



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



BEATRIZ MARIA VALÉRIO LOPES

**“Avaliação do efeito do laser de Er:YAG
no tratamento da doença periodontal
crônica em humanos. Análises clínica,
imunológica e microbiológica.”**

ARARAQUARA

2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



BEATRIZ MARIA VALÉRIO LOPES

**“Avaliação do efeito do laser de Er:YAG
no tratamento da doença periodontal
crônica em humanos. Análises clínica,
imunológica e microbiológica.”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração - PERIODONTIA.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Helena Theodoro

ARARAQUARA

2008

Lopes, Beatriz Maria Valério.

Avaliação do efeito do laser de Er:YAG no tratamento da doença periodontal crônica em humanos. Análises clínica, imunológica e microbiológica / Beatriz Maria Valério Lopes. – Araraquara: [s.n.], 2008.

137 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Co-orientadora: Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro

1. Lasers 2. Raspagem dentária 3. Aplainamento radicular
4. Doenças periodontais 5. Interleucina-1 6. Reação em cadeia de polimerase 7. Estudo comparativo 8. Laser de Er:YAG

I. Título

BEATRIZ MARIA VALÉRIO LOPES

**Avaliação do efeito do laser de Er:YAG no
tratamento da doença periodontal crônica em
humanos. Análises clínica, imunológica e
microbiológica.**

Tese para obtenção do grau de Doutor.

Comissão Julgadora

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chéríci Mancantonio

2º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

3º Examinador: Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli

4º Examinador: Prof. Dr. Álvaro Francisco Bosco

5º Examinador: Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum

Araraquara, 26 de março de 2008.

Dados Curriculares

Beatriz Maria Valério Lopes

Nascimento	25 de Março de 1977 – Araraquara – SP.
Filiação	José Maria Lopes Cidália Beatriz Valério Lopes
1997/2000	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2001/2002	Curso de Especialização em Periodontia pela APCD em convênio com a FOAr – UNESP - Araraquara – SP.
2002/2003	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2004/2008	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedico este trabalho...

...Ao João

pelos vários momentos em que não pude corresponder da forma que eu queria e que você merecia; por seu incentivo e amor, que impulsionam e completam minha vida.

*“Depois de tudo, somos um, você e eu,
juntos sofremos, juntos existimos, e para
sempre recriaremos um ao outro.”*

Teilhard de Chardin

...À minha mãe Cidália

que por meio de muita renúncia, compreensão, enorme incentivo e imenso amor compreendeu as minhas escolhas e tornou possível esta conquista. Minha eterna gratidão. Tenho orgulho de ser sua filha!

*“O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos.”*

Eleanor Roosevelt

...Ao meu pai José (in memoriam)

por me ensinar, desde pequena, a buscar o conhecimento. Hoje, sinto por você não estar presente ao meu lado, neste dia tão importante para mim.

*“Não somos seres humanos tendo uma experiência espiritual,
mas seres espirituais tendo uma experiência humana.”*

Teilhard de Chardin

Agradecimentos Especiais

A Deus,

por me permitir viver esta vida para aprender...

Às minhas irmãs Ana e Célia e aos meus cunhados Miguel e Elvis,

que compreenderam a minha opção, participando em cada momento da minha vida, longe ou perto.

Aos meus sobrinhos Luísa, Rodrigo, Guilherme e Gabriel

que, com um simples sorriso, fazem com que eu entenda qual é o verdadeiro sentido da vida.

Aos meus tios Nelson, Neusa e Maria do Carmo,

que são parte da minha história,
torcendo sempre pelas minhas conquistas.

À minha nova família: Doca, José, Tânia, Amauri, Nana, Appolo,

Marco, Elis e Manu,

por todo o carinho com que me receberam em sua família, pelo apoio, incentivo, compreensão e convivência.

À Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio,

Que transcendendo o papel de orientadora demonstrou que ensinar é mostrar que é possível. Aprender é tornar possível a si mesmo.

Minha profunda admiração e gratidão à você, que soube ser professora, mestre e amiga, guiando os meus passos e fornecendo-me a base para minha formação moral e científica. Serei eternamente grata por ter compreendido minhas limitações físicas, emocionais e intelectuais durante esse período.

Tenho grande admiração e carinho por você!

*“Uma das coisas mais importantes da vida
não é saber onde estamos, mas em que direção estamos indo.”*

Oliver Wendell Holmes

À Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro,

Que além de ocupar, com mérito, o lugar de co-orientadora, conduzindo-me com o suporte científico sempre que solicitada, tornou-se uma grande amiga, cuja convivência proporcionou-me, além de amizade, carinho, respeito e uma grande admiração. Obrigada pela atenção, paciência e ensinamentos.

Você é muito especial!

Ser é nada. Tornar-se é tudo.”

Fernando Pessoa

Ao Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior,

pelo constante apoio, pela confiança, e imensa colaboração prestada na realização de todo o meu curso de pós-graduação. Agradeço todas as oportunidades que me proporcionou. Dizer que fui sua aluna será sempre um orgulho para mim.

Minha admiração e meu muito obrigada.

À Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato,

agradeço pela amizade, pelo constante estímulo e por estar sempre “por perto” nas horas necessárias. Sua sensibilidade em perceber que precisamos de ajuda fez com que você fosse uma pessoa fundamental em minha vida nesses quatro anos.

Minha gratidão e carinho à você.

À Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico,

esse agradecimento é mais do que especial. Você conheceu-me pequena, em uma fase muito difícil de minha vida e de minha família. “As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem”. Encontrar você depois de tanto tempo e de tantas mudanças em nossas vidas foi muito bom

Obrigada por estar presente em um momento tão feliz para mim.

“Não conheço homens que fracassaram.

Só conheço homens que desistiram.”

Theodore Roosevelt

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de sua Diretora, **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio** e Vice-Diretor, **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**, pela oportunidade e condições oferecidas, desde a graduação, até a realização deste curso.

Aos **Professores das Disciplinas de Graduação** desta faculdade que fizeram parte da minha formação intelectual, pessoal e moral, acreditando no meu potencial.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia, **Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico**, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia desta faculdade, **Adriana, Carlos, Egbert, Elcio, Joni, José Eduardo, Ricardo e Silvana**, que colaboraram, na minha formação, de tão variadas formas, sempre com dedicação, orientação, respeito e amizade.

À minha mãe, **Cidália Beatriz Valério Lopes**, pela revisão da língua portuguesa deste trabalho.

Aos meus padrinhos **Emery e Alcyrr**, por serem fonte de exemplo e dedicação. Às "tias" **Inayá e Maria Elena** pelos incentivos e amizade. Obrigada por todos vocês estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

À amiga **Rafaela**, pelo carinho e ajuda, indispensáveis, no laboratório durante a realização das análises microbiológicas. Se não fosse você o trabalho não seria completo!

À **Profa. Dra. Glória Maria Thompson Galli**, pelo respeito, profissionalismo e atenção dedicados durante a realização deste trabalho nas etapas imuno e microbiológica.

Às amigas **Luciana Porsani, Fabiana Biagioni e Cláudia Guidorizzi** que ao viverem “de fora” esta experiência, compreenderam minhas ausências, sem nunca deixarem de confiar em mim e de estarem ao meu lado.

Ao casal mais que amigo **Luciana e Flávio** obrigada pela generosidade e infinita cumplicidade. Agradeço por compreenderem “minhas ausências constantes” nessa fase tão difícil para mim. Vocês demonstram, com carinho e atenção, que no final, tudo pode dar certo.

Aos casais amigos **Tina e Márcio, Fernanda e João, Dani e Paulo, Elaine e Du**, por sempre estarem dispostos a me ajudar, dentro e fora da faculdade. Obrigada pela amizade e carinho.

Aos amigos de turma de Doutorado, **Andréa, Daniela, Eduardo Ishi, Elizângela, Fernanda, Fernando, Ivy, Juliana Moraes, Juliana Rico, Patrícia e Vanessa**, por todos os momentos em que vivemos juntos.

Em especial, às amigas **Aline, Daniela Zandim, Débora, Joseane, Juliana Moraes, Juliana Rico e Patrícia** por serem amigas e um alicerce quando eu mais precisei

Aos amigos **Ana Emília, Fernando, Ricardo e Ishi**. O convívio com cada um de vocês me fez uma pessoa mais madura e feliz. Saibam que os momentos que passamos juntos, apesar de cada vez menos frequentes, ficarão sempre em minha memória...

Aos colegas do **Mestrado e Doutorado**, atuais e passados, pelo convívio.

A todos os funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial à **Cláudia, Cidinha, Zezé, Maria do Rosário, Ester, Teresinha, Thelma, Sueli** e ao **Toninho**, pela amizade e carinho.

À **Regina Lúcia**, em especial, pela paciência e cooperação sempre disponíveis e pela competência e administração nos seus trabalhos. Obrigada pelo carinho e pelo ombro amigo em todos os momentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, **Mara, Rosângela, José Alexandre e Flávia**, pela amizade, paciência e competência.

A todos os funcionários desta faculdade, em especial aos funcionários da Biblioteca **Maria Helena, Ceres, Cristina, Marley, Maria Aparecida, Adriano, Eliane, Maria Inês, Sílvia e Odete**, pela atenção e auxílio.

Aos **pacientes**, por terem compreendido a importância de comparecer, e, não me abandonando, tornaram possível a realização deste estudo.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

*“Na simplicidade aprendemos que
reconhecer um erro não nos diminui,
mas nos engrandece, e que as pessoas
não existem para nos admirar, mas
para compartilhar conosco
a beleza da existência.”*

Roberto Shinyashiki

Epígrafe

Um dia você aprende que...

*...não importa em quantos pedaços
o seu coração foi partido,
o mundo não pára
para que você o conserte.*

*Aprende que o tempo
Não é algo que possa voltar para trás.
Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém
lhe traga flores.*

*E você aprende que realmente pode suportar,
que realmente é forte e que pode ir
muito mais longe depois de
pensar que não se pode mais.*

*E que realmente a vida tem valor, e
que você tem valor
diante da vida.*

*Nossas vidas são traidoras
e nos fazem perder o bem que poderíamos
conquistar se não fosse o
medo de tentar.*

William Shakespeare

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	14
Lista de Tabelas.....	15
Lista de Abreviaturas e Nomenclaturas.....	16
Resumo.....	19
Abstract.....	21
1 Introdução.....	23
2 Proposição.....	30
3 Material e Método.....	31
3.1 Cálculo da amostra.....	31
3.2 Seleção dos Pacientes.....	31
3.3 Calibração do Examinador.....	32
3.4 Delineamento clínico do estudo.....	32
3.4.1 Cronograma de Execução da Metodologia.....	32
3.4.2 Coleta de Fluido Crevicular.....	34
3.4.3 Análise Clínica.....	35
3.4.4 Tratamento.....	37
3.5 Delineamento laboratorial do estudo.....	39
3.5.1 Análise Imunológica.....	39
Preparo das amostras e Teste de ELISA.....	39
3.5.2 Análise Microbiológica.....	41
Seleção e síntese dos oligonucleotídeos.....	41
Preparo das amostras e reação de PCR.....	41
3.6 Planejamento Estatístico.....	44
4 Capítulos.....	47
4.1 Capítulo 1 – Análise prospectiva.....	47
4.2 Capítulo 2 – Análise longitudinal.....	75
5 Discussão.....	116
6 Conclusão.....	122

7 Referências.....	123
8 Anexos.....	131
8.1 Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética.....	131
8.2 Anexo 2 – Modelo de ficha clínica específica.....	132
8.3 Anexo 3 – Carta de aceitação do <i>Journal of Periodontology</i>	134
8.4 Anexo 4 – Composição do coquetel imunológico e do PBS.....	135
8.5 Anexo 5 – Valores de energia e tempo utilizados (Grupo L).....	136

Lista de Figuras

Figura 1 – Cronograma do experimento, em dias.	33
Figura 2 – Sondagem clínica, com sonda computadorizada, sendo realizada com a placa de polipropileno em posição.	34
Figura 3 – Colocação do cone de papel absorvente para coleta do fluido crevicular para análises imuno e microbiológica.	35
Figura 4 – Tratamento com laser de Er:YAG, nos grupos RARL e L.	38
Figura 5 – Tratamento com RAR, nos grupos RARL e RAR.	38
Figura 6 – A - Laser de Er:YAG, com comprimento de onda de 2,94µm. B - Peça de mão 2056 utilizada no laser.	39

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Oligonucleotídeos bacterianos para as espécies avaliadas	42
Tabela 2 – Quantidade de Taq DNA polimerase utilizada para cada par de oligonucleotídeo.	43
Tabela 3 – Condições das reações de PCR	43

Lista de Abreviaturas e Nomenclaturas

<i>Aa</i>	<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AsGaAl	Arsênio-Gálio-Alumínio
C	Controle (sem tratamento)
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
Comprimento de onda	Distância entre dois pontos correspondentes em uma onda eletromagnética (medidos em micrometros ou nanômetros)
Er:YAG	Érbio (Ítrio, Alumínio, Granada)
Hz	Hertz – número de pulsos por segundo
IG	Índice Gengival
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IP	Índice de Placa
J	Joule – unidade de energia
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
L	Laser
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
mJ	Milijoule – unidade de energia
mJ/cm ²	Milijoule por centímetro quadrado
mJ/p	Milijoule por pulso
mL	Mililitro

mm	Milimetro
ms	Milissegundo
Nd:YAG	Neodímio (Ítrio, Alumínio, Granada)
ng	Nanograma
NI	Nível de Inserção
NIC	Nível de Inserção Clínica
NICR	Nível de Inserção Clínica Relativo
nm	Nanometro
ns	Nanossegundo
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PBS	Solução Tampão Fosfatado
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pg	Picograma
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Pi</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Pn</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
pps	Número de pulsos por segundo
PS	Profundidade de Sondagem
RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
RARL	Raspagem e Alisamento Radicular + Laser
RG	Recessão Gengival
rpm	Rotações por minuto
s ou seg	Segundos
SS	Sangramento à Sondagem
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>

U	Unidade
V	Volts – unidade de energia
W	Watt – unidade de potência
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
μs	Microsegundo

LOPES B M V. Avaliação do efeito do laser de Er:YAG no tratamento da doença periodontal crônica em humanos. Análises clínica, imunológica e microbiológica [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

Introdução: O objetivo do presente estudo foi de comparar o efeito do laser de Er:YAG (100mJ/pulso, 10Hz, 12,9J/cm²), associado ou não, à raspagem e alisamento radicular (RAR), com a RAR sozinha no tratamento de pacientes com doença periodontal crônica, por meio de parâmetros clínicos, imunológico e microbiológico.

Metodologia: Vinte e um pacientes apresentando 4 bolsas entre 5 e 9 mm, em sítios não vizinhos foram selecionados. Em um estudo de boca dividida, cada sítio foi randomizado e divididos nos grupos: 1)RARL - RAR e Laser; 2)L - Laser somente; 3)RAR - RAR somente e 4)C - sem tratamento algum. Os índices de placa (IP) e gengival (IG), sangramento à sondagem (SS), níveis de interleucina 1 Beta (IL-1 β – pelo teste ELISA) e a presença de bactérias (*Aa*, *Pg*, *Pi*, *Pn* e *Tf* pela técnica PCR) foram avaliados no inicial 12, 30, 90 e 180 dias pós-tratamentos, enquanto profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG) e nível de inserção (NI) foram avaliados antes, 30, 90 e 180 dias após os tratamentos. Análise estatística dos dados foi realizada ($p<0,05$) intra e inter grupos.

Resultados: Doze dias após os tratamentos, IP reduziu para RARL e RAR ($p<0,05$); IG aumentou em L, RAR e C ($p<0,05$) e SS reduziu para RARL, L e RAR ($p<0,05$). Aos 30 dias, o IP reduziu RARL e RAR ($p<0,05$), o IG reduziu para RARL ($p<0,05$) e aumentou para C ($p<0,05$). Os grupos RARL, L e RAR apresentaram redução no SS e ainda, reduziram significativamente o SS quando comparados ao C ($p<0,05$). A PS reduziu para os grupos RARL, L e RAR ($p<0,05$), o NI aumentou para RAR ($p<0,05$) e RG aumentou para RARL e L ($p<0,05$). Após 90 dias, o IP reduziu para todos os grupos do estudo ($p<0,05$); o IG reduziu para o grupo RARL e RAR ($p<0,05$); o SS reduziu para todos os grupos do estudo ($p<0,05$). A PS reduziu para os grupos RARL, L e RAR

($p < 0,05$), o NI aumentou para RARL, L e RAR ($p < 0,05$) e RG aumentou para RARL e L ($p < 0,05$). Aos 180 dias, IP reduziu para RARL, L e RAR ($p < 0,05$); IG reduziu para RARL e RAR ($p < 0,05$); SS reduziu para todos os grupos do estudo ($p < 0,05$). A PS reduziu, NI e RG aumentaram para os grupos RARL, L e RAR ($p < 0,05$). Em todos os períodos, os grupos tratados RARL e L demonstraram redução significativa na porcentagem de sítios com presença de alguma bactéria ($p < 0,05$), já o grupo RAR demonstrou essa redução somente até os 30 dias ($p < 0,05$). O grupo RARL foi o que apresentou menor prevalência de bactérias presentes quando comparadas as diferenças entre os grupos. Os níveis de IL-1 β observados no estudo não demonstraram diferenças significantes ($p > 0,05$) intra e inter grupos em todos os períodos do estudo.

Conclusão: A irradiação com o laser de Er:YAG, associado ou não a raspagem, como alternativa para o tratamento de bolsas periodontais promove benefícios microbiológicos sem contudo apresentar alterações clínicas e imunológicas significativas.

Palavras Chave: lasers; raspagem dentária; aplainamento radicular; doenças periodontais; interleucina-1; reação em cadeia da polimerase; estudo comparativo; laser de Er:YAG.

LOPES B M V. Effects of scaling and root planning with Er:YAG laser in chronic periodontitis. A controlled clinical, immune and microbiological human study. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

Background: The Er:YAG laser has recently been used for periodontal therapy. This study compared Er:YAG laser irradiation (100 mJ/pulse, 10 Hz, 12.9 J/cm²) with or without conventional scaling and root planing (SRP), versus SRP only for treatment of periodontal pockets affected with chronic periodontitis.

Methods: Twenty-one patients, with pockets from 5 to 9 mm in non-adjacent sites, were studied. In a split-mouth design, each site was randomly allocated to a treatment group: 1) SRPL - SRP and laser; 2) L - laser only; 3) SRP - only SRP; 4) C - no treatment. Plaque index (PI), gingival index (GI), bleeding on probing (BOP), and interleukin-1 β levels in crevicular fluid (IL-1 β) were evaluated at baseline, 12, 30, 90 and 180 postoperatively, while probing depth (PD), gingival recession (GR), and clinical attachment level (CAL) were evaluated at baseline, 30, 90 e 180 days after treatment. Statistical analysis was conducted ($p < 0.05$) inter and intra groups.

Results: Twelve days postoperatively, PI decreased for SRPL and SRP ($p < 0.05$); GI increased for L, SRP and C ($p < 0.05$) and BOP reduces for SRPL, L and SRP ($p < 0.05$). Thirty days after treatments, PI decreased for SRPL and SRP ($p < 0.05$), GI decreased for SRPL ($p < 0.05$) and increased for C ($p < 0.05$). BOP decreased for SRPL, L and SRP groups and data showed BOP reduction when compared the C ($p < 0.05$). Values of PD decreased in SRPL, L and SRP groups ($p < 0.05$), CAL gain showed an improvement for SRP ($p < 0.05$) and GR increased for SRPL and L ($p < 0.05$). Ninety days postoperatively, PI decreased for all treated groups ($p < 0.05$); GI reduced for SRPL and SRP ($p < 0.05$); BOP decreased for all treated groups ($p < 0.05$). Data of PD showed a reduction for SRPL, L and SRP groups ($p < 0.05$); CAL gain was significant for SRPL, L and SRP groups ($p < 0.05$); GR

values increased for SRPL and L groups ($p<0,05$). Six months after treatments, PI decreased for all treated groups ($p<0,05$); GI reduced for SRPL and SRP ($p<0,05$); BOP decreased for all treated groups ($p<0,05$). Values of PD decreased and values of NI and GR increased for SRPL, L and SRP groups ($p<0,05$). In all periods, SRPL and L groups demonstrated a significant reduction on percentage of sites with presence of bacteria ($p<0,05$), already SPR group demonstrated microbiological improvements only 30 days postoperatively ($p<0,05$). SRPL group was presented smaller prevalence of bacteria than others groups. No difference was detected for IL-1 β among groups and periods.

Conclusions: Results indicated that Er:YAG laser irradiation, with or without conventional scaling and root planning, may be used and as an adjunctive aid for treatment of periodontal pockets, and promotes microbiological benefits, however no demonstrated clinical and immunological significant changes.

