermelho significativamente inferior ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). Uma redução significativa também foi observada em relação à proporção do complexo laranja no grupo Teste, sendo que neste grupo a média deste complexo foi significativamente inferior ao grupo Controle (33,73% e 27,23% para o grupo Controle e Teste, respectivamente). As proporções dos complexos considerados benéficos, verde, amarelo e espécies *Actinomyces* aumentaram significativamente somente nos indivíduos submetidos à TFD. A média da proporção das espécies do complexo verde foi significativamente superior à encontrada no grupo Controle (16,42% e 11,85% para o grupo Teste e Controle, respectivamente).

A soma da proporção das espécies compatíveis com o hospedeiro (*Actinomyces*, complexo roxo, amarelo e verde), bem como das espécies periodontopatogênicas (complexos laranja e vermelho) estão apresentadas na Figura 4. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação a esta proporção no início do estudo. Ambas as terapias foram eficazes em aumentar a proporção de espécies compatíveis com o hospedeiro e diminuir a proporção das espécies patógenas. Entretanto, indivíduos do que recebam TFD em comparação aos indivíduos do grupo Controle apresentaram menores proporções de periodontopatógenos, bem como maiores proporções de espécies benéficas aos 3 meses pós-terapia.

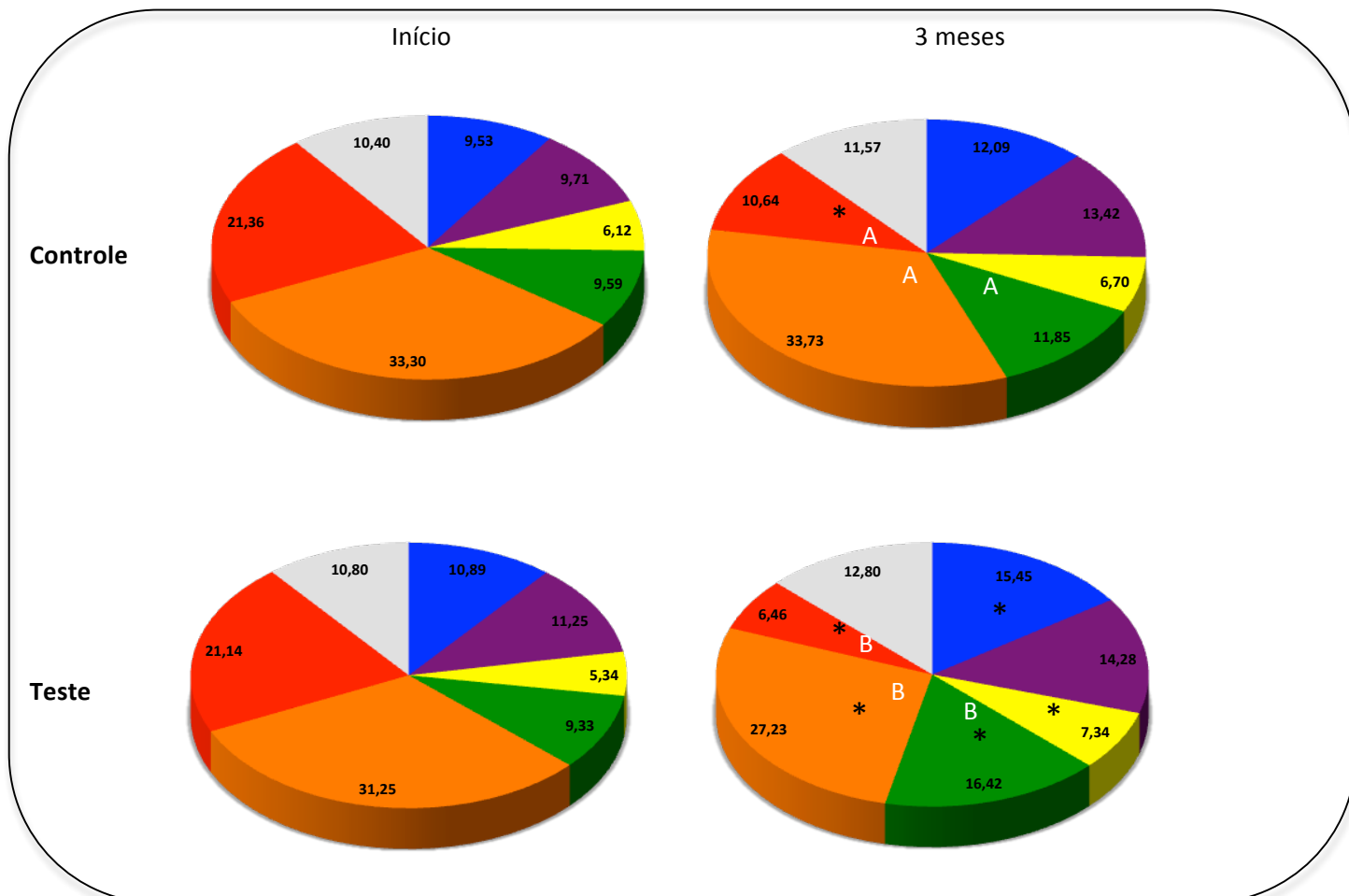


Figura 3. Proporção dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo e aos 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças entre o início do estudo e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon (\*  $p < 0,05$ ). Diferenças significativas entre os grupos experimentais em cada tempo foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney (Letras diferentes representam  $p < 0,05$ ).