Keywords: lasers; scaling dental; root planing; periodontal diseases; interleukin-1; polymerase chain reaction; comparative study; Er:YAG. laser

1 Introdução

As doenças periodontais são infecções multifatoriais iniciadas por um complexo de espécies bacterianas que interage com os tecidos e as células do hospedeiro causando a liberação de um grande conjunto de citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores, alguns dos quais levam à destruição de estruturas periodontais, incluindo os tecidos de suporte dental, o osso alveolar e o ligamento periodontal.^{62,63}

O estímulo para o início da doença é a presença de biofilmes microbianos complexos que colonizam as regiões do sulco entre a superfície dental e a margem gengival por meio de interações específicas de aderência e acúmulo decorrentes de alterações arquitetônicas no sulco (perda de inserção e formação de bolsa).⁶⁴

Os microrganismos mais frequentemente relacionados à ocorrência desta doença são *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannerella forsythia* (Tf), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella nigrescens* (Pn) e *Treponema denticola* (Td).⁴⁵ A presença de endotoxinas liberadas por estes microrganismos dentro do fluido crevicular, leva à produção e à liberação de citocinas, pelas células inflamatórias, atuando como reguladoras da resposta imune.³¹

Dentre os vários mediadores presentes neste processo, destacam-se a Interleucina 1Beta (IL-1 β), que é produzida por macrófagos e monócitos em resposta, principalmente, a endotoxinas bacterianas e está diretamente relacionada a fenômenos de reabsorção óssea^{2,31,49,65} podendo ser quantificável por meio de testes enzimáticos.^{2,22}

Clinicamente, a remoção dos agentes etiológicos locais é realizada através do procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR), por meio de instrumentos manuais, rotatórios e ultra-sônicos. Hoje, há evidência que demonstra que a raspagem e alisamento radicular (RAR) é o procedimento mais usado para tratamento da doença periodontal e que tem mostrado os melhores resultados.^{9,40} No entanto, o tratamento radicular requer habilidades clínicas e às

vezes, ainda, apresenta algumas limitações que dificultam a sua realização. Existem diversos fatores que podem limitar o sucesso da RAR convencional por tornarem restrito o acesso à bolsa periodontal com os instrumentos manuais.³⁰ Dentre eles, podemos citar a anatomia da raiz, local e posição do dente, áreas com concavidades, furcas e bolsas periodontais com profundidade iguais ou superiores a 6mm.^{36,13,60}

Alguns estudos, ainda, sugerem que a instrumentação mecânica resulta em uma mudança modesta e transitória na composição da microbiota patogênica periodontal,^{70,12,53} especialmente em sítios profundos.^{42,70}

Desde a elaboração do primeiro equipamento laser, o qual tinha como meio ativo um cristal de rubi ⁴³, vários estudos ^{6,15} têm demonstrado o efeito destes lasers na Medicina, bem como na Odontologia, principalmente em superfícies radiculares.^{11,27,28,34,57,66-69,71,72}

Recentemente, a terapia com Laser tem sido investigada para um largo campo de aplicações na Periodontia ¹⁵. Existem dois grupos de lasers utilizados em Odontologia, classificados de acordo com o mecanismo de interação com os tecidos. Os lasers de baixa intensidade promovem redução bacteriana, por meio de fotossensibilização,⁶¹ além de apresentarem propriedades analgésicas, antiinflamatórias, e de bioestimulação. Já os lasers de alta intensidade promovem uma interação fototérmica ou fotomecânica com os tecidos.^{11,27,28,34,56,66-69,71,72}

Os lasers de alta intensidade têm sido utilizados em periodontia para promover redução bacteriana em bolsas periodontais ^{11,52,3} e alguns autores têm avaliado o efeito desta irradiação em procedimentos de raspagem e alisamento radicular.^{4,34,28,27,5}

Dentre os lasers de alta intensidade, o laser de Er:YAG é o mais ressonante às superfícies mineralizadas e tem demonstrado bons resultados quando utilizados para substituir os instrumentos manuais nos procedimentos de RAR.^{3-5,13,15-17,25-28,33,34,54-58,66-69,71,72} Tal fato se deve ao alto grau de absorção da água pelo seu comprimento de onda (2,94 μm) promovendo micro-explosões por meio de absorção da água e ejeção dos tecidos (ablação explosiva), ocorrendo conseqüentemente menores danos térmicos nas superfícies irradiadas.

A partir das pesquisas que foram realizadas com este laser em tecidos mineralizados, surgiu uma nova perspectiva do uso destes lasers no tratamento periodontal como substituto de instrumentos manuais para realização de raspagem e alisamento radicular e ou como técnica coadjuvante a este procedimento.^{4,5,27,28,34,71,72}

Vários estudos têm avaliado o efeito de superfícies radiculares irradiadas com o laser de Er:YAG. Estudos in vitro têm demonstrado que apesar desta irradiação não provocar carbonização, crateras e trincas, pode promover a formação de uma superfície irregular e rugosa decorrente do processo de ablação explosiva.^{4,5,28,66-68} Outros trabalhos demonstraram bons resultados em relação a biocompatibilidade das superfícies irradiadas pelo laser de Er:YAG por meio de adesão de células in vitro,^{10,16,23,54,66-68} in situ²⁶ e in vivo.^{17,20,55,57-58,69}

Feist et al.²³ em 2003 analisaram in vitro, por meio de MEV, a adesão e a proliferação de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares irradiadas com laser de Er:YAG ou instrumento manual. Observaram, no estudo, que houve um aumento significativo da adesão e na proliferação fibroblástica em superfícies irradiadas com laser de Er:YAG, através de 2 irradiações de 10 segundos com 60mJ/10Hz (3J/cm²), comparado ao grupo que não foi irradiado com laser (controle) e ao irradiado com o mesmo laser, com 100mJ/10Hz (5J/cm²). Ainda com relação ao efeito do laser de Er:YAG, na adesão de fibroblastos, Schoop et al.⁵⁴ (2002) utilizando fibroblastos originados de ratos, verificaram que o laser de Er:YAG utilizado nos parâmetros de 100mJ/15Hz (5,98J/cm²) com angulação de 45°, com 5 irradiações de 5 segundos e intervalos de 15 segundos de duração entre as irradiações, combinado ou não à raspagem e alisamento radicular oferece melhores condições de aderência de fibroblastos que superfícies radiculares, tratadas apenas com raspagem e alisamento radicular.

Com o objetivo de analisar a profundidade de penetração do laser de Er:YAG na superfície radicular, Folwaczny et al.²⁷ (2000) analisaram, in vitro, a remoção de substâncias radiculares após irradiação com laser de Er:YAG, com energias variando de 60 a 150mJ, e frequência de 15Hz, com total de 300 pulsos. Na análise, por meio de MEV, os resultados demonstraram que a remoção das

estruturas radiculares com o Er:YAG, em baixas energias, são semelhantes às removidas com instrumentação manual, com curetas, e que a remoção de estruturas cementárias dependiam do nível de energia aplicado e da presença de cálculo.

Para analisar o efeito de diferentes angulações da ponta de saída do laser com as superfícies radiculares, Folwaczny et al.²⁵ (2001) realizaram estudo in vitro determinando a quantidade de remoção de cimento e ou dentina de superfícies irradiadas com laser de Er:YAG (10Hz), utilizando diferentes angulações da ponta de saída do feixe. Utilizaram 150 dentes extraídos, que foram divididos em três grupos, de acordo com a energia utilizada: 60mJ (Grupo A), 100mJ (grupo B), 180mJ (Grupo C). Em cada grupo, 10 amostras foram irradiadas nas angulações de 15°, 30°, 45°, 60°, e 90° entre a ponta de saída e a superfície radicular. Os resultados demonstraram no grupo A profundidade de defeitos de 41,39 ($\pm 32,55$) μm com 15° de angulação, a 181,39 ($\pm 74,42$) μm com angulação de 90°. No grupo B a profundidade dos defeitos variou de 51,96 ($\pm 26,86$) μm com 15°, a 306,64 ($\pm 62,44$) μm com 90°. No grupo C as profundidades dos defeitos variaram de 64,73 ($\pm 27,73$) μm com 15°, a 639,89 ($\pm 47,28$) μm com 90°. Os autores concluíram que, dentre os parâmetros físicos de radiação, a angulação clínica da aplicação do feixe laser de Er:YAG influencia fortemente na remoção de substâncias de superfícies radiculares e que uma angulação por volta de 30° seria a mais adequada para minimizar os danos térmicos que o laser pode provocar.

Com o objetivo de demonstrar os efeitos do laser sobre a redução de bactérias periodontopatogênicas, Ando et al.³ (1996), realizaram um estudo in vitro para observar o efeito bactericida do laser de Er:YAG sobre *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). Com uma densidade de energia de 10,6J/cm², apropriada para a remoção de cálculo, houve uma redução de colônias de *Pg* de 17,2% e para *Aa* de 26,5%. Concluíram que o laser de Er:YAG teve efeito bactericida com baixas energias, tanto para *Pg* como para *Aa*.

Entretanto na literatura ainda são escassos os estudos clínicos controlados em humanos que demonstram os efeitos da utilização do laser de Er:YAG em superfícies radiculares, como coadjuvante do tratamento periodontal não cirúrgico.^{17,20,55,57-58,69}

Schwarz et al.⁵⁵ (2001) compararam a efetividade do laser de Er:YAG à raspagem e alisamento radicular no tratamento periodontal não cirúrgico. Vinte pacientes foram tratados em um estudo de boca dividida, aleatório, comparando a irradiação de superfícies radiculares com laser de Er:YAG com 160mJ/pulso e frequência de 10Hz ($32\text{J}/\text{cm}^2$), com raspagem e aplainamento radicular com instrumentos manuais. Os parâmetros clínicos utilizados para avaliação foram índice de placa, índice gengival, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção clínica no início, 3 e 6 meses, com auxílio de sonda periodontal manual, realizados por um único examinador calibrado, que não foi o mesmo que realizou os tratamentos. Foram coletadas amostras de placa subgengival e analisadas em microscopia de campo escuro para verificar a presença de cocos, bastonetes e espiroquetas. Os resultados clínicos demonstraram que ambos os tratamentos foram efetivos e que houve maior redução de sangramento à sondagem e melhora no nível de inserção clínica no grupo tratado com laser quando comparado com o grupo controle nos 3 e 6 meses ($p<0,05$). Ambos os grupos demonstraram significativo aumento no número de cocos e bastonetes imóveis e diminuição nos bastonetes móveis e espiroquetas. Diante dos resultados, os autores concluíram que o laser de Er:YAG pode representar um tratamento alternativo para terapia periodontal não cirúrgica.

Após dois anos de acompanhamento dos pacientes do estudo anterior⁵⁵ com controle de placa supragengival realizados aos 12, 18 e 24 meses após os tratamentos, Schwarz et al.⁵⁸ demonstraram que ambos os tratamentos foram efetivos. No entanto, observaram aos 12 e 24 meses, quando se comparou o grupo tratado com laser com o grupo RAR, maior redução de sangramento à sondagem ($p<0,05$), melhora na profundidade de sondagem ($p<0,01$), maior redução da recessão gengival ($p<0,001$) e melhora no nível de inserção clínica ($p<0,001$). Ambos os grupos demonstraram significativo aumento no número de cocos e

bastonetes imóveis e diminuição nos bastonetes móveis e espiroquetas. Devido a estes resultados, os autores concluíram que o ganho de inserção clínico obtido para ambos os tratamentos laser de Er:YAG e RAR pode ser mantido por um período de 2 anos.

Os mesmos autores anteriormente citados em um outro estudo de 2003 compararam o efeito da irradiação com laser de Er:YAG combinado com a RAR com instrumentos manuais ao laser de Er:YAG utilizado isoladamente no tratamento periodontal não cirúrgico⁵⁷. Vinte pacientes com doença periodontal de avançada a moderada foram tratados em um estudo de boca dividida, aleatório, comparando a irradiação de superfícies radiculares com laser de Er:YAG (160mJ/pulso; 10Hz) associado à RAR com instrumentos manuais (grupo teste) e laser de Er:YAG (160mJ/pulso; 10Hz) (grupo controle). Os parâmetros clínicos utilizados para avaliação foram índice de placa, índice gengival, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção clínica no início, 3, 6 e 12 meses, com auxílio de sonda periodontal manual, realizados por um único examinador calibrado que não foi o mesmo que realizou os tratamentos, além de análise microbiológica. Foram coletadas amostras de placa subgengival e analisadas em microscopia de campo escuro para verificar a presença de cocos, bastonetes e espiroquetas. Os resultados clínicos demonstraram que ambos os tratamentos foram efetivos no tratamento periodontal. Uma significativa redução no índice gengival, no sangramento à sondagem, na média de redução da profundidade de sondagem e na média do ganho de inserção clínico pôde ser observada em ambos os grupos após 3, 6 e 12 meses ($p < 0,05$), porém, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados. Ambos os grupos demonstraram significativo aumento no número de cocos e bastonetes imóveis e diminuição nos bastonetes móveis e espiroquetas. De acordo com os resultados, os autores concluíram que tanto o laser de Er:YAG combinado à RAR quanto o laser de Er:YAG isoladamente, puderam demonstrar uma melhora significativa para todos os parâmetros avaliados e, ainda, que a combinação do laser de Er:YAG com a RAR não demonstrou benefícios adicionais na terapia periodontal, quando comparado ao laser de Er:YAG isoladamente.

Estudo de Crespi et al.¹⁶ (2006) demonstrou que o laser de Er:YAG pode ser usado em dentes com envolvimento periodontal em combinação com a terapia convencional, de raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais, a fim de melhorar a eficácia da instrumentação da raiz. Foi relatado que a camada superficial da superfície irradiada com o laser pareceu lisa e derretida, porém sem alterações.

Nessa mesma linha de pesquisa, outro estudo de Crespi et al.¹⁷ (2007) observou os efeitos histológicos do laser de Er:YAG quando usado para tratar superfícies de raízes com envolvimento periodontal. Os resultados do estudo demonstraram que o uso clínico do laser de Er:YAG consegue remover o biofilme e o cálculo presentes na raiz.

A maioria dos estudos in vitro e in vivo sobre o laser de Er:YAG evidenciam como uma das maiores vantagens da sua utilização uma significativa redução microbiana subgingival sem a necessidade de uma superfície lisa.^{20,69}

Os estudos clínicos controlados em humanos que avaliaram os efeitos do laser são escassos. A importância de realizar novos estudos clínicos onde sejam analisados parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos se faz necessário na tentativa de estabelecer um padrão nos parâmetros de uso do laser para tratamento das bolsas periodontais.

2 Proposição

Avaliar os efeitos do laser de Er: YAG, associado ou não à raspagem e alisamento radicular, em pacientes com doença periodontal crônica generalizada, por meio dos parâmetros clínicos periodontais, imunológicos e microbiológicos.

3 Material e Método

3.1 Cálculo da Amostra

O cálculo da amostra foi realizado baseando-se no estudo de Schwarz et al.⁵⁸ (2001), onde foi considerando um poder do teste de 95%, nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,0 mm. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ($1-\beta=0,95$) e um intervalo de confiança $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 16 pacientes para receber cada tratamento. Para o presente estudo foram selecionados 21 pacientes considerando as possíveis perdas que poderiam ocorrer. Ao final do estudo, o cálculo da amostra foi recalculado com os dados obtidos no presente estudo e foi encontrado um tamanho mínimo de amostra de 18 pacientes.

3.2 Seleção dos Pacientes

Para o presente estudo foram selecionados 21 pacientes, com idade entre 31 e 55 anos (média das idades de 43 anos), sendo 7 homens e 14 mulheres, que apresentaram diagnóstico compatível com periodontite crônica generalizada (AAP⁷, 1999).

Os critérios de inclusão foram seguidos quando os pacientes foram selecionados:

- 1) presença de pelo menos quatro sítios periodontais não vizinhos com profundidades de sondagem entre 5 e 9 mm, apresentando sangramento à sondagem;
- 2) aceitar comparecer às visitas agendadas pelo examinador;
- 3) não ter recebido tratamento periodontal nos últimos 12 meses;
- 4) não apresentar condição sistêmica que interfira no processo saúde-doença periodontal;
- 5) história negativa de antibioticoterapia, nos últimos seis meses antes do estudo;
- 6) história negativa de antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides, nos últimos três meses antecessores ao estudo ou durante o mesmo;
- 7) não estar gestante, amamentando ou usando de contraceptivos hormonais;
- 8) não ser fumante.

Os pacientes confirmaram sua aceitação para participar do estudo mediante a assinatura de um termo de consentimento, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP sob o processo nº 95/02. (Anexo 1)

3.3 Calibração do Examinador

Para calibrar o examinador do estudo, 140 sítios apresentando profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ foram selecionados aleatoriamente em 7 pacientes (20 sítios por paciente em dentes multi e uni-radiculares). O examinador mensurou a profundidade da bolsa periodontal em 2 ocasiões, em um intervalo de 48 horas. Os dados foram submetidos ao teste t de Student. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os exames e por isso o examinador foi considerado calibrado.

Um único examinador calibrado e cego para os grupos laser e RAR (*teste t de Student* – $p > 0,05$) examinou todos os parâmetros clínicos, e fez o tratamento de RAR nos devidos grupos (BMVL). A irradiação com o laser de Er:YAG foi realizada por um examinador diferente do anterior (LHT).

3.4 Delineamento clínico do estudo

3.4.1 Cronograma de Execução da Metodologia

O cronograma de execução da metodologia do presente estudo está ilustrado na Figura 1.

Seis meses antes do início do estudo, os pacientes receberam controle de placa supragengival quinzenal ou mensal por meio de instrução de higiene oral de acordo com as necessidades individuais de cada paciente. Vinte dias antes do baseline os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos e citados anteriormente. Foram selecionados quatro sítios por paciente que apresentavam sangramento à sondagem e profundidade de sondagem entre 5 e 9 mm, em sítios não vizinhos.

Após a seleção dos pacientes, foram realizadas moldagens das arcadas dentais em alginato. Essas moldagens foram vazadas em gesso-pedra e, sobre esses modelos, foram confeccionados guias de acetato (Bio-Art® Equipamentos Odontológicos, São Paulo - SP – Brasil), utilizando placas de polipropileno de 1,0mm de espessura, prensadas em aparelho a vácuo (Bio-Art® Equipamentos Odontológicos, São Paulo - SP – Brasil). O uso desses guias teve como objetivo a padronização do posicionamento da sonda computadorizada durante a realização dos exames clínicos.

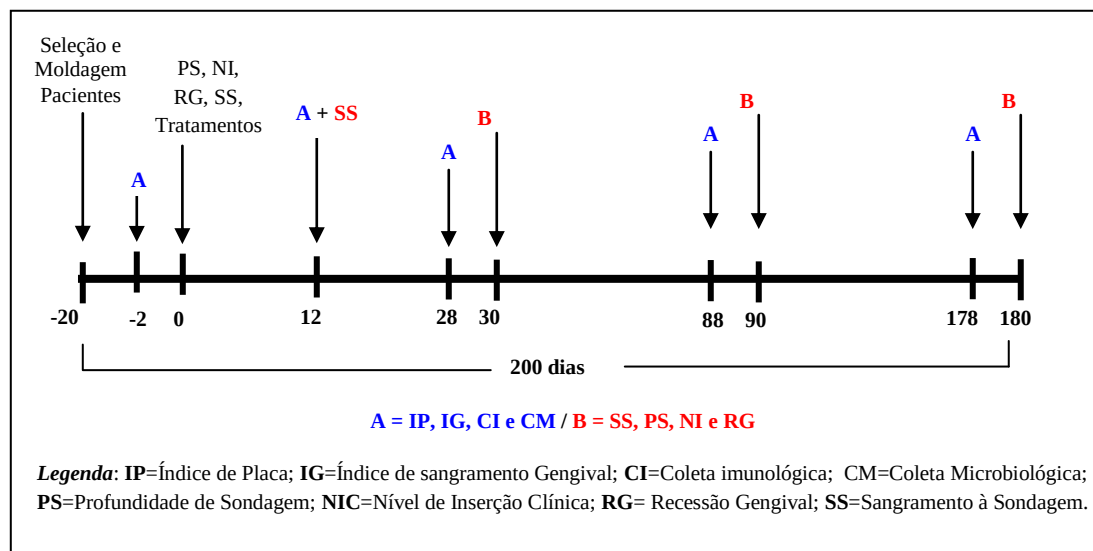


FIGURA 1- Cronograma do experimento, em dias.

Para tanto, nestes guias, o local indicado como ponto de inserção da sonda foi desgastado com brocas tronco-cônicas de haste longa para uso em baixa rotação, formando, assim, uma canaleta que permitiu a inserção da sonda sempre no mesmo lugar (Figura 2).

Os exames clínicos IP, IG, SS, PS, NI e RG foram realizados de acordo com a metodologia do estudo.

Inicialmente, foi estimado o Índice de Placa (IP) (Ainamo, Bay¹, 1975) e depois a placa supragengival foi delicadamente removida com curetas manuais específicas (Curetas Gracey, Hu- Friedy, Illinois, USA) para evitar qualquer interferência da mesma durante a realização da coleta do fluido crevicular.



FIGURA 2 – Sondagem clínica, com sonda computadorizada (Pocket Probe, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA), sendo realizada com a placa de polipropileno em posição.

3.4.2 Coleta do fluido crevicular

A coleta do fluido crevicular, para os exames microbiológicos e imunológicos, foi realizada dois dias antes dos exames clínicos para evitar interferência devido à sondagem.

O sítio a ser coletado foi isolado com roletes de algodão ou gaze estéril e a região foi seca com jato de ar. Após 30 segundos o fluido crevicular foi coletado.