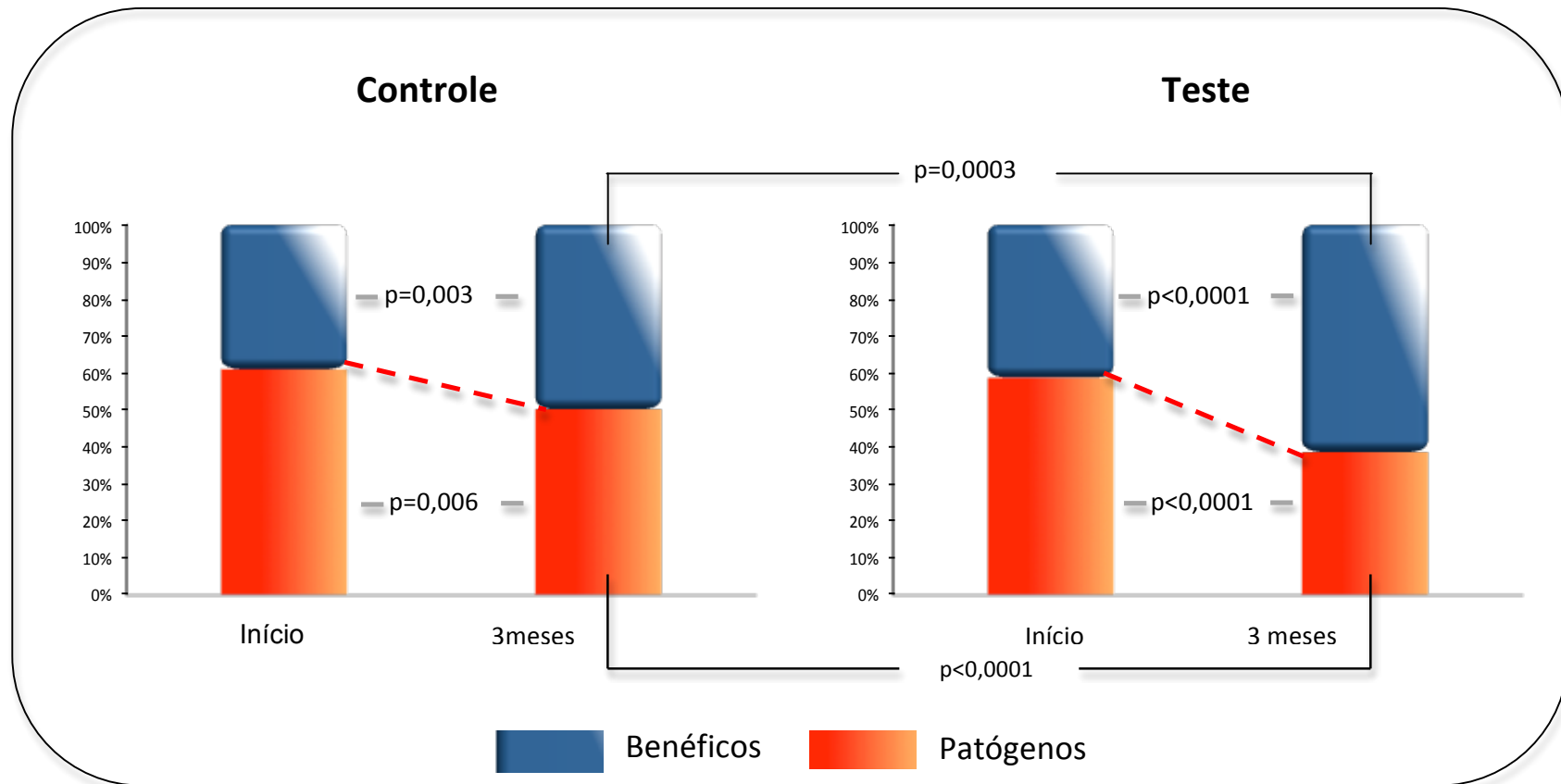


Figura 4. Média da proporção de espécies patogênicas (complexos vermelho e laranja) e espécies compatíveis com o hospedeiro (complexos roxo, verde e amarelo e *Actinomyces*) presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo e 3 meses pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos. Diferenças significativas entre o exame inicial e 3 meses pós-terapia foram analisadas por meio do teste Wilcoxon. Diferenças significativas entre os grupos experimentais em cada tempo foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos da aplicação única de TFD associada a RAR e ao uso sistêmico de metronidazol (400mg, 3x dia/14dias) e a amoxicilina (500mg, 3x dia/14dias), em um grupo de indivíduos fumantes com periodontite crônica generalizada. O crescente interesse em se definir terapias periodontais mais efetivas para indivíduos que possuem fatores de risco para a progressão das doenças periodontais está relacionado ao fato desses indivíduos, principalmente os fumantes, não responderem satisfatoriamente às terapias mecânicas tradicionais, como a RAR (Preber; Bergström, 1985; MacFarlane et al., 1992; Haber J, 1994; Bergström; Preber, 1994; Kaldahl et al., 1996; Grossi et al., 1996; Haffajee et al., 1997; Palmer et al., 1999; Söder et al., 1999; Winkel et al., 2001; Van der Velden et al., 2003; Mascarenhas et al., 2005). É importante observar que foram incluídos no presente estudo indivíduos considerados fumantes pesados, ou seja, que fumavam no mínimo 10 cigarros por dia há pelo menos 5 anos (Ammenheuser et al., 1997). Martinez-Canut et al. (1995) demonstraram que o número de cigarros consumidos é diretamente proporcional à severidade da doença periodontal e que esta associação só é observada clinicamente a partir do consumo de 10 cigarros por dia. A terapia RAR associada ao uso de metronidazol e amoxicilina foi escolhida como terapia padrão para ambos os grupos por ser um procedimento comprovadamente efetivo no tratamento da periodontite crônica em indivíduos fumantes (Matarazzo et al. 2008). Além disso, estudos recentes vêm corroborando com estes resultados, demonstrando benefícios clínicos e microbiológicos adicionais no tratamento de várias formas de periodontite com a associação destes antibióticos (Mestnik et al., 2010; Silva et al., 2011). Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa (Matarazzo et al., 2008) observaram que indivíduos fumantes pesados tratados com metronidazol (400mg, 3x dia/14dias) e amoxicilina (500mg, 3x dia/14dias) obtiveram resultados clínicos e microbiológicos mais favoráveis em comparação ao uso de apenas metronidazol ou RAR isoladamente. Entretanto, neste mesmo estudo, sugere-se que a resposta microbiológica a esta terapia possa ser diferente dos indivíduos não fumantes, principalmente em relação à proporção



remanescente do complexo laranja. Desta forma, sugere-se que este perfil microbiano pós-terapia dos pacientes fumantes poderia provocar uma recidiva maior da periodontite durante a fase da terapia periodontal de suporte.

Assim sendo terapias adjuntas podem ser propostas no intuito de alterar este perfil microbiológico pós-terapia nos indivíduos fumantes. Com este objetivo, a TFD surge como uma nova possibilidade, uma vez que é um método bactericida eficaz (Sigusch et al., 2010; Nastri et al., 2010) o que poderia auxiliar no tratamento periodontal de indivíduos fumantes. Estudos *in vitro* e *in vivo* vêm demonstrando resultados positivos quanto a uso da TFD associada à RAR no tratamento da periodontite (Andersen et al., 2007; Braun et al., 2008; Lulic et al., 2009; Ge et al., 2011; Sgolastra et al., 2011; Al-Zahrani; Austah On., 2011). Entretanto, nenhum estudo clínico e microbiológico até o presente momento comparou o uso da TFD especificamente em indivíduos fumantes. Observamos na literatura estudos clínicos que incluíram indivíduos fumantes em sua amostra (Chondros et al., 2009; Lulic et al. 2009), entretanto este fator não foi considerado na análise dos dados, o que dificulta a comparação direta do presente estudo com os resultados da literatura.