Para a análise microbiológica o fluido foi coletado com cones de papel absorvente estéril (número 30); estes foram introduzidos na bolsa periodontal em direção apical (Figura 3) até sentir uma pequena resistência, permanecendo no local por 30 segundos. Após a remoção os cones foram imediatamente conservados em tubos apropriados contendo solução de PBS (Anexo 4) e congelados à uma temperatura de -20°C para posterior análise por meio de PCR.

A coleta para o exame imunológico foi realizada após um intervalo de aproximadamente 10 minutos para evitar interferência da primeira coleta (Persson, Page⁵⁰, 1990). Para a coleta foi utilizado cone de papel absorvente estéril (número 30) delicadamente introduzido no sulco gengival dos sítios selecionados, em direção apical (Figura 3), até que uma leve resistência fosse sentida, permanecendo no local por 30 segundos. Após a remoção dos cones de

papéis, estes foram colocados em tubos ependorfs estéreis, contendo 500µl de uma solução à base de PBS, associada a um coquetel de inibidores de protease, para a manutenção da viabilidade das substâncias (Anexo 4), proposto por Johnson et al.³⁵ (1997), considerado um adequado meio de transporte e armazenamento para mediadores inflamatórios. As amostras foram congeladas em freezer -70°, para posterior análise, sendo essa realizada pelo meio de teste ELISA.

Após a coleta do fluido, foi obtido o índice gengival (IG) (Ainamo, Bay¹, 1975) determinado pelo sangramento marginal após posicionar uma sonda milimetrada (PCP-UNC, Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA) no sulco gengival, com inclinação de 60 graus em relação ao dente, percorrendo o espaço do sulco de uma proximal a outra.



FIGURA 3 – Colocação do cone de papel absorvente para coleta do fluido crevicular para análises imuno e microbiológica.

3.4.3 Análise Clínica

Dois dias após a realização do IP, IG e da coleta do fluido crevicular (descritas anteriormente), os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados:

- ❖ Profundidade de sondagem (PS) – distância do fundo do sulco até a margem gengival;

- ❖ Sangramento à sondagem (SS) – determinado pela presença (+) ou ausência (-) de sangramento observado, durante 30 segundos, após a primeira inserção da sonda periodontal na bolsa;
- ❖ Nível de inserção clínica (NIC) – distância do fundo de sulco até um ponto fixo de referência determinado no guia;
- ❖ Recessão gengival (RG) – distância da margem gengival livre à linha cimento/esmalte confirmada pela fórmula $RG = NIC - PS$.

As medidas de PS, NI e RG foram realizadas pela sonda computadorizada Florida Probe (Pocket Probe, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA). O IG foi mensurado com uma sonda manual milimetrada (PCP-UNC, Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA). O IP, IG e SS foram agrupados de forma dicotômica, com relação à presença ou ausência (0/1). Os dados foram anotados em ficha específica (Anexo 2).

Os pacientes foram acompanhados por um período de 12 dias, quando foram repetidos os procedimentos de coleta de fluido crevicular e observação de IP, IG e SS. Nesse momento, o SS foi observado após o cone de papel absorvente ser removido do sítio, evitando assim, a sondagem com a sonda manual neste período. Então, os pacientes foram acompanhados por um período de 30, 90 e 180 dias, períodos estes em que foram repetidos novamente todos os exames clínicos e a coleta de fluido crevicular (semelhante ao inicial).

No decorrer do estudo, o controle da placa supragengival foi realizado semanalmente durante os primeiros 30 dias, onde eram realizados polimento dental com pasta profilática e taça de borracha e reforço das instruções de higiene oral de forma individualizada para motivação, orientação e monitoramento dos pacientes. Após os primeiros 30 dias, estes controles foram realizados mensalmente.

Após os 90 dias, os sítios controle foram tratados com RAR manual e excluídos do estudo, ou seja, aos 180 dias foram avaliados somente os sítios pertencentes aos grupos RARL, L e RAR.

3.4.4 Tratamento

Oitenta e quatro sítios foram divididos igualmente entre lados direito e esquerdo. De um lado os sítios foram tratados com o laser de Er:YAG (grupos RARL e L), enquanto os sítios contralaterais foram tratados com raspagem manual (grupo RAR) ou não tratados (grupo Controle).

Os quatro sítios selecionados de cada paciente foram randomizados e alocados usando uma tabela obtida no computador. A colocação inicial dos grupos foi aleatória e a sequência dos procedimentos foi randomizada de maneira sempre similar.

Os quatro sítios foram divididos em:

- ❖ **Grupo Raspagem + Laser (RARL)**: RAR convencional seguida de irradiação com o laser Er:YAG (KaVo Key Laser II, Kavo, Alemanha) com energia de 71 mJ/pulso (fator de transmissão de 71 %), frequência de 10Hz, fluência do pulso de 12,9 J/cm², durante 30 segundos (energia total de 21,3J) dentro da bolsa periodontal, com a ponta voltada para a raiz (por volta de 30°);
- ❖ **Grupo Laser (L)** Irradiação com o laser Er:YAG (KaVo Key Laser II, Kavo, Alemanha), com os mesmos parâmetros físicos do Grupo RARL (Figura 4). O tempo (em segundos) de exposição ao laser, para cada paciente, foi observado, anotando-se a energia total e o número de pulsos demonstrados no painel (Anexo 5);
- ❖ **Grupo Raspagem (RAR)**: RAR convencional (Figura 5).
- ❖ **Grupo Controle (C)**: Não recebeu tratamento algum.

Curetas manuais específicas (Curetas Gracey, Hu- Friedy, Illinois, USA) foram utilizadas para a RAR convencional (Grupos RARL e RAR). A raspagem com os instrumentos manuais e/ou com o laser foram realizadas até que o operador considerasse que as raízes estivessem suficientemente debridadas e aplainadas.



FIGURA 4 – Tratamento com laser de Er:YAG, nos grupos RARL e L.



FIGURA 5 – Tratamento com RAR, nos grupos RARL e RAR.

Parâmetros do equipamento laser de Er:YAG (Grupos RARL e L):

Emissor: Er:YAG (KaVo Key Laser II, Kavo, Alemanha) (Figura 6-A e B)

Comprimento de Onda: 2,94 μ m

Duração do pulso: variável entre 250 e 500 μ s

Laser pulsado: focalizado

Forma de aplicação: laser sem contato – varredura (0,05mm)

Peça de mão: 2056 (574 2571)

Dimensões da fibra: 1,1mm x 0,5mm (retangular) / Área de saída do feixe: 0,55mm²

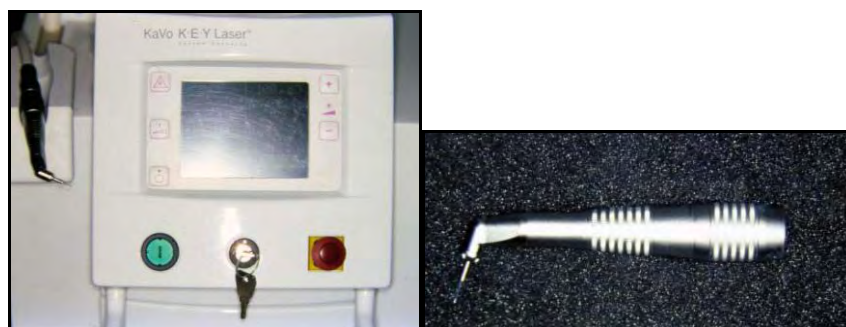
Fator de transmissão: 0,71 (dado pelo fabricante)

Energia do pulso: 100 mJ (Painel) – 71 mJ (Transmitida)

Fluência do pulso: 12,9 J/cm²

Frequência: 10 Hz

Sistema de refrigeração: água



A

B

FIGURA 6 - A - Laser de Er:YAG com comprimento de onda de 2,94 μ m.

B - Peça de mão 2056 utilizada no laser.

Todas as normas de biossegurança exigidas para utilização de laser classe IV foram seguidas, como: uso de óculos de proteção específico pelo paciente e operador; alerta de uso do equipamento na porta da sala operatória e acesso restrito na mesma; sucção de alta potência para eliminar a pluma formada durante a irradiação e ausência de substâncias inflamáveis próximas ao laser.

Após a realização de anestesia terminal infiltrativa a irradiação nos sítios dos grupos RARL e L foi realizada com a fibra óptica, sob refrigeração de água, posicionada até a base da bolsa periodontal com a saída do feixe voltada para a superfície radicular em ângulo aproximado de 30°, sem contato, com movimento de varredura no sentidoápico-oclusal. Este procedimento foi realizado no Grupo RARL, durante 30 segundos, imediatamente ao término do procedimento de RAR convencional; e no Grupo L até o operador considerasse a raiz adequada (tempo de irradiação variou de 180 a 240 segundos por sítio (média de 204 segundos)).

3.5 Delineamento laboratorial do estudo

3.5.1 Análise Imunológica

Preparo das amostras e Teste de ELISA

As amostras do fluido coletado foram descongeladas, agitadas em vortex e centrifugadas por 15 segundos em máxima rotação.

Um kit enzimático para imunoenensaio (Cayman Chemical Company, Ann Arbor/MI, USA) específico foi utilizado para medir a quantidade de IL-1 β presente nas amostras de fluido crevicular. A concentração da citocina nas amostras é diretamente proporcional à intensidade de coloração (absorbância) resultante da aplicação do reagente Ellman's. O teste foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante.

Os padrões foram obtidos a partir de oito diluições seriadas formadas por uma solução de interleucina que apresentou concentração inicial de 5ng/ml. Antes do preparo da placa, foram adicionados 25 μ l de soro não específico de rato em todas as amostras e também nos padrões. Inicialmente a placa foi lavada com tampão de lavagem sendo colocados nas duas primeiras fileiras 100 μ l dos padrões (em duplicata) e nas fileiras seguintes 100 μ l das amostras, sendo que, foram utilizados três orifícios por amostra (um orifício com amostra concentrada e dois orifícios com amostras diluídas, na diluição de 1:5). Foram, então, adicionados 100 μ l do conjugado (acetilcolinesterase), em todos os orifícios da placa (exceto no branco), e a mesma foi coberta com filme plástico e incubada por 18 horas a 4°C.

Ao final do período de incubação a solução presente nos orifícios foi desprezada e a placa lavada cinco vezes com o tampão de lavagem. Em seguida, 200 μ l do reagente Ellman's foram dispensados nos orifícios e a placa foi coberta e mantida em ambiente escuro por um período total de 60 minutos, neste período foram realizadas as leituras (nos tempos de 15, 30 e 60 minutos) no espectrofotômetro com filtro de 415nm (Multiskar Ascent – Labsystems Uniscience, Vantaa/Finlândia).

A absorbância foi convertida na concentração de IL-1 β por amostra, de acordo com as curvas padrões, em cada tempo, e os resultados finais foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) de concentração de IL-1 β presente no fluido crevicular.

3.5.2 Análise Microbiológica

Para análise microbiológica foi utilizada a reação de polimerase em cadeia (PCR), pela qual se identificou a presença das seguintes bactérias: *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella nigrescens* (Pn) e *Tannerella forsythia* (Tf).

Essa técnica baseia-se em reações enzimáticas cíclicas de desnaturação pelo calor, hibridização dos oligonucleotídeos e síntese enzimática de DNA desejado, permitindo a identificação de sequências de genes específicos, tais como genes de espécies bacterianas.

Seleção e síntese dos oligonucleotídeos

Os pares de oligonucleotídeos (5' – 3'), ou seja, os primers específicos para cada bactéria foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo – SP. As seqüências utilizadas para as bactérias estão descritas na Tabela 1 e foram baseadas no estudo de Ashimoto et al.⁸ (1996).

Preparo das amostras e reação de PCR

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e agitadas em vortex por um minuto. Em seguida, foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi colocado em um novo tubo contendo 100µL de TE e a extração do DNA bacteriano foi realizado com fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1), seguido da precipitação com sal/etanol.

Inicialmente a presença de bactérias foi confirmada através de uma reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (MyCyclerTM thermal cycler - BioRad) utilizando um oligonucleotídeo inespecífico:

PC3mod = 5' GGACTAHAGGGTATCTAAT 3'

POmod= 5' AGAGTTTGATCMTGG 3'

As amostras positivas para a reação inespecífica foram, então, processadas em reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos bacterianos para as espécies avaliadas

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	593 pb
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'	557 pb
<i>Tannerella forsythia</i>	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	641 pb
<i>Prevotella intermedia</i>	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TAC ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'	575 pb
<i>Prevotella nigrescens</i>	5' TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3' 5' ATG GCG AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3'	1100 pb

Os oligonucleotídeos foram dissolvidos em uma solução estéril contendo Tris HCl (10mM – pH 7,6) e EDTA (1mM – pH 8,0) em volume calculado para concentração final de 25µM.

As reações de PCR foram realizadas em tubos específicos e otimizadas para cada oligonucleotídeo específico utilizado. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, contendo aproximadamente 1µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen Tech-LineSM), 100 µM de dntps (Invitrogen Tech-LineSM) e, para cada par de oligonucleotídeo foi utilizado uma quantidade específica de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-LineSM), conforme descrito na Tabela 2. As condições das reações para cada primer utilizado estão descritos na Tabela 3.

A amplificação dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, preparados com agarose ultra pura (Invitrogen Tech-LineSM) e solução de TBE (Tris 1M; Acido bórico 0,9M; EDTA 0,5M) e brometo de etídio (0.5 µg/mL - Invitrogen Tech-LineSM) para a visualização do fragmento de DNA.

Tabela 2 – Quantidade de Taq DNA polimerase utilizada para cada par de oligonucleotídeo.

Primer	Condição da reação
<i>Inespecífico</i>	1U
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1U
<i>Tannerella forsythia</i>	1,25U
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1U
<i>Prevotella intermedia</i>	2U
<i>Prevotella nigrescens</i>	1,25U

Tabela 3 – Condições das reações de PCR.

Primer	Condição da reação
<i>Inespecífico</i>	95 °C, 5minutos; 96 °C, 30 seg, 45 °C, 30seg, 72 °C, 30seg (30 ciclos)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythia</i>	95 °C, 2minutos; 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1minuto, 72 °C, 1minuto (36 ciclos)
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>Prevotella intermedia</i>	95 °C, 2minutos; 94 °C, 30 seg, 55 °C, 1minuto, 72 °C, 1minuto (36 ciclos)
<i>Prevotella nigrescens</i>	95 °C, 2minutos; 95 °C, 30 seg, 65 °C, 1minuto, 72 °C, 1minuto (36 ciclos)

A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal (Cuba Horizon 11.14 – Life Technologies), foram utilizados 12µL do produto de PCR e 2 µL de

tampão de amostra (Invitrogen Tech-LineSM). As corridas foram submetidas a uma corrente elétrica contínua de 100V por 90 minutos. Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis (Image Quant 100 – GE Healthcare). As fotografias obtidas foram armazenadas para análise da presença das bactérias investigadas.

Em todas as reações havia um controle positivo para a bactéria específica sendo que, o DNA específico foi obtido a partir de cultura pura da espécie de interesse. (controles cedidos pelo *Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet* do laboratório de imunologia de Bauru - USP e pelo *Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves* do laboratório de microbiologia de Piracicaba – UNICAMP)

3.6 Planejamento Estatístico

A análise estatística das variáveis quantitativas (PS, NI, RG e níveis de IL-1 β) em estudo foi realizada em duas partes:

- Verificação de diferença estatisticamente significativa entre os momentos de avaliação clínica (inicial, 12 dias (somente para níveis de IL-1 β) 30, 90 e 180 dias), para os tratamentos de RARL, L, RAR e para o grupo controle somente até 90 dias.
- Verificação de diferença estatisticamente significativa entre os tipos de tratamentos, para cada um dos momentos de avaliação (0, 12, 30, 90 e 180 dias – exceto o grupo C).

Para se tomar a decisão de quais métodos estatísticos seriam apropriados à análise dos dados obtidos, foi verificado, aplicando-se o Teste de Aderência de Lilliefors, se os dados das variáveis quantitativas (“Profundidade de Sondagem“, “Nível de Inserção Clínica”, “Recessão Gengival” e “Níveis de IL-1 β ”) se ajustavam à distribuição normal de probabilidades.

Os dados das variáveis que satisfizeram essa condição foram submetidos a testes estatísticos paramétricos e os demais foram analisados utilizando-se testes estatísticos não-paramétricos análogos a esses paramétricos.

Na primeira parte da análise estatística (comparação entre os momentos de avaliação clínica, para cada um dos tratamentos), bem como da segunda parte

(comparação entre os diferentes tratamentos, em cada momento da avaliação) os dados das variáveis que apresentaram distribuição normal foram avaliados aplicando-se o teste de Análise de Variância de Medidas Repetidas, que é apropriado para esse tipo de delineamento de pesquisa, em que as medidas são realizadas em amostras constituídas pelos mesmos elementos, em diferentes momentos de observação.

Os dados das variáveis que não apresentaram distribuição normal foram analisados aplicando-se o teste de Friedman, teste não-paramétrico análogo ao teste paramétrico Análise de Variância de Medidas Repetidas.

Quando foram encontrados resultados estatisticamente significantes em qualquer um desses testes (Análise de Variância de Medidas Repetidas ou teste de Friedman), os dados foram submetidos a testes de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer – teste paramétrico ou Teste de Dunn – teste não-paramétrico,) que fazem a comparação das amostras duas a duas, para verificar quais delas diferem entre si.

A análise estatística das variáveis categóricas (IP, IG, SS e prevalência das bactérias *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Pn* e *Tf*) em estudo, também foi realizada em duas partes verificando diferenças entre os períodos para cada grupo e diferenças entre os grupos para cada período estudado.

Os dados obtidos para as variáveis categóricas dicotômicas (“Sangramento à Sondagem”, “Índice de Placa”, “Índice Gengival” e “Presença de Bactérias”) foram submetidos ao Teste de Cochran, teste não-paramétrico apropriado à comparação entre proporções observadas em três ou mais amostras correlatas (constituídas pelos mesmos elementos), cujos dados obtidos são apresentados dicotomizados: Categoria da variável = 1 (“presente”) / Categoria da variável = 0 (“ausente”).

Quando foi encontrado resultado estatisticamente significativo para esse teste, as amostras foram comparadas, duas a duas, utilizando-se o Teste Exato de MacNemar, que é um teste não-paramétrico apropriado à comparação de duas proporções correlatas.

Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5%, portanto, foram considerados estatisticamente significantes todos os resultados que apresentaram valor de $p < 0,05$.

Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística, utilizando-se softwares (*BioEstat 4.0* (BioEstat Software, Belém/PA, BRASIL) e *Graph Pad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego/CA, USA)) adequados e específicos para os diferentes testes, nas diferentes análises estatísticas realizadas.

4 Capítulos

4.1 Capítulo 1 – Análise prospectiva

Short-term clinical and immunological effects of scaling and root planing with Er:YAG laser in chronic periodontitis.

❖ *Artigo aceito pelo Journal of Periodontology em 21/01/2008 (carta de aceitação Anexo 3).*

Short-term clinical and immunological effects of scaling and root planing with Er:YAG laser in chronic periodontitis

Summary contents: Er:YAG laser irradiation may be an alternative treatment for periodontal disease.

Beatriz M. V. Lopes, PhD Student in Periodontology*;

R. Adriana C. Marcantonio, PhD in Periodontology*;

Gloria M. A. Thompson, PhD in Microbiology and Immunology*;

Lucia H. M. Neves, PhD in Biostatistics.[†];

Leticia H. Theodoro, PhD in Periodontology[‡]

*UNESP - São Paulo State University; Department of Periodontology, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil.

[†]UNESP - São Paulo State University, Department of Biostatistics, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil.

[‡]Department of Periodontology, Barretos Dental School, Education Foundation of Barretos - FEB, Barretos, SP, Brazil.

This study is attributed to the UNESP - São Paulo State University, Department of Periodontology, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil.

Correspondence author

Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

UNESP - São Paulo State University, Department of Periodontology, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil - Araraquara Dental School - UNESP
Rua Humaitá, 1680. Araraquara, SP, Brazil. 14801-903.

Phone: +55 (16) 3301-6369 / Fax: +55 (16) 3301-6369 (*may be published*)

e-mail: adriana@foar.unesp.br ; letheodoro@uol.com.br (*may be published*)

Sources of support

CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brasilia, DF, Brazil).

There are 5 figures and 3 tables in this manuscript.

Running title: Er:YAG laser for periodontal therapy.

ABSTRACT

Background: The erbium-doped: yttrium, aluminum and garnet (Er:YAG) has recently been used for periodontal therapy. This study compared Er:YAG laser irradiation (100 mJ/pulse, 10 Hz, 12.9 J/cm²) with or without conventional scaling and root planing (SRP), versus SRP only for treatment of periodontal pockets affected with chronic periodontitis.

Methods: Twenty-one patients, with pockets from 5 to 9 mm in non-adjacent sites, were studied. In a split-mouth design, each site was randomly allocated to a treatment group: 1) SRPL - SRP and laser; 2) L - laser only; 3) SRP - only SRP; 4) C - no treatment. Plaque index (PI), gingival index (GI), bleeding on probing (BOP), and interleukin-1 β levels in crevicular fluid (IL-1 β) were evaluated at baseline, 12 and 30 postoperatively, while probing depth (PD), gingival recession (GR), and clinical attachment level (CAL) were evaluated at baseline, and 30 days after treatment. Statistical analysis was conducted ($p < 0.05$).