Apesar de ambas as terapias, grupo controle e teste, terem provocado uma melhora em todos os parâmetros clínicos 3 meses após a terapia (Tabela 2), observamos que indivíduos que receberam uma aplicação única de TFD apresentaram uma redução significativa nas médias de boca toda e de bolsas intermediárias no parâmetro de PS em comparação aos indivíduos que não foram submetidos a esta terapia adicional. (Tabela 3). Nossos resultados corroboram com outros estudos que também sugeriram efeitos clínicos benéficos adicionais na redução de PS quando a TFD foi utilizada como adjuvante ao tratamento a periodontite crônica (Andersen et al., 2007; Braun et al., 2008; Lulic et al., 2009; Ge et al., 2011; Sgolastra et al., 2011). Em uma recente meta-análise, Sgolastra et al. (2011) analisaram os resultados de 7 estudos clínicos, aleatórios e randomizados que utilizaram a TFD associada a RAR (Andersen et al., 2007; Christodoulides et al., 2008; Chondros et al., 2009; Lulic et al., 2009; Polansky et al., 2009; Rühling et al., 2010; Ge et al., 2011). Os autores reportaram que o uso adjunto da TFD a RAR promove um ganho clínico adicional de 0,23 mm e uma redução na PS de 0,21 mm em

comparação a RAR isoladamente. Observa-se que nossos resultados foram muito similares aos apresentados por Sgolastra et al. (2011). Para os dados de boca toda, a diferença na redução da PS entre os grupos foi de 0,35 mm e 0,12 no ganho clínico de inserção clínica (Tabela 3). Devido a ausência de um período maior de acompanhamento clínico após a terapia periodontal, os autores (Sgolastra et al., 2011) apenas conseguiram reportar resultados de 3 meses pós-tratamento. Entretanto, vale destacar, que alterações somente na PS não apresentam alta relevância clínica na comparação de diferentes terapias periodontais (Van Dyke., 2005).

Mesmo o presente estudo demonstra evidências que em um período curto de cicatrização periodontal pós-terapia (3 meses), a TFD apresenta alguns benefícios clínicos adicionais na redução de PS, vale destacar que para outros parâmetros clínicos importantes, tais como ganho de inserção clínica e número de sítios com PS  $\geq$  5mm residuais (Tabela 3 e 4), não foram observadas diferenças clínicas entre o grupo controle e teste. Ambos os grupos apresentaram um alto número de bolsas residuais, sendo que o grupo controle apresentou  $13,1 \pm 9,0$  e enquanto o grupo teste  $9,5 \pm 6,3$ . Além disso, 12 indivíduos do grupo controle e 9 do grupo teste apresentavam mais do que 9 sítios com esta característica, o que os classifica com alto risco de progressão de doença segundo Lang e Tonetti (2003). Por outro lado, é interessante observar que indivíduos não-fumantes e que foram submetidos a mesma associação de antibióticos, apresentam em média  $5,3 \pm 4,4$  (Silva et al., 2011). Nossos dados sugerem que em indivíduos fumantes pesados com periodontite crônica generalizada, mesmo o uso da combinação de metronidazol e amoxicilina, não é capaz de promover alterações clínicas profundas e terapias adicionais precisam ser implementadas com o objetivo de impedir progressão e recorrência da periodontite nestes indivíduos.