Results: Twelve days postoperatively, PI decreased for SRPL and SRP ($p < 0.05$); GI increased for L, SRP and C, but decreased for SRPL ($p < 0.05$) and BOP reduced for SRPL, L and SRP ($p < 0.01$). Thirty days postoperatively BOP decreased for treated groups and was lower than C ($p < 0.05$). Values of PD decreased in treated groups ($p < 0.001$), and differences were found between SRPL and C ($p < 0.05$). CAL gain was significant only for SRP ($p < 0.01$). GR increases for SRPL and L ($p < 0.05$). No difference was detected for IL-1 β among groups and periods.

Conclusions: Results indicated that Er:YAG laser irradiation, may be used and as an adjunctive aid for treatment of periodontal pockets, although a significant CAL gain was observed with SRP alone and not with the laser groups.

Key Words: Lasers/Er:YAG; scaling and root planing; periodontitis; clinical trial(s); cytokine.

INTRODUCTION

Accumulation of a microbial biofilm on dental surfaces adjacent to the gingival margin is usually associated with the pathogenesis of periodontal disease. The presence of endotoxins released by microorganisms in crevicular fluid leads to the production and release of cytokines, among which interleukin 1 beta (IL-1 β) should be particularly noted. It is produced as a response to bacterial endotoxins, and is directly related to bone resorption¹⁻⁴ and may be quantified by enzymatic assays.^{3,4} The primary objective in treating periodontal disease is to disorganize subgingival biofilm and completely remove bacterial deposits from root surfaces in an effort to prevent the progression of the disease.^{5,6}

Clinically, there is evidence that scaling and root planing (SRP) with hand instruments provides the best results for treatment of periodontal disease.^{7,8} However, several anatomic variations may limit the success of conventional SRP, such as root concavities, dental crowding, and deep pockets, which may hinder the access of hand instruments into the periodontal pocket.^{9,10}

Laser therapy has recently been investigated for periodontal use.¹¹ High intensity lasers have been used to promote bacterial reduction in periodontal pockets¹²⁻¹⁴ and for scaling and root planing.¹⁵⁻¹⁸

A variety of lasers is suitable for use in Dentistry, including the CO₂,^{11,16} Nd:YAG,^{11-13,16} Diode,¹¹ and Er:YAG,^{11,14-18} lasers which have been reported as the more promising for periodontal treatment. The Er:YAG laser has a wavelength of 2.94 μ m, with high water absorption capacity and thereby involves less thermal risk for mineralized surfaces. Therefore, it has been used to irradiate root surfaces, mostly when used with coolant water.¹⁴⁻²⁰ In order to improve effectiveness and efficacy of the removal of the subgingival biofilm, Er:YAG laser therapy has been recommended as an alternative to conventional scaling treatment.²¹ The biocompatibility of irradiated surfaces has been observed during in vitro cell adhesion studies,²²⁻²⁶ in vivo²⁷ and in situ²⁸ using Er:YAG laser.

However, few controlled clinical studies, developed in humans, have evaluated the effects of Er:YAG laser on root surfaces for non-surgical periodontal therapy.²⁹⁻³² In addition, to date, immunologic analyses of inflammatory mediator levels of irradiated sites with Er:YAG laser continue to be lacking in literature. Therefore the objective of this controlled clinical study in humans was to evaluate the earlier effects on periodontal tissue of root surfaces irradiated with Er:YAG laser, with or without conventional scaling and root planing, by using clinical periodontal parameters and analysis of IL-1 β ; as an inflammatory mediator.

MATERIALS AND METHODS

Patient Population

For this study, twenty-one patients, 7 men and 14 women with chronic generalized periodontitis³³ (four sites with bleeding on probing and probing depth from 5 to 9 mm), aged between 31 to 55 years (mean of age 43), were selected. Exclusion criteria were: 1) periodontal treatment within the last 12 months; 2) systemic disease that could influence the outcome of periodontal therapy; 3) use of antibiotics within the last six months; 4) use of anti-inflammatory drugs within the last three months; 5) pregnancy or use of hormone contraceptives; and 6) a smoking habit. These patients sought treatment at the Periodontal Clinic of the Araraquara Dental School between 2003 and 2005 in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. All were oriented and signed an informed consent agreement approved by the Committee of Ethics in Research of the Araraquara Dental School, UNESP for this study.

Study Design

For each patient, four non-adjacent sites with bleeding on probing and probing depth from 5 to 9 mm were selected (total = 84 sites). Alginate molds of dental arches were made to prepare acetate stents for standardizing computerized probe*

* Florida Probe[®] Co., Gainesville, FL, USA

positions and manual probes during examinations. One blinded examiner (BMVL), who was subjected to test and approval, determined clinical parameters and also carried out SRP. Another trained operator (LHT) performed laser irradiation.

Examiner Calibration

One hundred and forty sites with probing depths ≥ 5 mm were randomly selected in 7 patients (20 sites per patient with a single or multi-rooted tooth considered for calibration). The examiner evaluated the pocket depths on 2 occasions, 48 hours apart, and data was submitted to Student's t-test. Calibration was approved because evaluation differences between the two periods was not statistically significant ($p > 0.05$).

Control of Oral Hygiene

Six months prior to treatment, patients participated in a weekly program of supragingival plaque control with oral hygiene instructions professionally administered according to individual needs. A supra-gingival tooth cleaning was performed at baseline and weekly until 30 days post operatively.

Treatment groups

Eight-four sites were divided equally between right and left sides. On one side, sites were treated by Er:YAG laser (SRPL and L groups), whereas the sites of contralateral side were treated by only SRP or no-treated (SRP and C groups). The four sites of each patient were randomly allocated by use a computer-generated table to the groups. The sequence of the procedures was randomized in a similar manner. For better standardization site 1 was the first choice, followed by 2, 3, or 4 respectively. The sites were allocated to a treatment group: 1) *SRPL*: conventional SRP followed by Er:YAG laser irradiation for 30 seconds; 2) *L*: Er:YAG laser irradiation alone until the operator considered that the root surfaces were appropriately debrided; 3) *SRP*: conventional scaling and root planing and 4)

C: control i.e. without treatment. Specific manual curettes^{||} were utilized for conventional SRP. Scaling with hand instruments and/or laser alone were performed until the operator considered that the root surfaces were appropriately debrided and planed.

Laser Irradiation

An Er:YAG[¶] laser was selected with a wavelength of 2.94 μm , 250-500 μs exposure duration, repetition rate of 10 Hz using a handpiece with a special application tip (1.1 mm X 0.5 mm), in the following parameters: energy at 100 mJ/pulse as indicated on the display, resulting in transmitted energy of 71 mJ/pulse at the tip of the handpiece (2056, 574 2571; transmission factor of 71%) and fluency of 12.9 J/cm²/pulse.²⁴

After infiltrative terminal anesthesia, sites of groups SRPL and L were irradiated with coolant water, according to the manufacturer's instructions. The laser optical fiber tip was conducted in apico-coronal movements, with 30° inclination angle with respect to the root surface (Fig.1). Irradiation for SRPL group was performed immediately after scaling, for 30 seconds per site. For L group, the irradiation time ranged of 180 to 240 seconds (mean of 204 seconds) until the operator felt that the root surfaces were properly scaled and planed.

Clinical Analysis

Clinical parameters evaluated at baseline and 30 days post-operatively were: plaque index (PI)³⁴, gingival index (GI)³⁴, probing depth (PD), bleeding on probing (BOP), clinical attachment level (CAL) and gingival recession (GR). BOP was determined by presence (+) or absence (-) of bleeding during 30 seconds after first probe insertion in the pocket. PI and GI were measured by manual probing,[#] while PD, GR, and CAL were measured with a computerized probe. Two days before examination, crevicular fluid was collected for immunological analysis, and PI and GI exams were realized. This was made to determined in an

^{||} Gracey Curettes , Hu-Friedy® Co., Chicago, IL, USA.

[¶] KEY Laser II, 1242 with handpiece P2056, KaVo Dental GmbH, Biberach, Germany

[#] PCP-UNC 15, Hu- Friedy Co., Chicago, IL, USA

effort to minimize confusion between probing on bleeding (BOP, bleeding 30 seconds after probe insertion in the pocket); and marginal bleeding (GI, gentle probing of the orifice of gingival crevice).³⁴ Twelve days postoperatively the crevicular fluid collection and PI, GI, and BOP were realized. The BOP was observed after absorbent paper points were removed into the sites to effort probing with manual probe in this period. After 30 days, all examinations as baseline were repeated.

Sample Collection and Immunological Analysis

The sample collections for immunological analysis were realized in the periods of 12 and 30 days after treatment. After the removal of supragingival plaque, teeth were isolated with cotton rolls. For crevicular fluid collection (analysis of the presence and quantification of interleukin-1 β), sterile absorbent paper points (number 30) were carefully inserted into the sites for 30 seconds. The points were placed in sterile Eppendorf tubes containing 500 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) solution associated with a cocktail of protease inhibitors in order to maintain substance viability.³⁵ Samples were frozen at -70 $^{\circ}$ C for subsequent analysis. The IL-1 β concentrations were determined with the IL-1 β ELISA test (an enzyme kit for specific immunoassay^{**}). The manufacturer's instructions were adhered to and each plate was checked before use to ensure that the calibration curve was measured the IL-1 β standards within the sated limits of the assay. The calibration curve was plotted by regression analysis and the optical density of each sample used to estimate the concentration of IL-1 β in pg/ml. The optical densities were measured in a spectrophotometer at 415 nm. The total amount of crevicular IL-1 β (pg/site) from the samples was further calculated from the spectrophotometer data measurements.

^{**} Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA.

Statistical Analysis

Data was submitted to statistical analysis with appropriate softwares.^{††‡‡} The sample size was calculated considering a 5% alpha error, with 1.0 mm clinical significant difference between groups, and a standard deviation of 0.6 mm. Therefore, with a sample size of 21 patients, the power of the study was calculated to be 95%. Inter and intragroup analyses were conducted for all variables in the different periods. Quantitative variables (PD, CAL, GR and IL-1 β) were submitted to a normality test (Lilliefors's test). The values of PD and CAL were normally distributed, and were analyzed using the analysis of variance for repeated measurements (ANOVA) test. In the sequence, it was realized the multiple comparison Tukey-Kramer test for comparison among groups in the same period. The student paired t-test was used for comparison within each group to compare baseline versus postoperative treatment periods. GR and IL-1 β values were non-normally distributed, and were analyzed using the Friedman test. In the sequence, it was realized the multiple comparison Dunn test for comparison among groups in the same period. The Wilcoxon test was used for comparison within each group to compare baseline versus postoperative treatment periods. Categorical variables, PI, GI and BOP were submitted to the Cochran test followed by the multiple comparison McNemar test.

RESULTS

Of the 84 sites in 21 patients, 48 (57.1%) were teeth with one or two roots and 36 (42.9%) were multi-rooted teeth. Of these sites, 82 (97.6%) were in inter-proximal sites and 2 (2.4%) were on buccal and lingual sites. Postoperative complications, abscesses or infections were not observed throughout the study period. Distribution of proportions obtained for variables plaque index (PI), gingival index (GI) and bleeding on probing (BOP) for the treated groups at the determined periods are demonstrated in figures 2 to 4.

^{††} Graph Pad Prism 5.0, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA

^{‡‡} BioEstat 4.0, BioEstat Software, Belém, PA, Brazil.

In a comparison between baseline and 12 days after treatment, PI decreased for SRPL (43.86% to 9.52%) and SRP (52.38% to 28.56%) groups ($p<0.05$). After 30 days PI decreased for SRPL (14.29%) and for SRP (33.33%) when compared with baseline ($p<0.05$). There no statistically significance difference in PI between baseline and 12 days; and baseline and 30 days for L and C groups. Intergroup comparison demonstrated that IP was higher in L, SRP and C groups than SRLP group, 12 days postoperatively ($p<0.05$). Thirty days postoperatively, there was statistically significant difference in IP when compared SRPL with SRP groups ($p<0.05$) and SRPL with C group ($p<0.05$; Fig.2).

In a comparison between baseline and 12 days after treatment, GI increased for L (33.3% to 52.4%), SRP (42.7% to 66.7%) and C (47.6% to 66.7%) groups ($p<0.05$). Thirty days postoperatively, GI decreased for SRPL (23.8%; $p<0.05$). On the other hand, GI increased for C (71.4%; $p<0.05$). At baseline, the GI was higher in SRPL (52.4%) than L (33.3%) group ($p<0.05$). The SRPL (38.1%) group demonstrated a significant difference in reduction of GI in relation to SRP and C groups at 12 days postoperatively (66.7%; 66.7%; $p<0.05$). The SRPL (23.8%), group demonstrated a significant difference in reduction of GI in relation to SRP, L and C groups (42.9%; 47.6%; 71.4%; $p<0.05$) 30 days after treatment. There were significant differences in reduction of GI in L and SRP groups when compared to the control group at 30 days postoperatively.

At baseline examination in 100% of the surfaces, in all groups the BOP was observed. Subsequent to treatments, a marked and gradual improvement of the bleeding scores was observed at 12 days and 30 days after treatments in SRPL (61.9%; 38.1%; $p<0.05$), L (76.2%; 52.4%; $p<0.05$) and SRP (66.7%; 47.6%; $p<0.05$) treated groups. The control group did not show significant reduction in BOP when compared to the baseline at 12 and 30 days after examination (90.5%). In comparison intergroups SRPL (61.9%), and SRP (66.7%) treatments presented significant reduction in BOP ($p<0.01$) when compared to the control group (90.5%), however with no difference among treated groups, 12 days after treatment ($p>0.05$). In 30 days, SRPL (38.1%), L (52.4%) and SRP (47.6%) treated groups presented statistically significant differences in BOP reduction

($p < 0.01$; Fig.4) when compared to the control group (90.5%), however with no difference among treated groups.

Data of other clinical variables - probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), and gingival recession (GR) - may be seen in Tables 1 to 3. The SRPL (4.8 ± 1.3 mm) group showed a significant difference in reduction of PD ($p < 0.01$) in relation to group C (6.3 ± 0.9 mm) at 30 days after treatment. Probing depth mean values were reduced ($p < 0.001$) within the three test groups (Table 1) after treatment. Results demonstrated significant improvement in average of CAL gain within only SRP (7.2 ± 1.3 mm to 6.7 ± 1.3 mm) group ($p < 0.01$; Table 2). There was significant increase in GR ($p < 0.05$; Table 3) for laser treated groups SRPL (0.2 ± 0.7 mm to 1.1 ± 1.1 mm) and L (0.2 ± 0.4 mm to 0.9 ± 0.9 mm).

Thirty days after treatment, there were no significant differences ($p > 0.05$) among SRPL, L, SRP and C groups in clinical attachment level gain and gingival recession

Levels of inflammatory cytokine IL-1 β were monitored and revealed no significant differences ($p > 0.05$) intra and inter groups at 12 and 30 days after treatment (Fig 5). Initial values of IL-1 β decreased in SRPL (509.6 pg/ml) group in 12 and 30 days (425.1 pg/ml; 300.2 pg/ml) after treatment.

Values of IL-1 β in L group increased at 12 days (363.0 pg/ml to 488.1 pg/ml) and decreased at 30 days (331.2 pg/ml). The SRP group showed decreased of IL-1 β values at 12 days (507.3 pg/ml to 411.6 pg/ml) and 30 days after treatment (273.1 pg/ml). On the other hand, the values of IL-1 β increased at 12 days (320.9 pg/ml to 408.7 pg/ml) and decreased at 30 days (291.6 pg/ml).

DISCUSSION

This study evaluated the initial effects of Er:YAG laser irradiation with or without conventional scaling and root planing (SRP), when compared to conventional SRP only for treatment of periodontal pockets.

Twelve days after treatment, it was observed little clinical change for the categorical variables of PI, GI and BOP. Decreased PI was noted for SRPL and

SRP when compared to baseline, 12 at 30 days and there was difference in PI between SRPL and the others groups at 12 days. Thirty days postoperatively IP was higher in SRP and C groups than SRPL. After 12 and 30 days, groups of SRPL, L and SRP presented significant reduction of BOP when compared to baseline ($p<0.01$), but no significant differences were found among the three groups. Re-evaluation was made 12 days after treatment of the categorical variables PI, GI, BOP and IL-1 β in an effort to verify possible immediate effects of SRPL and L treatments when compared to SRP and no treatment (control). It is demonstrated in others studies that Er:YAG laser can produces surface irregularities,^{15-20, 24} but no more accumulations of biofilm was shown in this study. So, the Er:YAG laser irradiation associate with the SRP can be more effectiveness in remove irritants of root surface.

Thirty days after treatment, all test groups (SRPL, L and SRP), demonstrated statistically significant reduction of BOP ($p<0.01$) when compared to group C (no treated). SRPL group demonstrated significant reduction of GI ($p<0.05$), as well as PD ($p<0.01$), when compared to control group. On the other hand previous clinical studies²⁹⁻³¹ reported there were no statistically significant differences reduction of marginal bleeding among Er:YAG laser and SRP alone or in combination.

Further changes were found 30 days after treatment in comparison to baseline, such as mean CAL gain is improved significantly for the SRP group ($p<0.01$), but GR is significantly increased for the laser treated groups (SRPL and L).

Evaluations of reduction of mean PD and reduction of BOP presented significant clinical and statistical improvements within the three treated groups from baseline up to 30 days postoperative. In previous clinical studies,²⁹⁻³¹ significant reduction of BOP occurred in comparison to baseline, not only for sites in the laser groups, but also for those treated with SRP alone as this study.

Few studies in humans evaluated Er:YAG laser irradiation on root surfaces combined with conventional SRP.³¹ Schwarz et al²⁹ compared Er:YAG laser irradiation with 160 mJ/pulse, 10 Hz with SRP alone in 20 patients. Clinical analyses were made before treatment and at 3 and 6 months afterwards. After 3

months average CAL decreased from 6.3 ± 1.1 mm to 5.1 ± 1.0 mm for laser and 6.5 ± 1.0 mm to 5.6 ± 1.1 mm for SRP treatments. Mean PD was reduced from 4.9 ± 0.7 mm to 3.5 ± 0.6 mm for laser and from 5.0 ± 0.6 mm to 3.8 ± 0.7 mm for SRP treatments. Results were statistically significant when compared to baseline, for intra as inter groups. These trends were also observed by Schwarz et al³⁰ after a 12-months healing period when the patient was kept under control of oral hygiene. These findings suggest that within these periods, satisfactory results might be achieved, in so far as the patients were kept under rigorous control of oral hygiene.

In the study by Schwarz et al.,²⁹ initial averages of PD, independent of the group, were 5.0 mm and in this study averages ranged from 6.3 to 6.9 mm (Table 1). In their study, evaluations were made at 3 and 6 months after treatment. After 3 months, mean CAL decrease 1.4 mm for the SRPL and L sites. Mean PD reduction was 2.2 mm for SRPL and 1.5 mm for L sites. Significant PD reductions ($p < 0.05$) for both groups were observed after 3 months, but no statistically significant difference were found between them.

In the present study, no statistically significant difference in CAL was found in laser groups (SRPL and L) when compared to the baseline, probably due to a short evaluation period. However, the SRP (SRP only) group presented more CAL gain, when compared to the baseline, but there was no difference found among the all groups. On the other hand, recent short-term clinical study³⁶ demonstrated at 1 month postoperatively that PD reduction and CAL gain was significantly greater for laser than ultrasonic sites treated.

In the present study PD reductions were found after 30 days in SRPL (1.68 mm), L (1.12 mm) and SRP (1.67 mm) groups. The PD reduction would be associated with a CAL gain or GR increase. In SRPL and L groups there was a significant GR increase (0.81 mm and 0.67 mm) and in SRP there was a significant CAL gain (0.48 mm).

Discrepancies between the studies, also may be explained by initial differences of PD. Clinical studies have demonstrated that decreased PD and gain of CAL after non surgical as surgical periodontal treatments, depend upon initial PD, with a

greater probability of success in PD reduction for deeper pockets, independent of treatment type.^{37, 38}

Some previous studies^{29, 31} have shown increases in GR for groups using laser, however differences with baseline were not significant. In contrast to these findings, the present study showed statistically significant increases in GR from baseline to 30 days for both groups using Er:YAG laser ($p < 0.05$), although there was no difference found between them at 30 days after treatment (Table 3). On the contrary, PD reductions were found after 30 days in laser groups. These results may be related to greater gingival tissue contraction and/or decrease of edema after treatments. Such results may be due to the longer time necessary for instrumentation in both laser groups. In SRPL group the time of laser irradiation were 30 seconds plus time of manual instrumentation. In L group, the irradiation time ranged of 180 to 240 seconds. These facts could be explained by the occurrence of thermal damage caused by Er:YAG laser radiation, or by the individual immunological response of the patients in earlier periods of healing. However, there were no significant differences between SRPL and L groups in gingival recession. The clinical results of the preset study might be related to a group of factors such as: the energy used during irradiation, final characteristics of root surfaces after irradiation, positioning and angulations' of the laser optical fiber tip, and the laser bactericidal action.

One histological in situ study²⁸ suggests that radiation with Er:YAG laser, when causing thermal damages in deep areas of root irradiated at the more apical aspect of the pocket areas, may set off inflammatory processes by chemotaxis of cytokines, which may explain increased interleukin 1β in areas irradiated by laser only. However, in this study, levels of inflammatory cytokine IL- 1β showed no significant differences, intra and inter-group, during 30 days of observation. On the other hand, a large variation of inflammatory response is observed among individuals, where other previous studies have noted considerable variations in production of IL- 1β in the inflammatory process of gingivitis³⁹ as periodontitis.⁴⁰ This may be related to heterogeneous response or a varied individual immunological response among different patients.⁴¹

Only one study⁴² showed the effects of high intensity lasers in gingival crevicular fluid levels of IL-I β using the Nd:YAG laser in periodontal pocket treatment. In this study, the authors reported that SRP is necessary to decrease IL-I β levels in gingival crevicular fluid, when compared to laser only or combinations of laser and SRP. These effects of high intensity laser may be minimized by adding pausing intervals between irradiations, and by cooling with water.²¹ During Er:YAG laser irradiation, the power setting, pulse repetition, energy, exposure time, water cooling and fluency must be regulated appropriately in order to avoid detrimental effects to the root surface.²¹ In this study an energy density of 12.9 J/cm² per pulse was used, however exposure time varied between two laser groups (SRPL and L).

The high anti-bactericidal potency of Er:YAG laser is one of the best justifications for use in periodontal treatment. The Er:YAG laser parameters applied in this study may have caused bacteria reduction, as proposed by Ando et al.¹⁴ who demonstrated significant in vitro reductions of *Porphyromonas gingivalis* colonies. Furthermore, the Er:YAG laser may inactivate bacterial toxins diffused in the root cementum, without producing smear layer.²¹ However, recent clinical and microbiological study comparing Er:YAG laser with curettes, sonic and ultrasonic in periodontal pockets showed periodontal bacterial reduction similar.⁴³ Other clinical and microbiological study did not also demonstrate significant differences in microbiologic composition at 30 days between the Er:YAG laser and ultrasonic scaling.³⁶

One study in vitro²³ demonstrated that root surfaces irradiated with laser energy density of 3 J/cm² (60 mJ/pulse) would be more favorable for adhesion of gingival fibroblasts than those irradiated with 5 J/cm² (100 mJ/pulse) or none irradiated. However, other study²² showed that 5.6 J/cm² also favored fibroblast proliferation. Belal et al.²⁶ demonstrated in vitro, that Er:YAG may offer a promising periodontal therapy for conditioning root surfaces, with use of intervals and with parameters < 60 mJ/pulse and 10 Hz of pulse repetition. On the other hand, a immunohistochemical study in dogs demonstrated that the non-surgical periodontal treatment using an Er:YAG laser at 10.2, 12.8, 15.4, 18 and 20.4

J/cm² was effective in controlling inflammation. In this study it was also demonstrated that Er:YAG laser may support the formation of a new connective tissue attachment.²⁷ The effective controlling of inflammation for SRPL, L and SRP may explain none difference on values of IL-1 β among the treatments, in the present study. In the present study the Er:YAG laser was used with 12.9 J/cm² (100 mJ/pulse). With this value, Theodoro et al.²⁴ found adhesion of elements of blood on irradiated root surfaces in vitro, but with no difference compared to control group (conventional SRP), showing that irradiation of root surfaces with this energy density did not interfere with adhesion of blood clots. On the other hand, the parameters of irradiation used in previous clinical studies^{29-32, 36} with Er:YAG laser (160 mJ/pulse and 10 Hz) are higher than the one used in this study (100 mJ/pulse and 10 Hz). On the other hand Crespi et al.²⁵ reported that the Er:YAG laser irradiation at 160 mJ/pulse and 10 Hz promoted in vitro fibroblast attachment and spreading on the root surfaces.

According with in vitro studies^{15-20, 24, 44, 45} the morphology of root surfaces after treatment with Er:YAG laser became more rough and irregular, because of explosive ablation. However another study¹⁷ demonstrated that removal of root structures with an Er:YAG laser at the correct angle and with low energy is similar to removal with manual curette instrumentation.

The angular position of 30°, between the outlet tip and root surface utilized in this methodology is based on the study of Folwaczny et al.⁴⁶ Their study demonstrated that the position angle of an Er:YAG beam application significantly influenced the removal of substances from root surfaces and further, that by using this angulation, damage to soft tissue and root surfaces are minimized.

As noted previously, thermal and mechanical damages caused by laser irradiation, may cause an initial inflammatory response. In this study, levels of inflammatory cytokine IL-1 β showed no significant differences, intra and inter-groups, during 30 days of observation, even when cytokine levels appeared to be relatively high after treatments. No literature published to date has evaluated immunological response to Er:YAG laser treatment.

Detection of cytokines and cells containing cytokines, in clinically healthy tissues, is expected, since a small number of chronic inflammatory cells are usually found in clinically healthy gingival tissues.¹ Reference values for IL-1 β associated with a healthy site or periodontal disease were not encountered in current literature.

One study³ established a value of > 70 pg/ml of IL-1 β in crevicular fluid as indicative of active periodontal disease. However, other study⁴⁷ stated that IL-1 β values of > 20 pg/ml in crevicular fluid may be considered for sites with gingivitis and those of > 102 pg/ml for sites with periodontitis. In the present investigation, all IL-1 β levels were higher than those observed in Alexander³ and Faizuddin et al.⁴⁷ studies.

After 30 days, even with significant improvement ($p < 0.05$) in reduction of bleeding on probing for the different groups, no significant change was observed regarding levels of IL-1 β . This suggests that the production of IL-1 β was not related to the presence of visible inflammation. Similarly, the clinical signs of inflammation and disease activity were not associated with high levels of IL-1 β .⁴

Research of Shapira et al.⁴⁸ stated that individual response to the secretion of inflammatory mediators may be related to differences in various forms of periodontal disease. This suggests heterogeneity of individual response to periodontal disease as well as to treatment. Other studies suggest individual variations in relation to expression of IL-1 β in crevicular fluid and further that genetic variation, such as polymorphism of IL-1 β , may be an explanation.^{49, 50}

A comparison between various clinical studies with Er:YAG laser and SRP in the treatment of chronic periodontitis is very difficult at the moment. The reasons are wide variations in laser parameters and insufficient reporting of these parameters; differences of experimental design; lack of proper controls; differences in severity of disease and response to treatments and measurement of different clinical endpoints.

Microbiological and histological evaluations are also necessary to substantiate the association of the data with clinical findings and treatment success. Further clinical, immunological and also microbiological as well as histological studies are needed to evaluate results of Er:YAG laser irradiation on the root surfaces

especially on a long term as a adjunctive tool to provide some additional benefit to SRP.

Within the limitations of this study, according to the methodology utilized and based upon results, it may be concluded that Er:YAG laser irradiation, may be used as an adjunctive aid for treatment of periodontal pockets, although a significant CAL gain was observed with SRP alone and not with the laser groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by CAPES - Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Brasilia, DF, Brazil). The authors would also like to thank KaVo Dental GmbH (Joinville, SC, Brazil), for supplying the laser equipment used in this study. We also thank Bruno Theodoro Luciano for the English review.

REFERENCES

- 1) Hanazawa S, Nakasa K, Ohmori Y, Miyoshi T, Amano S, Kitano S. Functional role of interleukin-1 in periodontal disease: induction of interleukin 1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharides in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infection and Immunity* 1985;50:262-270.
- 2) Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991; 26:230-242.
- 3) Alexander DC, Martin JC, King PJ, Powell JR, Caves J, Cohen ME. Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol* 1996;67:755-72.
- 4) Stashenko P, Fujiyoshi P, Obermeyer MJ, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1991;18:548-554.

- 5) O'leary TJ. The impact of research on scaling and root planing. *J Periodontol* 1986;57:69-75.
- 6) Keping TJ, O'leary TJ, Kafrawy AH. Total calculus removal: An attainable objective *J Periodontol* 1990;61:16-20.
- 7) Baderstein A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981;8:57-72.
- 8) Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1992;9:115-128.
- 9) Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Annals of Periodontology* 1996;1: 443-490.
- 10) Sherman PR, Hutchens LH, Jewson LG, Moriarty JM, Greco GW, McFall WT. The effectiveness of subgingival scaling and root planing. I. Clinical detection of residual calculus. *J Periodontol* 1990;61:3-8.
- 11) Cobb CM. Lasers in Periodontics: A review of the literature. *J Periodontol* 2006;77:545-564.
- 12) Ben Hatit Y, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: An in vivo study. *J Clin Laser Med and Surg* 1996;14:137-143.
- 13) Radvar M, Macfarlane TW, Mackenzie D, Whittres CJ, Payne A P, Kinane DF. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br Dental J* 1996;180:57-62.
- 14) Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med* 1996;19:190-200.
- 15) Aoki A, Ando A, Watanabe H, Ishikawa I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an Er:YAG Laser. *J Periodontol* 1994;65:1097-1106.

- 16) Israel M, Cobb CM, Rossmann JA, Spencer P. The effects of CO₂, Nd:YAG and Er:YAG Lasers with and without surface coolant on tooth roots surfaces. *J Clin Periodontol* .1997;24:595-602.
- 17) Folwaczny M, Mehl A, Haffner C, Benz C, Hickel R. Root substance removal with Er:YAG laser radiation at different parameters using a new delivery system. *J Periodontol* 2000;71:147-155.
- 18) Aoki A, Miura M, Akiyama F, et al. In vitro evaluation of Er:YAG laser scaling of subgingival calculus in comparison with ultrasonic scaling. *J Periodontol Res* 2000;35:266-276.
- 19) Theodoro LH, Haypek P, Bachmann L et al. Effect of Er:YAG and Diode laser irradiation on the root surface: morphological and thermal analyses. *J Periodontol* 2003;74:838-843.
- 20) Theodoro LH, Garcia VG, Haypek P, Zezell DM, Eduardo CP. Morphologic analysis, by means of scanning electron microscopy, of the effect of Er:YAG laser on root surfaces submitted to scaling and root planing. *Bras Oral Res* 2002;16:308-312.
- 21) Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential application of Erbium:YAG laser in periodontics. *J Periodontol Res* 2004;39:275-285.
- 22) Schoop U, Moritz A, Kluger W M, et al. Changes in root surface morphology and fibroblast adherence after Er:YAG laser irradiation. *J Oral Laser Appl* 2002;2:83-93.
- 23) Feist IS, De Micheli G, Carneiro SR, Eduardo CP, Miyagi S, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. *J Periodontol* 2003;74:1398-1375.
- 24) Theodoro LH, Sampaio JEC, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and Diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. *J Periodontol Res* 2006; 41:381-390.

- 25) Crespi R, Romanos GE, Cassinelli C, Gherlone E. Effects of Er:YAG laser and ultrasonic system on fibroblast attachment to root surfaces : In vitro study. *J Periodontol* 2006;77:1217-1222.
- 26) Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. effect of Er:YAG laser combined with rhPDGF-BB on attachment of cultures fibroblast to periodontally involved root surfaces. *J Periodontol* 2007;78:1329-1341.
- 27) Schwarz F, Jepsen S, Heten M, Aoki A, Sculean A, Becker J. Immunohistochemical characterization of periodontal wound healing following nonsurgical treatment with fluorescence controlled Er:YAG laser irradiation in dogs. *Lasers Surg Med* 2007;39:428-440.
- 28) Folwaczny M, Benner KU, Flasskamp B, Mehl A, Hickel R. Effects of 2.94 μm Er:YAG laser radiation on root surfaces treated in situ: a histological study. *J Periodontol* 2003;74:360-365.
- 29) Schwarz F, Sculean A, Georg T, Reich E. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to scaling and root planing. A controlled clinical study. *J Periodontol* 2001;72:361-367.
- 30) Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Georg T, Reich E, Becker J. Periodontal treatment with an Er:YAG laser or scaling and root planing. A 2-year follow-up split-mouth study. *J Periodontol* 2003;74:590-596.
- 31) Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Georg T, Reich E, Becker J. Clinical evaluation of an Er:YAG laser combined with scaling and root planing for non-surgical periodontal treatment. A controlled, prospective clinical study. *J Clin Periodontol* 2003;30: 26-34.
- 32) Crespi R, Cappare P, Toscanelli I, Gherlone E, Romanos GE. Effects of Er:YAG laser compared to ultrasonic scaler in periodontal treatment: a 2 year follow-up split-mouth clinical study. *J Periodontol* 2007;78:1195-1200.
- 33) Armitage G C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions *Annals of Periodontology* 1999;4:1-6.
- 34) Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dentistry J* 1975;25:229-235.

- 35) Johnson TC, Reinhardt RA, Payne JB, Dyr JK, Patie KD. Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. *J Clin Periodontol* 1997;24:618-625.
- 36) Tomasi C, Schander K, Dahlén G, Wennström JL. Short-term clinical and microbiologic effects of pocket debridement with and Er:YAG laser during periodontal maintenance. *J Periodontol* 2006;77:111-118
- 37) Ramfjord S, Caffesse R, Morrison E. Four modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-452.
- 38) Kaldahl W, Kalwarf KL, Patil KD, Moluar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol* 1996;67:93-102.
- 39) Kinane DF, Wistanley FP, Adonogranaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin – 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol* 1992;37:153-156.
- 40) Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994;65:423-428
- 41) Molvig J, Baek L, Christensen P et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable inter-individual differences. *Scand J Immunol* 1988;27:705-716.
- 42) Liu C-M, Hou L-T, Wong M-Y, Lan W-H. Comparison of Nd:YAG laser versus scaling and root planing in periodontal therapy. *J Periodontol* 1999;70:1276-1282.
- 43) Derdilopoulou FV, Nonhoff J, Neumann K, Kielbassa AM. Microbiological findings after periodontal therapy using curettes, Er:YAG laser, sonic, and ultrasonic scalers. *J Clin Periodontol* 2007;34:588-598.
- 44) Yamaguchi H, Kobayashi K, Osada R et al. Effects of irradiation of an Erbium:YAG Laser on root surfaces. *J Periodontol* 1997;68:1151-1155.
- 45) Fujii T, Baehni PC, Kawai O, Kawakami T, Matsuda K, Kowashi Y. Scanning electron microscopic study of the effects of Er:YAG Laser on root cementum. *J Periodontol* 1998;69: 1283-1290.

- 46)Folwaczny M, Thiele L, Mehl A, Hickel R. The effect of working tip angulation on root substance removal using Er:YAG laser radiation: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2001;28: 220-226.
- 47)Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin 1 β levels in the gingival crevicular fluid in health and inflammatory periodontal disease. *J Periodontol Res* 2003;38: 111-114.
- 48)Shapira L, Soskolne WA, Sela MN, Offenbacher S, Barak V. The secretion of PG E₂, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. *J Periodontol* 1994;65:139-146.
- 49)Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fisher RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:1457-1463.
- 50)Engelbrecht SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29:48-53.

Legends

Tables

Table 1. – Mean probing depth (PD) values (mm) $\pm$ SD of different groups, at baseline and 30 days postoperatively (n=21 patients).

Table 2. – Mean clinical attachment level (CAL) values (mm) $\pm$ SD of different groups, at baseline and 30 days postoperatively (n=21 patients).

Table 3. – Mean gingival recession (GR) values (mm) $\pm$ SD of different groups, at baseline and 30 days postoperatively (n=21 patients).

Figures

Figure 1. Clinical application of periodontal tip of Er:YAG laser on periodontal pocket.

Figure 2. Distribution of proportions (%) obtained for variable PI, for the treated groups at different periods.

* Significant difference when compared with baseline in the same group.

Significant differences when compared with SRPL group in the same period.

Cochran's Q Test and McNemar's Exact Test ($p < 0.05$)

Figure 3. Distribution of proportions (%) obtained for variable GI, for the treated groups at different periods

* Significant difference when compared with baseline in the same group.

Significant differences when compared with SRPL group in the same period.

§ Significant differences when compared with C group in the same period.

Cochran's Q Test and McNemar's Exact Test ($p < 0.05$)

Figure 4. Distribution of proportions (%) obtained for variable BOP for the treated groups at different periods

* Significant difference when compared with baseline in the same group.

§ Significant differences when compared with C group in the same period.

Cochran's Q Test and McNemar's Exact Test ($p < 0.01$)

Figure 5. Mean concentration of interleukin 1- β (pg/ml) $\pm$ SD of different groups, at baseline, 12 and 30 days postoperatively (n=21 patients).

Table 1.

Groups	Baseline	30 days	<i>p value</i> **
PD	Mean±SD	Mean±SD	
SRPL	6.48±1.15	4.80±1.3	**
L	6.42±1.08	5.30±1.2	**
SRP	6.87±1.05	5.20±1.4	**
C	6.28±0.85	6.30±0.9	NS
<i>p value</i>	NS	SRPL and C*	

* *p value* refers to statistical significance differences among groups ($p<0.05$). Analysis of Variance (ANOVA) for repeated measurements and Tukey Test.

** *p value* refers to statistical significance differences between the baseline and 30 days ($p<0.05$). (Student paired t-test)

NS= not significant

Table 2

Groups	Baseline	30 days	<i>p value</i> **
CAL	Mean±SD	Mean±SD	
SRPL	6.71±1.42	6.50±1.35	NS
L	6.61±1.11	6.58±1.33	NS
SRP	7.20±1.28	6.72±1.28	**
C	6.80±1.46	6.94±1.40	NS
<i>p value</i> *	NS	NS	-

* *p value* refers to statistical significance differences among groups ($p<0.05$). Analysis of Variance (ANOVA) for repeated measurements and Tukey Test.

** *p value* refers to statistical significance differences between the baseline and 30 days ($p<0.05$). (Student paired t-test)

NS= not significant

Table 3.

Groups	Baseline	30 days	<i>p value**</i>
GR	Mean±SD	Mean±SD	
SRPL	0.24 ± 0.70	1.05 ± 1.12	*
L	0.19 ± 0.40	0.86 ± 0.91	*
SRP	0.33 ± 0.66	0.81 ± 1.17	NS
C	0.52 ± 0.98	0.62 ± 1.02	NS
<i>p value *</i>	NS	NS	-

* *p value* refers to statistical significance differences among groups ($p<0.05$). Friedman and Dunn Tests.

** *p value* refers to statistical significance differences between the baseline and 30 days ($p<0.05$).

(Wilcoxon Test).

NS=not significant

**Figure 1.** Clinical application of periodontal tip of Er:YAG laser on periodontal pocket.

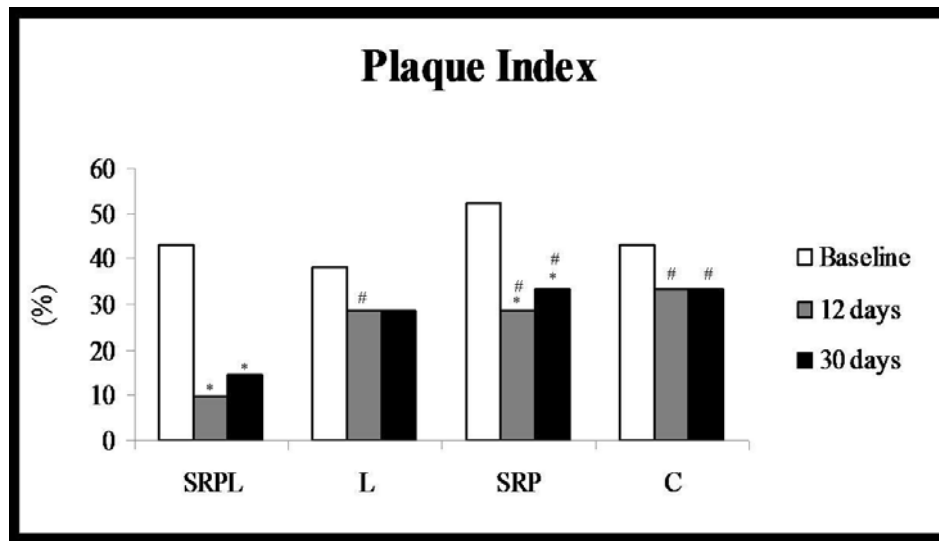


Figure 2. Distribution of proportions (%) obtained for variable PI, for the treated groups at different periods.

* Significant difference when compared with baseline in the same group.

Significant differences when compared with SRPL group in the same period.

Cochran's Q Test and McNemar's Exact Test ($p < 0.05$)

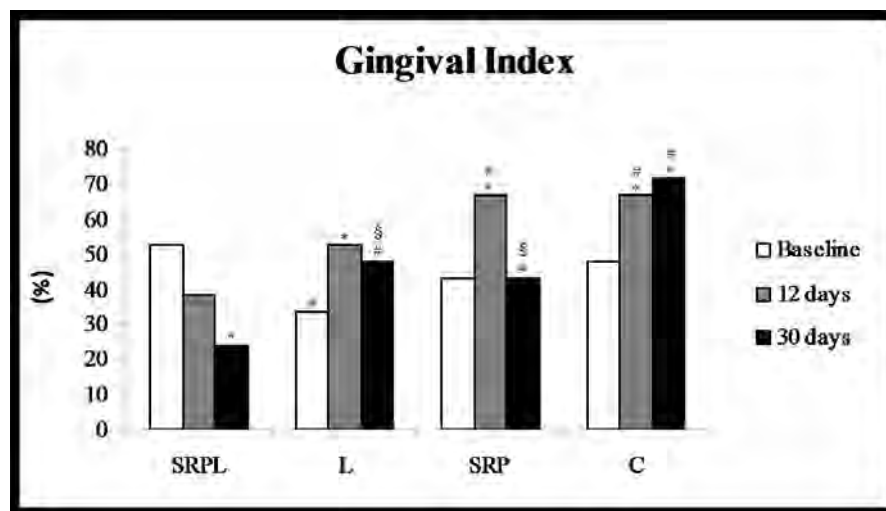


Figure 3. Distribution of proportions (%) obtained for variable GI, for the treated groups at different periods

* Significant difference when compared with baseline in the same group.