Em relação aos dados microbiológicos, visto que os dois grupos receberam RAR associada ao MTZ e AMX, ambas as terapias levaram a uma melhora no perfil microbiológico subgengival. Os níveis e proporções individuais dos patógenos do complexo vermelho, bem como destas espécies associadas sofreram reduções significativas 3 meses pós-terapia. Os dados obtidos foram semelhantes aos outros estudos que utilizaram RAR associada ao MTZ e AMX

no tratamento de indivíduos com periodontite crônica (Silva et al., 2011). Entretanto, a associação da TFD neste protocolo de tratamento levou a efeitos microbiológicos superiores aos obtidos somente pelo grupo controle. Indivíduos que receberam a TFD apresentaram menores proporções do complexo vermelho e laranja, bem como um aumento no complexo verde. A comparação direta dos resultados alcançados neste estudo com a literatura é difícil, uma vez que nenhum estudo até o presente momento analisou as alterações microbiológicas ocorridas pela associação da RAR a TFD pela técnica do *Checherboard DNA-DNA hybridization*. Todos os estudos que compararam a associação da RAR a TFD utilizaram a reação em cadeia da polimerase como análise microbiológica. Nossos resultados corroboram com alguns estudos que observam melhores resultados microbiológicos com a associação da RAR a TFD (Polansky et al., 2009; Chondros et al., 2009). Polansky et al. (2009) observaram uma diminuição significativa na prevalência de *P. gingivalis* 3 meses pós-terapia nos indivíduos que receberam RAR associada a TFD em comparação a RAR isoladamente. Reduções significativas de *Treponema denticola* também foram observadas com associação da RAR a TFD (Chondros et al., 2009). Por outro lado, outros estudos falharam em observar melhoras microbiológicas com a associação da TFD (Christodoulides et al., 2008; Rühling et al., 2010). Entretanto, a metodologia empregada nestes estudos e o baixo número de amostras analisadas pode justificar a ausência de resultados encontrados.

Um dos objetivos do presente estudo em relação á associação da TFD no protocolo de tratamento (RAR associada a MTZ e AMX) foi a busca de um melhor resultado microbiológico nos indivíduos fumantes, principalmente em relação a redução das espécies do complexo laranja. Entretanto, em ambos os grupos, a maioria das espécies deste complexo não foram afetadas, entretanto quando observamos estes espécies em conjunto, os indivíduos que receberam a TFD apresentaram uma proporção significativamente inferior comparado ao grupo controle (27,23% no grupo Teste e 33,73% no grupo Controle). Entretanto, mesmo o grupo Teste apresentando uma redução significativa desse complexo, as proporções em ambos os grupos permanecem altas. Esses dados diferem daqueles observados em indivíduos não-fumantes (Silva

et al., 2011), que também utilizando a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization*, avaliaram o efeito do MTZ associado a AMX em indivíduos com periodontite crônica. No estudo de Silva et al. (2011) os indivíduos não fumantes apresentaram 16,5% de complexo laranja aos 3 meses pós-terapia, comparado aos 33,7% do grupo controle e 27,2% do grupo Teste. Desta forma, os dados apresentados no presente estudo corroboram com a hipótese sugerida por Matarazzo et al. (2008) de que a dificuldade em suprimir os microorganismos do complexo laranja, que precedem a colonização das espécies do complexo vermelho, pode estar relacionada à dificuldade em se tratar e manter com eficácia do tratamento periodontal nos indivíduos fumantes.

As espécies compatíveis com o hospedeiro foram minimamente alteradas pela terapia Controle, entretanto observamos um aumento significativo em alguns casos com a associação da TFD (Figura 1 e 2). Quando as proporções dos complexos foram avaliadas (Figura 3) ou sub-categorizadas em espécies benéficas e patogênicas (Figura 4) observou-se um aumento significativo pós-terapia nas proporções do complexo verde, bem como das espécies benéficas nos indivíduos do grupo Teste.

#### Considerações finais

De uma forma geral, nosso estudo demonstrou um efeito clínico superior na redução da PS pela associação da TFD a terapia antibiótica associada. Entretanto, cumpre salientar que não foi observada nenhuma influência da TFD em outros parâmetros clínicos importantes, como descrito anteriormente. Em relação aos dados microbiológicos, os resultados do presente estudo mostraram que a utilização da TFD associada a antibióticos sistêmicos no tratamento de indivíduos fumantes com periodontite crônica leva a efeitos benéficos adicionais. Os dados desta investigação são preliminares e futuros estudos com um maior período de acompanhamento será de extrema importância para garantir se os resultados benéficos da terapia antibiótica observados até o momento serão mantidos por longo período.

## **6 CONCLUSÃO**

Não foram observados benefícios clínicos relevantes na associação da TFD a uso sistêmico de metronidazol e amoxicilina e RAR. Entretanto, a associação da TFD levou a benefícios microbiológicos na terapia periodontal de indivíduos fumantes com periodontite crônica aos 3 meses pós-terapia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec;25(4):229-35.

Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol*. 2006 Feb;2(1):53-71.

Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008 Nov;79(11):2156-65.

Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):566-75.

Al-Zahrani MS, Austah ON. Photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing in treatment of chronic periodontitis in smokers. *Saudi Med J*. 2011 Nov;32(11):1183-8.

Ammenheuser MM, Hastings DA, Whorton Jr EB, Ward Jr JB. Frequencies of hrpt mutant lymphocytes in smokers, non-smokers and former smokers. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30: 131-8.

Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent*. 2007;18(2):34-8.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intra-examiner variability. *J Periodontol*. 2003 Dec;74(12):1736-40.

Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol*. 1982 Sep;53(9):550-6.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999 Dec;4(1):1-6.

Bergström J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol.* 1994 May;65(5 Suppl):545-50.

Berglundh T, Krok L, Liljenberg B, Westfelt E, Serino G, Lindhe J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 1998 May;25(5):354-62.

Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, van Lier JE. Photosensitising activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1990 ;59:149–155.

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct;35(10):877-84.

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol.* 1998 Sep;68(3):370-6.

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol.* 1997 Jun;65(6):1026-31.

Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006 Jul;6(7):535-45.

Checchi L, Ciapetti G, Monaco G, Ori G. The effects of nicotine and age on replication and viability of human gingival fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol.* 1999 Oct;26(10):636-42.

Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2009 Sep;24(5):681-8.

Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, Wikesjö UM, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol.* 1987 Aug;58(8):529-39.

Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2008 Sep;79(9):1638-44.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jun 17;90(12):889-905.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009 Sep;36(9):739-49.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* 1983; 132: 6-13.

Freitas I. Inflammation and photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol.* 1991 Feb B.;8(3):340-1.

Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock RE. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 ;44:2086–2092.

Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, Nagata MJ, Cirelli JA, Theodoro LH. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011 Dec;38(12):1106-14.



Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, Xie Y, Liu D (2011) Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg* 29: 33-37.

Goulart Rde C, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010 Aug.;28.

Grossi SG, Dunford RG, Ho A, Koch G, Machtei EE, Genco RJ. Sources of error for periodontal probing measurements. *J Periodontol*. 1996 Jul;31(5):330-6.

Harber J. Cigarette smoking: a major risk factor for periodontitis. *Compend Contin Educ Dent*. 1994; 15(8): 1001-14.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 1997 Oct;24(10):767-76.

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):115-81.

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

Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. 2000 Dec *J Periodontol*. 2000 Dec.;71(12):1846-51.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:136-59; discussion 160-2..

Herrera D. Photodynamic therapy for chronic periodontitis. *Evid Based Dent.* 2011;12(3):78-9.

Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1996 Jul;67(7):675-81.

Kim JS, Park JY, Chung WY, Choi MA, Cho KS, Park KK. Polymorphisms in genes coding for enzymes metabolizing smoking-derived substances and the risk of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004 Nov;31(11):959-64.

Konopka T, Król K, Kopeć W, Gerber H. Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. *Arch Immunol Ther Exp* 2007 Nov-Dec;55(6):417-22.

Krosł G, Korbelik M, Dougherty GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Mar Br J Cancer* 1995.;71(3):549-55.

Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent.* 2003.

Lulic M, Leiggener Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009 Aug;36(8):661-6.

Listgarten MA, Helldén L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol.* 1978 May;5(2):115-32.

Listgarten MA, Johnson D, Nowotny A, Tanner AC, Socransky SS. Histopathology of periodontal disease in gnotobiotic rats monoinfected with *Eikenella corrodens*. *J Periodontal Res.* 1978 Mar;13(2):134-48.

Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16:329-334.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965 May-Jun;36:177-87.

Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol.* 1985 Aug;56(8):447-56.

Lovdal A, Arno A, Waerhaug J. Incidence of clinical manifestations of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. *J Am Dent Assoc.* 1958 Jan;56(1):21-33.

MacFarlane G, Herzberg M, Wolff L, Hardie N. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leucocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol.* 1992; 71:73-8.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.*2007; 22:83–91.

Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1992 ;14:262–266.