Significant differences when compared with SRPL group in the same period.

§ Significant differences when compared with C group in the same period.

Cochran's Q Test and McNemar's Exact Test ($p < 0.05$)

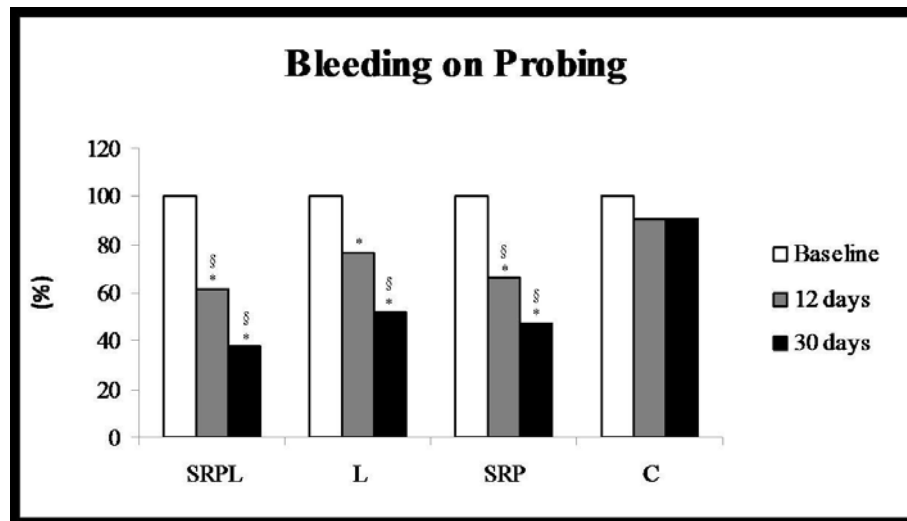


Figure 4. Distribution of proportions (%) obtained for variable BOP for the treated groups at different periods

* Significant difference when compared with baseline in the same group.

§ Significant differences when compared with C group in the same period.

Cochran's Q Test and McNemar's Exact Test ($p < 0.01$)

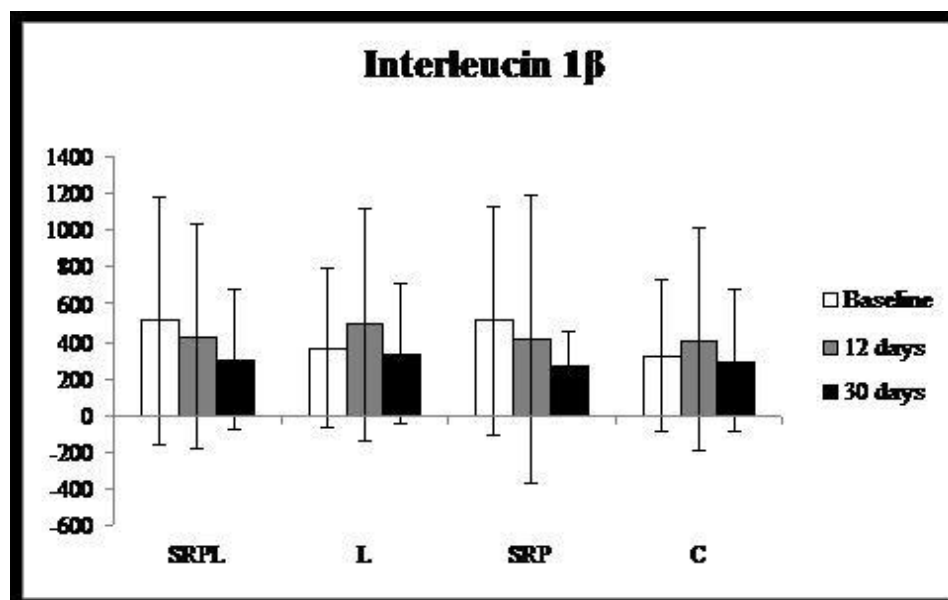


Figure 5. Mean concentration of interleukin 1-β (pg/ml) ± SD of different groups, at baseline, 12 and 30 days postoperatively (n=21 patients).

4.2 Capítulo 2 – Análise longitudinal

Clinical, immunological and microbiological evaluations after non-surgical periodontal treatment with Er:YAG laser combined with scaling and root planing.

❖ *Artigo em fase de correção e tradução a ser enviado para publicação no Journal of Periodontology.*

Clinical, immunological and microbiological evaluations after non-surgical periodontal treatment with Er:YAG laser combined with scaling and root planing.

Summary contents: Er:YAG laser irradiation may be used and as an adjunctive aid for treatment of periodontal pockets.

Beatriz M. V. Lopes, PhD Student in Periodontology*;

R. Adriana C. Marcantonio, PhD in Periodontology*;

Gloria M. A. Thompson, PhD in Microbiology and Immunology*;

Rafaela Fernanda Melo, PhD Student in Periodontology*;

Leticia H. Theodoro, PhD in Periodontology[‡]

*UNESP - São Paulo State University; Department of Periodontology, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil.

[‡]Department of Periodontology, Barretos Dental School, Education Foundation of Barretos - FEB, Barretos, SP, Brazil.

This study is attributed to the UNESP - São Paulo State University, Department of Periodontology, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil.

Correspondence author

Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

UNESP - São Paulo State University, Department of Periodontology, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil - Araraquara Dental School - UNESP
Rua Humaitá, 1680. Araraquara, SP, Brazil. 14801-903.

Phone: +55 (16) 3301-6369 / Fax: +55 (16) 3301-6369 (*may be published*)

e-mail: adriana@foar.unesp.br ; letheodoro@uol.com.br (*may be published*)

Sources of support

CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brasilia, DF, Brazil).

There are 4 figures and 7 tables in this manuscript.

Running title: Effect of Er:YAG laser for non-surgical periodontal treatment

ABSTRACT

Background: The Er:YAG laser has recently been used for periodontal therapy. This study compared Er:YAG laser irradiation (100 mJ/pulse, 10 Hz, 12.9 J/cm²) with or without conventional scaling and root planing (SRP), versus SRP only for treatment of periodontal pockets affected with chronic periodontitis.

Methods: Twenty-one patients, with pockets from 5 to 9 mm in non-adjacent sites, were studied. In a split-mouth design, each site was randomly allocated to a treatment group: 1) SRPL - SRP and laser; 2) L - laser only; 3) SRP - only SRP; 4) C - no treatment. Plaque index (PI), gingival index (GI), bleeding on probing (BOP), and interleukin-1 β levels in crevicular fluid (IL-1 β) were evaluated at baseline, 12, 30, 90 and 180 postoperatively, while probing depth (PD), gingival recession (GR), and clinical attachment level (CAL) were evaluated at baseline, 30, 90 e 180 days after treatment. Statistical analysis was conducted ($p < 0.05$)

Results: Twelve and 30 days postoperatively PI decreased for SRPL and SRP ($p < 0.05$) and for all treated groups ($p < 0.05$) 90 and 180 days after baseline; GI decreased for SRPL and increased for L, SRP and C ($p < 0.05$) and reduced for SRPL and SRP ($p < 0.05$) 90 and 180 days after baseline; BOP reduces for SRPL, L and SRP ($p < 0.05$) 12 and 30 days postoperatively and data showed BOP reduction when compared the C ($p < 0.05$) after 30 days; BOP decreased for all treated groups ($p < 0.05$) 90 and 180 days after treatment. Values of PD decreased in SRPL, L and SRP groups ($p < 0.05$) 30, 90 and 180 days after treatment. CAL gain showed an improvement for SRP ($p < 0.05$) 30 days after treatment and was significant for SRPL, L and SRP groups 90 and 180 days after treatment. GR values increased for SRPL and L groups ($p < 0.05$) 30 and 90 days after baseline and for SRP, SRPL and L 180 days after treatment. In all periods, SRPL and L groups demonstrated a significant reduction on percentage of sites with presence of bacteria ($p < 0.05$), already SPR group demonstrated microbiological improvements only 30 days postoperatively ($p < 0.05$). SRPL group was presented smaller prevalence of bacteria than others groups. No difference was detected for IL-1 β among groups and periods.

Conclusions: Results indicated that Er:YAG laser irradiation, with or without conventional scaling and root planning, may be used and as an adjunctive aid for treatment of periodontal pockets, and promotes microbiological benefits, however no demonstrated clinical and immunological changes significant.

Keywords: lasers; dental planing; root planing; periodontal diseases; interleukin-1; polymerase chain reaction; comparative study; Er:YAG. laser

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são infecções multifatoriais iniciadas por um complexo de espécies bacterianas que interage com os tecidos e as células do hospedeiro causando a liberação de um grande conjunto de citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores, alguns dos quais levam à destruição de estruturas periodontais.¹

O acúmulo de biofilme microbiano nas superfícies dentais próximas às margens gengivais está geralmente associada com a patogênese da doença periodontal. A presença de endotoxinas relacionadas aos microorganismos no sulco gengival desencadeia a produção e liberação de citocinas, dentre as quais podemos citar a IL-1 β . Essa citocina é produzida em resposta às endotoxinas bacterianas e estão diretamente relacionadas com a reabsorção óssea²⁻⁵ e são quantificáveis por meio de testes enzimáticos.^{4,5}

O objetivo primário do tratamento da doença periodontal é desorganizar o biofilme subgengival e remover completamente os depósitos bacterianos das superfícies das raízes prevenindo a progressão da doença.^{6,7}

Clinicamente existem evidências que relatam que a raspagem e o alisamento radicular (RAR) com instrumentos manuais promovem os melhores resultados para o tratamento da doença periodontal.^{8,9} No entanto, variação anatômica podem limitar o sucesso da RAR convencional, como concavidades na raiz e, ainda bolsas muito profundas, defeitos esses que dificultam o acesso de instrumentos manuais dentro da bolsa periodontal.^{10,11}

A uso do laser para terapia periodontal tem sido recentemente investigada.¹² Lasers de alta intensidade têm sido usados para promoção de redução bacteriana em bolsas periodontais¹³⁻¹⁵ e para raspagem e alisamento radicular¹⁶⁻¹⁹

Uma variedade de lasers têm sido empregados na Odontologia, incluindo os lasers de CO₂,^{12,17} de Nd:YAG,^{12-14,17} de Diodo,¹² e de Er:YAG,^{12,15-19} sendo amplamente estudados para o tratamento da doença periodontal. O laser de Er:YAG tem um comprimento de onda de 2,94 μ m, com uma alta capacidade de absorção de água, sendo que este laser deve ser usado com água¹⁵⁻²¹, fator que

minimiza os riscos térmicos nas superfícies mineralizadas. Na tentativa de melhorar a eficácia na remoção do biofilme subgengival, o laser de Er:YAG tem sido recomendado como uma alternativa no tratamento de raspagem convencional.²² A biocompatibilidade das superfícies irradiadas tem sido verificada em estudos de adesão celular,²³⁻²⁷ in vivo²⁸ e in situ²⁹ usando o laser de Er:YAG.

No entanto, poucos estudos clínicos controlados desenvolvidos em humanos têm sido realizados para avaliar os efeitos do laser de Er:YAG nas superfícies das raízes para o tratamento periodontal não cirúrgico.³⁰⁻³³ Mais estudos são necessários para que sejam avaliados, além dos dados clínicos convencionais, os parâmetros imuno e microbiológicos sob o efeito desse laser

MATERIAL E MÉTODO

Seleção dos Pacientes

Para este estudo, 21 pacientes, sendo 7 homens e 14 mulheres com periodontite crônica generalizada⁷ (quatro sítios com sangramento à sondagem e profundidade de sondagem entre 5 e 9 mm), idade entre 31 e 55 anos (média das idades de 43 anos) foram selecionados. Os critérios de exclusão foram: 1)tratamento periodontal nos últimos 12 meses; 2)presença de condição sistêmica que interfira no processo saúde-doença periodontal; 3)uso de antibiótico nos últimos seis meses; 4)uso de antiinflamatórios nos últimos três meses; 5)gestação, amamentação ou uso de contraceptivos hormonais; 6)fumantes. Esses pacientes receberam tratamento entre 2003 e 2005. Todos foram orientados e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado para este estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

Delineamento do Estudo

Foram selecionados quatro sítios por paciente que apresentaram sangramento à sondagem e profundidade de sondagem entre 5 e 9mm, em sítios não vizinhos (total = 84 sítios). Moldagens das arcadas dentais em alginato foram realizadas

para a confecção de guias de acetato com objetivo de padronizar o posicionamento da sonda computadorizada[♥] durante a realização dos exames clínicos. Um examinador cego e calibrado examinou todos os parâmetros clínicos, e fez o tratamento de RAR nos devidos grupos (BMVL). Outro operador treinado realizou a irradiação do laser (LHT).

Calibração do Examinador

Cento e quarenta sítios com profundidade de sondagem ≥ 5 mm foram randomizados e selecionados em 7 pacientes (20 sítios por paciente em dentes uni ou multirradiculares foram considerados para a calibração). O examinador avaliou a bolsa periodontal em 2 ocasiões, com intervalo de 48 horas e os dados foram submetidos aos teste t de Student. A calibração foi válida porque a avaliação das diferenças entre os dois períodos avaliados não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Controle de higiene oral

Seis meses antes do tratamento, todos os pacientes foram colocados em um programa de controle de placa supragengival quinzenal ou mensal onde receberam instruções de higiene oral, e profilaxia com pasta profilática e taça de borracha realizada por profissional especializado, de acordo com as necessidades individuais de cada paciente até o baseline. Esse controle foi refeito no início do trabalho. Durante os primeiros 30 dias esses procedimentos foram realizados semanalmente, Após 30 dias estes controles foram realizados mensalmente.

Tratamento

Oitenta e quatro sítios foram divididos de forma igual entre os lados direito e esquerdo da boca. Em um lado, os sítios foram tratados com o laser de Er:YAG (grupos RARL e L), enquanto os sítios do lado contrário foram tratados com RAR

[♥]Pocket Probe, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA.

somente ou não tratados (grupos RAR e C). Os quatro sítios de cada paciente foram randomicamente alocados usando uma tabela gerada no computador. A seqüência dos procedimentos foi sempre da mesma maneira. Para uma melhor padronização o sítio 1 foi a primeira escolha e em seguida o 2, 3 e 4 respectivamente. Os sítios foram divididos nos grupos: 1) RARL: raspagem convencional seguida de irradiação do laser de Er:YAG por 30 segundos; 2) L: irradiação do laser de Er:YAG somente até que o operador considerasse que a superfície da raiz estivesse debridada adequadamente; 3) RAR: raspagem convencional e 4) C: controle i.e. sem tratamento. Curetas manuais e específicas[^].foram utilizadas para RAR convencional. Raspagem e alisamento radicular e/ou com laser foi realizada até que o operador considerasse que a superfície estava debridada e aplainada adequadamente.

Irradiação com o laser

O laser de Er:YAG[♥] selecionado apresentava comprimento de onda de 2,94 µm, duração do pulso entre 250-500 µs de tempo de exposições; freqüência de 10Hz, usando uma peça de mão com uma ponta especial (1,1 mm x 0,5 mm), com os seguintes parâmetros: energia de 100 mJ/pulso demonstrado no display resultando na transmissão de energia de 71 mJ/pulso na saída da peça de mão 2056 (574 2531; fator de transmissão de 71%) e fluência de 12.9 J/cm²/puso.²⁵

Após anestesia infiltrativa, os sítios dos grupos RARL e L foram irradiados sob a refrigeração à água, de acordo com o manual do fabricante. A ponta da fibra óptica foi conduzida em movimentos apico-coronários, com ângulo de inclinação de aproximadamente 30° em relação à superfície radicular.

Para o grupo RARL a irradiação com o laser foi realizada imediatamente após a raspagem, 30 segundos por sítio. Para o grupo L a irradiação com o laser foi em entre 180 a 240 segundos (média de 204 segundos) até que o operador percebesse que a raiz estava raspada e aplainada de formas adequadas.

[^]Curetas Gracey, Hu- Friedy, Illinois, USA

[♥]KEY Laser II, 1242 com a peça de mão P2056, KaVo Dental GmbH, Biberach, Germany.

Exames clínicos

No baseline, 30, 90 e 180 dias após os tratamentos, os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: índice de placa (IP)³⁵, índice gengival (IG)³⁵, profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) nível de inserção (NI) e recessão gengival (RG). O SS foi determinado pela presença (+) ou ausência (-) de sangramento observado durante 30 segundos, após a primeira inserção da sonda periodontal na bolsa. IP e IG foram mensurados com uma sonda manual milimetrada[♥], enquanto PS, NI e RG foram mensurados com a sonda computadorizada[★]. Dois dias antes do exame clínico o fluido crevicular foi coletado para as análises imuno e microbiológica e o IP e IG foram realizados nesse momento. Esses procedimentos foram realizados dois dias antes na tentativa de minimizar um viés de confusão entre o sangramento à sondagem e o sangramento marginal. Doze dias pós-tratamentos foram repetidos os procedimentos de coleta de fluido crevicular e observação os IP, IG e SS. O SS nesse momento foi observado quando as pontas de papéis estéreis foram removidas para evitar sondar a bolsa nesse período. Após 30, 90 e 180 dias dos tratamentos foram repetidos todos os exames do baseline.

Coleta do fluido crevicular

As coletas para as análises imuno e microbiológica foram realizadas 12, 30, 90 e 180 dias após os tratamentos. Após a remoção da placa supragengival, os dentes foram isolados com rolete de algodão.

Para a análise microbiológica o fluido foi coletado com cones de papel absorvente estéril (número 30) e introduzido na bolsa periodontal em direção apical até que fosse sentido uma pequena resistência, permanecendo no local por 30 segundos. Os cones foram imediatamente conservados em tubos apropriados contendo 500 µl solução de PBS e congelados à uma temperatura de -20°C para posterior análise por meio de PCR.

[♥] PCP-UNC, Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA

[★] Pocket Probe, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA.

A coleta para o exame imunológico foi realizada após um intervalo de aproximadamente 10 minutos para evitar interferência da primeira coleta. Para a coleta foi utilizado cone de papel absorvente estéril (número 30) introduzido na bolsa periodontal em direção apical até que fosse sentido uma pequena resistência, permanecendo no local por 30 segundos.

Os cones foram imediatamente conservados em tubos apropriados contendo 500 µl de uma solução à base de PBS associada a um coquetel de inibidores de protease para a manutenção da viabilidade das substâncias³⁵ e congelados à uma temperatura de -70°C para posterior análise por meio do teste ELISA.

Análise Imunológica

Um kit enzimático para imunoensaio^{*} específico foi utilizado para medir a quantidade de IL-1β presente nas amostras de fluido crevicular. A concentração da citocina nas amostras é diretamente proporcional à intensidade de coloração (absorbância) resultante da aplicação do reagente Ellman's. O teste foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras foram distribuídas em três orifícios (um orifício com amostra concentrada e dois orifícios com amostras diluídas, na diluição de 1:5). As leituras foram realizadas nos tempos 15, 30 e 60 minutos no espectrofotômetro de 415 nm^{*}. A absorbância foi convertida na concentração de IL-1β por amostra, de acordo com as curvas padrões, em cada tempo, e os resultados finais foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) de concentração de IL-1β presente no fluido crevicular.

Análise Microbiológica

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e agitadas em vortex por um minuto. Em seguida, foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, contendo aproximadamente 1µM de cada oligonucleotídeo, 100 µM de

^{*}Cayman Chemical Company, Ann Arbor/MI, USA

^{*}Multiskar Ascent – Labsystems Uniscience, Vantaa/Finlândia

DNTPs e, para cada par de oligonucleotídico foi utilizado uma quantidade específica de Taq DNA polimerase. A amplificação dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, preparados com agarose ultra pura, solução de TBE e brometo de etídio para a visualização do fragmento de DNA. Para a corrida eletroforética, em cuba para corrida eletroforética horizontal foram utilizados 12µL do produto de PCR e 2 µL de tampão de amostra. As corridas foram submetidas a uma corrente elétrica contínua de 100V por 90 minutos. Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis. As fotografias obtidas foram armazenadas para análise da presença das bactérias investigadas (*Aa*, *Pg*, *Pi*, *Pn* e *Tf*).