Marthy HJ, Murasecco-Suardi P, Oliveros E, Braun AM. Primary effects of singlet oxygen sensitizers on eggs and embryos of sea urchins. *J Photochem Photobiol* 1990 Nov;7(2-4):303-15.

Martinez-Canut P, Lorca A, Magan R. Smoking and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1995; 22:743-9.

Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Hill R, Soehren S, Fenno JC, Giannobile WV, Wang HL. Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Periodontol.*2005 Mar;76(3):426-36.

Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.*2008 Oct.;35(10):885-96.

Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):428-35.

Mavropoulos A, Aars H, Brodin P. The acute effects of smokeless tobacco (snuff) on gingival blood flow in man. *J Periodontal Res.* 2001 ;36(4):221-6.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Favari M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 Apr;37(4):353-65.

Meisel P, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Kocher T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *J Periodontol.* 2004 Feb;75(2):236-42.

Mirbod SM, Ahing SI, Pruthi VK. Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessel density and internal circumference in smokers and non-smokers. *J Periodontol.* 2001 Oct;72(10):1318-23.

Nastri L, Donnarumma G, Porzio C, De Gregorio V, Tufano MA, Caruso F, Mazza C, Serpico R. Effects of toluidine blue-mediated photodynamic therapy on periopathogens and periodontal biofilm: in vitro evaluation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010 Oct-Dec;23(4):1125-32.

Newman HN. The apical border of plaque in chronic inflammatory periodontal disease. *Br Dent J.* 1976 Aug 17;141(4):105-13.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res.* 1977 Mar;12(2):120-8.

Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol* 1992 ;55:89-96.

Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Jun. Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):339-52.

Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci*. 2002 Jan ;1(1):1-21.

Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Poston RN, Odell EW, Wilson RF. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J Periodontal Res*. 1999 Oct;34(7):363-9.

Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Wilson RF, Poston RN, Odell EW. Potencial mechanisms of susceptibility to periodontitis in tabacco smokers. *J Periodont Res*. 2000; 34: 363-9.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:180-95.

.Preber H, Bergström J. The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*. 1985; 13: 319-23.

Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 Jul;36(7):575-80.

Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MP, Ribeiro AC, Ribeiro MS. Histomorphometric and Microbiological Assessment of Photodynamic Therapy as an Adjuvant Treatment for Periodontitis: A Short-Term Evaluation of Inflammatory Periodontal Conditions and Bacterial Reduction in a Rat Model. *Photomed Laser Surg*. 2011.

Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW, Scott DA, Wilson RF. Expression of ICAM-1 and E-selectin in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. *J Oral Pathol Med*. 2002 Jan;31(1):59-64.

Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2003;32:50-8.

Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxycillin

alone and combined. A placebo controlled study. *J Clin Periodontol.* 2002 Apr;29(4):342-50.

Rühling A, Fanghänel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, Kocher Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. *Clin Oral Investig.* 2010 Dec;14(6):637-44.

Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellström MK, Socransky SS, Lindhe J. The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001 May ;28(5):411-8.

Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2011 Oct 16.

Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol.* 2005 Jul;76(7):1100-5

Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol.* 2010 Jul ;81(7):975-81.

Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2011 Sep;38(9):828-37.

Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1976 Jan;84(1):1-10.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989; 4: 47-51.

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol.* 1988 Aug;15(7):440-4.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*. 1994 Jun;5:7-25.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994 Oct;17(4):788-92.

Socransky SS, HaffajeeAD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sample sites. *J Clin Periodontol*. 1991; 18: 766-75.

Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res*. 1970 Mar-Apr;49(2):203-22.

Söder B, Nedlich U, Jin LJ. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol*. 1999 Jul;70(7):761-71.

Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol*. 1998 Mar 15;83(1-2):148-56.

Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996;18(3):253-9.

Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1995 Dec;66(12):1056-64.

Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Barker SJ, Hyatt J, Nelson JS, Berns MW. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1990 Aug ;52(2):375-85.

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol*. 1998 Oct;69(10):1111-8.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):165-73.

Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Loos BG. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol*. 2003 Jul;30(7):603-10.

Van Dyke TE. The clinical significance of new therapies for the management of periodontal disease. *J Int Acad Periodontol*. 2005.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28.

Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol*. 1995 May;78(5):569-74.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May ;3(5):412-8.

Winkel EG, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1998 Nov ;25(11 Pt 1):857-64.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2001 Apr;28(4):296-305.