Análise Estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística utilizando-se softwares^{*♥} adequados. O cálculo da amostra foi calculado considerando um poder do teste de 95%, nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,0 mm entre os grupos. Para um poder de estudo de 95% uma amostra de no mínimo 18 pacientes foi calculada. Análises inter e intra grupos foram realizadas nos diferentes períodos. As variáveis quantitativas (PS, NI, RG e níveis de IL-1β) foram submetidas ao teste de normalidade (teste de aderência de Lilliefors). Os dados de PS e NI apresentaram distribuição normal dos dados e foram analisados aplicando-se o teste de Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA) seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações entre grupos e entre períodos. Os dados de RG e IL-1β não foram considerados normais e foram analisados aplicando-se o teste de Friedman, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Para as variáveis categóricas (IP, IG e SS e prevalência de bactérias), os dados foram submetidos ao teste de Cochran. Quando os resultados foram estatisticamente significantes, as amostras foram comparadas utilizando o teste exato de McNemar. Foi adotado o nível de significância de 5%.

* Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego/CA, USA)

♥ BioEstat 4.0 (BioEstat Software, Belém/PA, BRASIL)

RESULTADOS

Na distribuição inicial dos 84 sítios (n=21pacientes), 48 (57,1%) estavam localizados em dentes uni ou birradiculares e 36 (42,9%) em dentes multirradiculares. Oitenta e dois (97,6%) sítios estavam localizados na região interproximal e 2 (2,4%) nas faces livres dos dentes. Complicações pós-operatórias, abscessos ou infecções não foram observados durante todo o período do estudo.

Na tabela 3 os dados iniciais para as variáveis clínicas e imunológica demonstram haver diferença significativa entre os grupos RARL (52,4%) e L (33,3%) no IG. Essa diferença também é observada para a bactéria *Pn* no mesmo período (tabela 7).

A distribuição das proporções obtidas para a variáveis: índice de placa (IP), índice gengival (IG) e sangramento à sondagem estão demonstradas nas figuras 7 a 9. Os dados das médias ($\pm$ DP) referentes à profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NI) e recessão gengival (RG) estão demonstrados nas tabelas 4 a 6, respectivamente; os níveis de concentração de IL-1 β (IL-1 β) estão demonstrados na figura 10, e a distribuição (em%) do número de sítios com prevalência das bactérias *Aa*, *Pi*, *Pg*, *Pn* e *Tf* podem ser observados na tabela 7.

12 dias pós-tratamentos

Na comparação entre o baseline e 12 dias após os tratamentos, IP apresentou uma redução significativa ($p<0,05$) para os grupos RARL (43,7% para 9,5%) e RAR (52,4% para 28,6%). Não houve diferença estatisticamente significativa no IP entre os dois períodos para os grupos L e C. A comparação entre os grupos demonstrou que o IP foi maior para L, RAR e C quando comparados ao grupo RARL ($p<0,05$; figura7).

O IG aumentou para os grupos L (33,3% para 52,4%), RAR (42,7% para 66,7%) e C (47,6% para 66,7%) ($p<0,05$) e reduziu para RARL (52,4% para 38,1%) ($p>0,05$). O grupo RARL (38,1%) demonstrou diferença significativa na redução do IG em relação aos grupos RAR (66,7%) e C (66,7%) ($p<0,05$), mas não com L (52,4%) no período de 12 dias ($p<0,05$; figura 8).

No baseline 100% dos sítios do estudo apresentavam SS. Após os tratamentos foi observada uma redução significativa para os grupos RARL (61,9%), L (76,2%) e RAR (66,7%) ($p < 0,05$; figura 9). O grupo controle (90,5%) não mostrou redução significativa de SS nesse período ($p > 0,05$). Na comparação entre os grupos RARL e RAR apresentaram redução significativa no SS quando comparado ao grupo C, no entanto sem diferença com o grupo L (76,2%) ($p > 0,05$).

Os valores iniciais de IL-1 β diminuíram em RARL (509,6 pg/mL para 425,1 pg/mL) e RAR (507,3 pg/mL para 411,6 pg/mL). Para os grupos L e C os valores aumentaram (363,0 pg/mL para 488,1 pg/mL; 320,9 pg/mL para 408,7 pg/mL, respectivamente). Os níveis de IL-1 β observados não demonstraram diferenças significantes ($p > 0,05$) intra e inter grupos (figura 10).

Com relação à porcentagem de sítios com bactérias presentes foram observadas mudanças em RARL como redução de *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Pn* e *Tf* ($p < 0,05$); em L redução de *Aa*, *Pg*, *Pn* e *Tf* ($p < 0,05$); em RAR redução de *Aa* e *Tf* ($p < 0,05$); e em C não houve redução significativa na porcentagem dos sítios com prevalência de bactérias. Na comparação entre grupos RARL mostrou diferença na bactéria *Aa* para os grupos L e C ($p < 0,05$); em *Pg* para os grupos RAR e C ($p < 0,05$); na bactéria *Pn* para o grupo RAR e em *Tf* para o grupo C; L mostrou diferença na bactéria *Aa* para os grupos RAR e C ($p < 0,05$); em *Pg* para o grupo C ($p < 0,05$); em *Pn* para os grupos RAR e C ($p < 0,05$) e na bactéria *Tf* para o grupo C ($p < 0,05$); RAR mostrou diferença em *Tf* para o grupo C ($p < 0,05$). (tabela 7)

30 dias pós-tratamentos

Ao comparar os dados entre o baseline e 30 dias após os tratamentos, IP reduziu para os grupos RARL (43,7% para 14,3%) e para RAR (52,4% para 33,3%) ($p < 0,05$). Os grupos L e C não demonstraram diferença para IP entre os períodos. Houve diferença estatisticamente significativa no IP quando comparou-se os grupos RARL com RAR ($p < 0,05$) e RARL com C ($p < 0,05$; figura 7)

Para esse período IG diminuiu para RARL (52,4% para 23,8%, $p < 0,05$). Por outro lado, IG aumentou para C (47,6% para 71,4%, $p < 0,05$). Para os grupos L (47,6%) e RAR (42,9%) houve um aumento de IG, porém sem diferenças significantes quando comparado ao inicial (33,3% e 42,7%, respectivamente). Na comparação

entre os grupos, RARL (23,8%) demonstrou uma redução significativa quando comparado aos grupos L, RAR e C (42,9%, 47,6%, 71,4%; $p < 0,05$). Os grupos L e RAR apresentaram valores de IG menores que o grupo C ($p < 0,05$; figura 8).

Após os tratamentos foi observada uma redução significativa de SS para os grupos RARL (38,1%), L (52,4%) e RAR (47,6%) ($p < 0,05$). O grupo controle (90,5%) não mostrou redução significativa de SS nesse período ($p > 0,05$). Na comparação entre os grupos RARL, L e RAR apresentaram redução significativa no SS quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$; figura 9).

Os valores das médias de PS (demonstrados na tabela 4) reduziram significativamente para os grupos RARL ($6,5 \pm 1,2$ mm para $4,8 \pm 1,3$ mm), L ($6,4 \pm 1,1$ mm para $5,3 \pm 1,2$ mm) e RAR ($6,9 \pm 1,1$ mm para $5,2 \pm 1,4$ mm). Quando foram comparadas as diferenças entre os grupos foi demonstrada diferença significativa entre os grupos RARL ($4,8 \pm 1,3$ mm) e C ($6,3 \pm 0,9$ mm).

Os resultados demonstraram uma melhora significativa da média do ganho de NI somente para o grupo RAR ($7,2 \pm 1,3$ mm para $6,7 \pm 1,3$ mm; $p < 0,05$; tabela 5). Os grupos RARL ($6,7 \pm 1,4$ mm para $6,5 \pm 1,4$ mm) e L ($6,6 \pm 1,1$ mm para $6,6 \pm 1,3$ mm) apresentaram um pequeno ganho de NI e o grupo C ($6,8 \pm 1,5$ mm para $6,9 \pm 1,4$ mm) uma pequena perda de NI, porém sem diferença entre os períodos ($p > 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando foram comparados os grupos do estudo, nesse período ($p > 0,05$).

Houve um aumento significativo em RG ($p < 0,05$; tabela 6) para os grupos tratados com laser RARL ($0,2 \pm 0,7$ mm para $1,1 \pm 1,1$ mm) e L ($0,2 \pm 0,4$ mm para $0,9 \pm 0,9$ mm). Os grupos RAR ($0,3 \pm 0,7$ mm para $0,8 \pm 1,2$ mm) e C ($0,5 \pm 1,0$ mm para $0,6 \pm 1,0$ mm) também apresentaram aumento da RG, porém sem diferenças significantes no período ($p > 0,05$). Diferenças significantes entre os grupos não foram encontradas ($p > 0,05$).

Os valores iniciais de IL-1 β diminuíram em RARL (509,6 pg/mL para 300,2 pg/mL), L (363,0 pg/mL para 331,2 pg/mL), RAR (507,3 pg/mL para 273,1 pg/mL) e C (320,9 pg/mL para 291,6 pg/mL). Os níveis de IL-1 β observados não demonstraram diferenças significantes ($p > 0,05$) intra e inter grupos (figura 10).

Na observação da porcentagem de sítios com bactérias presentes (tabela 7) foram observadas mudanças em RARL como redução de *Aa*, *Pg*, *Pn* e *Tf* ($p < 0,05$); em L redução de *Aa*, *Pg*, *Pn* e *Tf* ($p < 0,05$); em RAR redução de *Aa* e *Tf* ($p < 0,05$); e em C não houve redução significativa na porcentagem dos sítios com prevalência de bactérias. Na comparação entre grupos RARL mostrou diferença na bactéria *Aa* para o grupo C ($p < 0,05$); em *Pg* para os grupos RAR e C ($p < 0,05$); na bactéria *Pn* para os grupos L, RAR e C e em *Tf* para o grupo C; L mostrou diferença na bactéria *Aa* para o grupo C ($p < 0,05$); em *Pg* para os grupos RAR e C ($p < 0,05$); em *Pn* para os grupos RAR e C ($p < 0,05$) e na bactéria *Tf* para os grupo C ($p < 0,05$); RAR mostrou diferença nas bactéria *Pn* e *Tf* para o grupo C ($p < 0,05$).

90 dias pós-tratamentos

Após 90 dias o IP reduziu significativamente ($p < 0,05$) para os quatro grupos do estudo quando comparado ao baseline (RARL (43,7% para 23,8%); L (38,1% para 19,1%), RAR (52,4% para 14,3%) e C (42,9% para 23,8%)), não havendo diferenças significantes entre os grupos nesse período (figura 7).

O IG diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para RARL (52,4% para 19,1%) e RAR (42,7% para 19,1%). Para os grupos L (27,7%) e C (42,9%) houve uma redução de IG, porém sem diferenças significantes quando comparado ao inicial. Na comparação entre os grupos, RARL e RAR demonstraram uma redução significativa somente quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$; figura 8). O grupo L apresentou valores de IG menores que o grupo C, porém sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Após os tratamentos foi observada uma redução de SS significativa para os grupos RARL (42,9%), L (57,1%), RAR (42,9%) e C (61,9%) ($p < 0,05$; figura 9). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nesse período.

O valores das médias de PS reduziram significativamente para os grupos RARL ($6,5 \pm 1,2$ mm para $4,6 \pm 1,5$ mm), L ($6,4 \pm 1,1$ mm para $5,1 \pm 1,3$ mm) e RAR ($6,9 \pm 1,1$ mm para $4,9 \pm 1,6$ mm). Quando foram comparadas as diferenças entre os grupos foi observada diferença significativa entre os grupos tratados RARL ($4,6 \pm 1,5$ mm), L ($5,1 \pm 1,3$ mm) e RAR ($4,9 \pm 1,6$ mm) em relação ao grupo C ($6,7 \pm 0,8$ mm). (tabela 4)

Os resultados demonstraram uma melhora significativa da média do ganho de NI para os grupos RARL ($6,7 \pm 1,4$ mm para $5,9 \pm 2,1$ mm), L ($6,6 \pm 1,1$ mm para $6,3 \pm 1,7$ mm) e RAR ($7,2 \pm 1,3$ mm para $6,0 \pm 1,2$ mm; $p < 0,05$). O grupo C ($6,8 \pm 1,5$ mm para $6,8 \pm 1,4$ mm) não mostrou diferenças no NI. Nesse período, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando foram comparadas às diferenças entre os grupos. ($p > 0,05$; tabela 5).

Na análise clínica de RG (tabela 6), um aumento significativo foi observado ($p < 0,05$) para os grupos tratados com laser RARL ($0,2 \pm 0,7$ mm para $1,1 \pm 0,7$ mm) e L ($0,2 \pm 0,4$ mm para $1,0 \pm 0,3$ mm). O grupo RAR ($0,3 \pm 0,7$ mm para $0,8 \pm 0,2$ mm) apresentou aumento da RG, porém sem diferenças significantes no período ($p > 0,05$). O grupo C ($0,5 \pm 1,0$ mm para $0,5 \pm 0,5$ mm) não alterou o valor da RG após 90 dias dos tratamentos. Diferenças significantes entre os grupos não foram encontradas ($p > 0,05$).

Os valores iniciais de IL-1 β diminuíram em RARL (509,6 pg/mL para 475,7 pg/mL), L (363,0 pg/mL para 327,7 pg/mL) e RAR (507,3 pg/mL para 293,9 pg/mL) e aumentaram para C (320,9 pg/mL para 489,3 pg/mL). Os níveis de IL-1 β observados não demonstraram diferenças significantes ($p > 0,05$) intra e inter grupos (figura 10).

Verificando na tabela 7 a porcentagem de sítios com bactérias presentes foram observadas mudanças em RARL como redução de *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Pn* e *Tf* ($p < 0,05$); em L redução de *Pg* ($p < 0,05$); em RAR e C não houve redução significativa na porcentagem dos sítios com prevalência de bactérias. Na comparação entre grupos RARL mostrou diferença na bactéria *Pg* para o grupo C ($p < 0,05$); na bactéria *Pn* para os grupos L, RAR e C; e em *Tf* para o grupo C. O grupo L mostrou diferença em *Pg* para o grupo C ($p < 0,05$); em *Pn* para os grupos RAR e C ($p < 0,05$).

180 dias pós-tratamentos

Na comparação entre o baseline e 180 dias após os tratamentos, IP reduziu significativamente ($p < 0,05$) para os grupos RARL (16,4%); L (22,9%) e RAR (19,7%), porém sem diferenças entre os grupos (figura 7).

O IG diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para RARL (52,4% para 17,9%) e RAR (42,7% para 19,1%). Para o grupo L (33,3% para 25,3%) houve uma

redução de IG, porém sem diferenças significantes quando comparado ao inicial. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$; figura 8). Após os tratamentos foi observada uma redução de SS significativa para os grupos RARL (32,7%), L (49,7%) e RAR (37,7%) ($p<0,05$; figura 9). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nesse período.

O valores das médias de PS reduziram significativamente para os grupos RARL ($6,5\pm1,2$ mm para $4,4\pm1,6$ mm), L ($6,4\pm1,1$ mm para $4,9\pm1,3$ mm) e RAR ($6,9\pm1,1$ mm para $4,7\pm1,5$ mm). Não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados RARL, L e RAR, conforme demonstrado na tabela 4.

Os resultados observados na tabela 5 demonstram uma melhora significativa da média do ganho de NI para os grupos RARL ($6,7\pm1,4$ mm para $5,6\pm2,0$ mm), L ($6,6\pm1,1$ mm para $6,0\pm1,3$ mm) e RAR ($7,2\pm1,3$ mm para $5,9\pm1,5$ mm; $p<0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os grupos. ($p>0,05$).

Um aumento significativo ($p<0,05$) de RG (tabela 6) foi observado para os grupos RARL ($0,2\pm0,7$ mm para $1,1\pm0,9$ mm), L ($0,2\pm0,4$ mm para $0,9\pm0,3$ mm) e RAR ($0,3\pm0,7$ mm para $0,9\pm0,5$ mm). Diferenças significantes entre os grupos não foram encontradas ($p>0,05$).

Os valores iniciais de IL-1 β diminuíram em RARL (509,6 pg/mL para 383,2 pg/mL), L (363,0 pg/mL para 299,7 pg/mL) e RAR (507,3 pg/mL para 305,9 pg/mL). Os níveis de IL-1 β observados não demonstraram diferenças significantes ($p>0,05$) intra e inter grupos (figura 10).

Em relação a porcentagem de sítios com bactérias presentes foram observadas mudanças em RARL como redução de *Aa*, *Pg*, *Pn* e *Tf* ($p<0,05$); em L redução de *Aa* ($p<0,05$); em RAR não houve redução significativa na porcentagem dos sítios com prevalência de bactérias quando comparado ao baseline. Na comparação entre grupos RARL mostrou diferença nas bactérias *Pg* e *Pn* para o grupo RAR ($p<0,05$). (tabela 7)

DISCUSSÃO

O presente trabalho, teve o objetivo de avaliar o efeito do laser de Er:YAG, associado ou não à raspagem e alisamento radicular (RAR), em comparação à terapia periodontal convencional de RAR, no tratamento de pacientes com periodontite crônica.

O cálculo da amostra foi realizado baseando-se no estudo de Schwarz et al.³⁰ (2001), onde foi considerando um poder do teste de 95%, nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,0 mm. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ($1-\beta=0,95$) e um intervalo de confiança $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 16 pacientes para receber cada tratamento. Para o presente estudo foram selecionados 21 pacientes considerando as possíveis perdas que poderiam ocorrer. Ao final do estudo, o cálculo da amostra foi recalculado com os dados obtidos no presente estudo e foi encontrado um tamanho mínimo de amostra de 18 pacientes.

A metodologia utilizada neste trabalho foi de boca dividida (split-mouth). Na literatura dos estudos periodontais, os autores⁵⁴ indicaram várias controvérsias no passado. Esse tipo de estudo tem a proposta de remover todos os fatores que possam interferir entre os sujeitos, na comparação dos tratamentos. A vantagem das comparações dentro do mesmo paciente (ao contrário das comparações entre os pacientes) é que a variação do erro de confusão do estudo pode ser reduzida, e dessa forma obter um alto poder estatístico com um menor número de pacientes selecionados para o estudo^{37,54}. No entanto, para alguns autores³⁷ nesse tipo de estudo os efeitos podem interagir entre os quatro métodos de tratamento, principalmente na redução microbiológica. Em nosso estudo os resultados não parecem ter sofrido esse problema.

Doze dias após os tratamentos, foram observadas pequenas mudanças clínicas nas variáveis IP, IG e SS. Redução ($p<0,05$) de IP foi notada para RARL e RAR quando comparados baseline e 12 dias e houve diferença no IP entre RARL e os demais grupos nesse período ($p<0,05$). Aumento de IG para os grupos L, RAR e C ($p<0,05$) foi observado e o grupo RARL apresentou IG menor que RAR e C. Os

grupos tratados RARL, L e RAR apresentaram redução no SS quando comparado ao baseline, porém sem diferenças encontradas entre os grupos. RARL e RAR reduziram significativamente o SS quando comparados ao C. Todos os grupos tratados RARL, L e RAR demonstraram redução significativa na porcentagem de sítios com presença de bactérias. O grupo RARL foi o que apresentou menor prevalência de bactérias presentes quando comparadas as diferenças entre os grupos. Esses achados corroboram em parte o estudo de Tomasi et al.³⁸ que demonstrou redução significativa de *Tf*, *Pg*, *Pi* e *Pn* na avaliação de 2 dias após a irradiação com o laser, porém sem diferença com a RAR com ultrassom.

Uma reavaliação de IP, IG, SS, IL-1 β e na prevalência de *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Pn* e *Tf* foi realizada nesse período na tentativa de verificar um possível efeito imediato dos tratamentos RARL e L, quando comparados somente à RAR e ao grupo sem tratamento. Esse efeito foi demonstrado em estudos que relatam que o laser de Er:YAG promove irregularidades nas superfícies das raízes^{16-21, 25}, porém sem o acúmulo de biofilme. Por isso o laser de Er:YAG associado à RAR poderia ser mais efetivo na remoção de irritantes da superfície da raiz.³² Uma detecção precoce da melhora clínica após o debridamento com o laser pode estar associada aos efeitos causados no tecido mole da bolsa peridontal (tecido de granulação). Alguns estudos sugerem que o efeito de ação da ablação do laser pode remover o epitélio da parede bolsa peridontal e o infiltrado de células inflamatórias presente na bolsa.^{39,40} Além disso, que a terapia com o laser de Er:YAG pode resultar em um aumento da proliferação de fibroblastos e componentes do sangue e dos mesmos na adesão na superfície radicular.²³⁻²⁵

Para o período de 30 dias após os tratamentos, várias mudanças puderam ser observadas nos diferentes grupos quando foram comparadas aos dados iniciais. O IP reduziu para os grupos RARL e RAR ($p < 0,05$), sendo que o grupo RARL mostrou melhores resultados quando comparados a RAR e C ($p < 0,05$). Houve redução de IG para o grupo RARL ($p < 0,05$) e aumento de IG para o grupo C ($p < 0,05$). RARL mostrou a redução do IG com significativa diferença quando comparado aos grupos L, RAR e C ($p < 0,05$). Os grupos L e RAR também foram diferentes quando comparados ao grupo C ($p < 0,05$). Os grupos tratados RARL, L

e RAR apresentaram redução no SS e ainda, quando comparados ao grupo C apresentaram redução significativa. ($p < 0,05$). A PS reduziu para os grupos RARL, L e RAR, com diferença entre RARL e C ($p < 0,05$). Houve um ganho de inserção significativa somente para o grupo RAR ($p < 0,05$), porém sem diferença entre os grupos avaliados. Um aumento significativo de RG ($p < 0,05$) para os grupos RARL e L foi observado, no entanto, sem diferenças significantes entre os grupos. Todos os grupos tratados RARL, L e RAR demonstraram redução significativa na porcentagem de sítios com presença de bactérias. Os grupos RARL, L e RAR apresentaram diferenças significantes na prevalência de bactérias quando foram comparados entre si e ainda quando comparados ao grupo C ($p < 0,05$).

Os achados encontrados 30 dias após os tratamentos estão de acordo com o trabalho de Tomasi et al.³⁸ que demonstrou uma redução de PS e um ganho de NI significantes, quando comparados ao inicial. Para os dois parâmetros foram encontradas diferenças significantes quando foi comparado laser com RAR com ultrassom. Esse estudo demonstrou redução significativa de *Tf*, *Pg*, *Pi* e *Pn* na avaliação de 30 dias após a irradiação com o laser, porém sem diferença entre os grupos.

Avaliações na redução da média de PS e a redução do SS apresentaram melhoras significantes clínicas e estatísticas dentro dos grupos tratados quando comparado o baseline e 30 dias após os tratamentos. Em estudos clínicos anteriores,³⁰⁻³² ocorreu uma significativa redução de SS em comparação com o baseline, não somente para os sítios tratados com o laser, mas também naqueles tratados somente com a RAR como em nosso estudo.

A maioria das diferenças observadas ocorreu nos períodos de 90 e 180 dias após os tratamentos, quando os dados foram comparados ao período inicial. Após os 90 dias do tratamento realizado, o grupo C foi excluído do estudo. Todos os sítios que não haviam recebido tratamento foram raspados com instrumentos manuais.

Para o período de 90 dias, o IP reduziu para todos os grupos do estudo ($p < 0,05$), sem diferença significativa entre os grupos. O IG reduziu para os grupos RARL e RAR ($p < 0,05$) e esses grupos demonstraram diferença quando comparados ao grupo C ($p < 0,05$). O SS reduziu para todos os grupos do estudo ($p < 0,05$), sem

diferença significativa entre os grupos. A PS reduziu para os grupos RARL, L e RAR ($p < 0,05$) e esses grupos demonstraram diferença quando comparados ao grupo C ($p < 0,05$). Um ganho de inserção significativa foi observado para RARL, L e RAR ($p < 0,05$), porém sem diferença significativa entre os grupos avaliados. Um aumento significativo de RG ($p < 0,05$) para os grupos RARL e L foi observado, no entanto, sem diferenças significantes entre os grupos. Os grupos RARL e L demonstraram redução significativa na porcentagem de sítios com presença de bactérias; apresentaram diferenças significantes na prevalência de bactérias quando foram comparados entre si e ainda quando comparados ao grupos RAR e C ($p < 0,05$).

As variáveis média de redução da PS e média de ganho do NI, demonstraram uma melhora clínica significativa, nos três grupos tratados. Já, a redução do SS foi significativa para todos os grupos avaliados, inclusive para o grupo C (que não recebeu tratamento). O resultado obtido no do grupo C está de acordo com outros estudos^{6,8,9} que demonstraram que um efetivo controle de placa supragengival, num período de 90 e 180 dias após o tratamento realizado, pode reduzir em 17% e 30%, respectivamente, o SS em sítios não tratados subgengivalmente.

Corroborando outros estudos clínicos com o laser³⁰⁻³², a redução da PS, o ganho do NI e a porcentagem de SS demonstraram uma melhora clínica significativa nos três grupos tratados. No entanto, diferentemente dos estudos já apresentados, em nosso estudo a média dos valores de RG aumentou ($p < 0,05$), IP diminuiu ($p < 0,05$) e IG aumentou ($p < 0,05$) significativamente para os três grupos.

Cento e oitenta dias após os tratamentos IP reduziu para os grupos RARL, L e RAR ($p < 0,05$), sem diferença significativa entre os grupos. O IG reduziu para os grupos RARL e RAR ($p < 0,05$) sem diferença significativa entre os grupos. O SS reduziu para todos os grupos do estudo ($p < 0,05$) sem diferença significativa entre os grupos. A PS reduziu para os grupos RARL, L e RAR ($p < 0,05$) sem diferença significativa entre os grupos. Um ganho NI foi observado para RARL, L e RAR ($p < 0,05$), porém sem diferença significativa entre os grupos avaliados. Um aumento significativo de RG ($p < 0,05$) para os grupos RARL, L e RAR foi observado, no entanto, sem diferenças significantes entre os grupos. Os grupos

RARL e L demonstraram redução significativa na porcentagem de sítios com presença de bactérias; o grupo RARL apresentou diferença quando comparado ao grupo RAR ($p < 0,05$).

Poucos estudos clínicos em humanos avaliaram o efeito da irradiação com laser de Er:YAG sobre superfície radicular combinado com a RAR³⁰. Schwarz et al.³² (2003) compararam o laser de Er:YAG (160mJ/pulso, 10Hz) com a RAR e laser em associação com RAR (L+RAR) em 20 pacientes. As análises clínicas foram feitas antes do tratamento, aos 3 e 6 meses após o mesmo. Nos estudos^{30,32}, após 90 dias, houve uma diminuição na média do NI de $6,3 \pm 1,1$ mm para $5,1 \pm 1,0$ mm, para o grupo do laser, de $6,5 \pm 1,0$ mm para $5,6 \pm 1,1$ mm, para o grupo RAR e de $6,9 \pm 1,0$ mm para $5,5 \pm 1,1$ mm para o grupo L+RAR. A média da PS foi reduzida para o grupo laser de $4,9 \pm 0,7$ mm para $3,5 \pm 0,6$ mm, para o grupo RAR de $5,0 \pm 0,6$ mm para $3,8 \pm 0,7$ mm e para o grupo L+RAR de $5,2 \pm 0,8$ mm para $3,5 \pm 0,7$ mm. Estes resultados foram estatisticamente significantes quando comparados aos dados iniciais intra e inter-grupos.

Após 180 dias^{30,32}, houve uma diminuição na média do NI de $6,3 \pm 1,1$ mm para $4,4 \pm 1,0$ mm, para o grupo do laser, de $6,5 \pm 1,0$ mm para $5,5 \pm 1,1$ mm, para o grupo RAR e de $6,9 \pm 1,0$ mm para $5,3 \pm 1,0$ mm para o grupo L+RAR. (com diferença entre os grupos laser e RAR e entre L+RAR e RAR). A média da PS foi reduzida para o grupo laser de $4,9 \pm 0,7$ mm para $2,9 \pm 0,6$ mm, para o grupo RAR de $5,0 \pm 0,6$ mm para $3,4 \pm 0,7$ mm e para o grupo L+RAR de $5,2 \pm 0,8$ mm para $3,1 \pm 0,7$ mm. Os resultados dos estudos^{30,32} foram estatisticamente significantes quando comparados aos dados iniciais para os diferentes grupos e ainda entre os grupos para o período.

Esses resultados diferem do nossos quando da comparação entre os grupos, pois não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos tratados em nosso estudo para os períodos de 90 e 180 dias, apesar de todos os parâmetros clínicos terem melhorado significantemente em cada período quando comparado ao baseline.

Em nosso estudo, a média de redução da PS foi maior que nos estudos de Schwarz et al.^{30,32} (2001; 2003). Esta discrepância pode ser justificada pelas diferenças

iniciais de PS. Nos estudos de Schwarz et al.^{30,32} (2001; 2003), as médias iniciais de PS, independente do grupo, foram por volta de 5,0 mm e no presente estudo, essas médias foram por volta de 6,0 mm. Estudos clínicos^{8,9} têm demonstrado que, uma redução na PS e um ganho no NI, tanto após tratamentos periodontais não-cirúrgicos, como cirúrgicos, dependem da PS inicial, ou seja, existe uma maior previsibilidade de sucesso na redução de PS, em bolsas mais profundas, independente do tipo de tratamento.

Apesar dos trabalhos clínicos^{30-33,38} demonstrarem um aumento na RG para os grupos que utilizaram o laser, as diferenças encontradas não foram significantes. Ao contrário destes achados, o presente estudo encontrou, em todos os períodos avaliados diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no aumento da RG para os dois grupos que utilizaram o laser de Er:YAG; porém, sem diferenças entre eles, apesar da redução do NI e da PS significantes ($p < 0,05$). Estes resultados podem estar relacionados à maior contração do tecido gengival e/ou à diminuição do edema; como também pode ser consequência do aumento da instrumentação nos grupos em que foi utilizado o laser de Er:YAG, provocando um possível dano no tecido gengival no momento do tratamento; ou estar relacionado com os parâmetros de irradiação utilizados. (densidade de energia do pulso e/ou com o tempo de irradiação).

Para a análise microbiológica no presente estudo foi utilizada a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR). Essa técnica é usada para analisar amostras provenientes de informações de material genético originado da bactéria contida na bolsa periodontal, não células vivas.

O efeito bactericida do laser de Er:YAG é atribuído às variações da morfologia e quantidade de água da bactéria, e o nível de pigmentação da sua parede celular.²⁹

Os trabalhos que analisaram a redução bacteriana com o uso do laser podem não ter encontrado diferenças entre os grupos para um mesmo período devido aos problemas encontrados nas técnicas utilizadas. De acordo com Tomasi et al.³⁸, (2006) reações cruzadas entre as sondas na técnica do *DNA-DNA hybridization* podem ocorrer. Em seu estudo não foram observadas diferenças na quantidade e na qualidade das bactérias estudadas entre os grupos laser e

ultrassom. No entanto, eles justificam que as bolsas periodontais estudadas eram de pacientes participantes de um programa de manutenção, por isso os sítios não estavam altamente infectados no baseline, dificultando a detecção de diferenças no efeito antimicrobiano dos tratamentos.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram outros estudos^{37,38} que observaram uma redução significativa das bactérias estudadas após o tratamento periodontal até os 90 dias após os baseline. A tendência demonstrada em nosso estudo, como no de Derdilopoulou et al.³⁷ (2007) é de um aumento dos sítios com presença de bactérias no intervalo entre 90 e 180 dias, porém sem diferença significativa entre os valores achados. Esse fato pode estar associado à presença elevada de sítios com presença de SS (entre 40 e 50%) e IG (entre 20 e 30%). Segundo Haffajee &, Socransky.¹ (1994) a presença de inflamação gengival em um sítio afeta muito a composição de sua microbiota. Bactéria como *Aa*, *Pg*, *Pi*, e *Tf* estão significativamente elevados em sítios que apresentam sangramento à sondagem, índice esse usado como um indicador clínico de inflamação periodontal. Os autores¹ acreditam que as espécies que se apresentam elevadas nos sítios inflamados podem ter se beneficiado da inflamação.

A diferença entre nosso estudo e os outros estudos clínicos^{37,38} que avaliaram as redução de bactérias encontradas nos sítios após o tratamento periodontal é que, em nosso estudo, o único grupo que continuou apresentando redução dos sítios com bactérias presentes foi o RARL até os 180 dias pós-tratamentos. E esse grupo apresentou prevalência menor de sítios ($p < 0,05$) com *Pg* e *Tf* quando comparado ao grupo RAR. Esse resultado sugere que apesar do nosso estudo e do de Schwarz et al.³² (2003) não demonstrarem diferenças clínicas significantes para a associação do laser com a RAR, os padrões microbiológicos parecem permanecer melhores quando existe essa associação. A diferença nestes resultados pode estar relacionada com o fato de que associando-se os dois procedimentos de laser e RAR pode-se obter o melhor resultado de cada um. A RAR retiraria o cálculo e os depósitos bacterianos presentes na raiz, deixando-a lisa e limpa e o laser promoveria uma ação de redução bacteriana deixando o ambiente da bolsa periodontal descontaminado.

Alguns autores³⁷ citam que os estudos calculam o tamanho da amostra e o poder do estudo baseados em variáveis clínicas. Sugerem que para analisar dados microbiológicos esse poder fica irreal e muitas vezes não chega-se a um resultado esperado, sendo necessário aumentar o tamanho da amostra para que as diferenças possam ser verificadas.

Estudo de Feist et al.²⁴.(2003) demonstrou que superfícies radiculares irradiadas com o laser utilizando uma densidade de energia de 3J/cm^2 seriam mais favoráveis para adesão de fibroblastos gengivais que as irradiadas com o laser utilizando uma densidades de 5 J/cm^2 ; muito embora, outro estudo²³ tenha demonstrado que $5,6\text{ J/cm}^2$ também favorece a proliferação fibroblástica.

No presente estudo foram utilizadas densidades de energia por pulso de $12,9\text{ J/cm}^2$ com o tempo de exposição variado, entre os grupos RARL e L. Em RARL, o laser foi utilizado como coadjuvante a RAR e, por isto, foi realizada irradiação durante 30 segundos por sítio, enquanto que em L, a superfície foi irradiada com o laser substituindo o procedimento de RAR com instrumentos manuais.

Embora tenha utilizado parâmetros de irradiação maiores (160mJ/pulso) que o do presente estudo (100mJ/pulso) para realizar a raspagem, Schwarz et al.³⁰⁻³² (2003) não verificaram diferenças significantes quanto à PS e NI, entre os tratamentos com laser e laser + RAR.

No presente estudo o laser de Er:YAG foi utilizado com energia de 100mJ/pulso . Theodoro et al. ²⁵(2006) utilizando energia de 100mJ/pulso evidenciou, in vitro, adesão de elementos sanguíneos em superfícies radiculares irradiadas, porém sem diferença com o grupo controle (RAR), demonstrando que, a irradiação de superfícies radiculares com este laser não interfere na adesão do coágulo sanguíneo.

A angulação em torno de 30° , entre a ponta de saída e a superfície radicular, utilizada em nossa metodologia, está baseada nos achados de Folwaczny et al.⁴⁹ (2001), que demonstram que a angulação clínica da aplicação do feixe laser de Er:YAG influencia, significantemente, na remoção de substâncias de superfícies radiculares.

Foi demonstrado *in situ*²⁹ que este laser pode promover danos térmicos em áreas profundas de superfície dentinária radicular irradiada, na base da bolsa periodontal. Os autores consideram que estes efeitos podem ser minimizados por intervalos entre as irradiações e pela irrigação com água, fatores estes, que mostram diminuir consideravelmente o aquecimento superficial e intrapulpar. Em nosso estudo todos os cuidados para minimizar os efeitos térmicos foram tomados (laser pulsado; aplicação sem contato e com sistema de refrigeração à água)

Theodoro et al.²⁰ (2003), por meio de MEV, demonstraram que as superfícies radiculares que não receberam tratamento, além da RAR e irrigação com água destilada, apresentaram irregularidades da superfície, e ainda que, a morfologia da superfície das raízes, após tratamento com laser de Er:YAG, torna-se mais irregular e rugosa, devido ao processo de ablação explosiva, concordando com achados de outros estudos. No entanto, estudo¹⁸ demonstrou que a remoção das estruturas radiculares, com o laser de Er:YAG, em baixas dosagens de energia (até 100mJ/pulso e 15Hz), são semelhantes à removidas com a instrumentação manual com curetas.

Os níveis de IL-1 β observados no estudo não demonstraram diferenças significantes ($p > 0,05$) intra e inter grupos em todos os períodos do estudo, mesmo quando os níveis da citocina pareceram relativamente altos, após os tratamentos.

A Interleucina 1-Beta (IL-1 β .) é uma citocina de reabsorção óssea altamente potente e responsável pela maior parte da atividade do chamado fator de atividade osteoclástica (OAF). É produzida principalmente por macrófagos e monócitos, mas também pode ser produzida por neutrófilos, sendo considerada a principal citocina presente no tecido gengival associada com periodontite. Sua liberação ocorre em resposta a substâncias imunoestimulatórias, como constituintes bacterianos, tais como os lipopolisacárides (LPS) e produtos da degradação tecidual.² Concentrações de LPS tão baixas, quanto 1ng/ml, são capazes de ativar a produção e liberação de quantidades de IL-1 β tão altas, quanto 100ng/10⁶ células, em um período de 24 horas.³ Outras atividades biológicas relacionadas ao seu papel, como mediador de destruição tecidual, na periodontite, incluem: a inibição da formação óssea; a estimulação da síntese de prostaglandinas e

tromboxano; a estimulação de collagenase e protease; além do aumento da adesão leucocitária, de células endoteliais e a estimulação de fibroblastos e queratinócitos.^{5, 53}

A detecção de citocinas em tecidos clinicamente saudáveis é esperada, pois um pequeno número de células inflamatórias crônicas está, usualmente, presente em tecidos gengivais clinicamente sadios.⁵ Um estudo⁴ estabeleceu um valor $>70,0\text{pg}/\mu\text{l}$ de IL-1 β no fluido crevicular, como demonstrativo de doença periodontal ativa. Outro trabalho.⁵⁰ determinou que valores de IL-1 β , no fluido crevicular, $>20\text{pg}/\mu\text{l}$ podem ser considerados para sítios com gengivite e valores $>102\text{pg}/\mu\text{m}$ para sítios com periodontite. No presente estudo todos os valores, independentemente, das PS e de presença ou ausência de SS, apresentaram-se acima destes padrões citados anteriormente. Estes achados indicam que a produção de IL-1 β não reflete simplesmente a presença de uma inflamação clinicamente visível entre os sinais clínicos de inflamação e a atividade de doença, estando de acordo com as divergências encontradas nos trabalhos.^{5,52,53}

Autores avaliaram⁵¹ que as respostas individuais, na secreção dos mediadores da inflamação, podem estar relacionadas com as diferenças nas várias formas de doença periodontal, resultando, então, em combinações de mediadores inflamatórios, suggestionando heterogeneidade na resposta individual do paciente à doença periodontal, bem como, ao seu tratamento. Existem, também, estudos que sugerem uma variabilidade individual em relação à expressão da IL-1 β no fluido crevicular⁵² e, ainda, que a variabilidade genética (como o polimorfismo de IL-1 β) é uma explicação plausível para esta ocorrência⁵³.

Os achados obtidos demonstraram que o laser de Er:YAG apresentou bons resultados microbiológicos no tratamento de bolsas periodontais sem contudo apresentar benefícios adicionais aos parâmetros clínicos e imunológicos analisados. Tais resultados indicam a necessidade de novos estudos com laser de Er:YAG para tratamento da doença periodontal crônica.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores gostariam de agradecer à KaVo Dental GmbH (Joinville, SC, Brasil), pelo empréstimo do equipamento de laser de Er:YAG para este estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.
- 2) Hanazawa S, Nakasa K, Ohmori Y, Miyoshi T, Amano S, Kitano S. Functional role of interleukin-1 in periodontal disease: induction of interleukin 1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharides in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infection and Immunity* 1985;50:262-270.
- 3) Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res* 1991; 26:230-242.
- 4) Alexander DC, Martin JC, King PJ, Powell JR, Caves J, Cohen ME. Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol* 1996;67:755-72.
- 5) Stashenko P, Fujiyoshi P, Obermeyer MJ, Prostak L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1991;18:548-554.
- 6) O'leary TJ. The impact of research on scaling and root planing. *J Periodontol* 1986;57:69-75.
- 7) Keping TJ, O'leary TJ, Kafrawy AH. Total calculus removal: An attainable objective *J Periodontol* 1990;61:16-20.
- 8) Baderstein A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981;8:57-72.
- 9) Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1992;9:115-128.
- 10) Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Annals of Periodontology* 1996;1: 443-490.

- 11) Sherman PR, Hutchens LH, Jewson LG, Moriarty JM, Greco GW, McFall WT. The effectiveness of subgingival scaling and root planing. I. Clinical detection of residual calculus. *J Periodontol* 1990;61:3-8.
- 12) Cobb CM. Lasers in Periodontics: A review of the literature. *J Periodontol* 2006;77:545-564.
- 13) Ben Hatit Y, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: An in vivo study. *J Clin Laser Med and Surg* 1996;14:137-143.
- 14) Radvar M, Macfarlane TW, Mackenzie D, Whittres CJ, Payne A P, Kinane DF. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br Dental J* 1996;180:57-62.
- 15) Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med* 1996;19:190-200.
- 16) Aoki A, Ando A, Watanabe H, Ishikawa I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an Er:YAG Laser. *J Periodontol* 1994;65:1097-1106.
- 17) Israel M, Cobb CM, Rossmann JA, Spencer P. The effects of CO₂, Nd:YAG and Er:YAG Lasers with and without surface coolant on tooth roots surfaces. *J Clin Periodontol* .1997;24:595-602.
- 18) Folwaczny M, Mehl A, Haffner C, Benz C, Hickel R. Root substance removal with Er:YAG laser radiation at different parameters using a new delivery system. *J Periodontol* 2000;71:147-155.
- 19) Aoki A, Miura M, Akiyama F, et al. In vitro evaluation of Er:YAG laser scaling of subgingival calculus in comparison with ultrasonic scaling. *J Periodontol Res* 2000;35:266-276.
- 20) Theodoro LH, Haypek P, Bachmann L et al. Effect of Er:YAG and Diode laser irradiation on the root surface: morphological and thermal analyses. *J Periodontol* 2003;74:838-843.
- 21) Theodoro LH, Garcia VG, Haypek P, Zezell DM, Eduardo CP. Morphologic analysis, by means of scanning electron microscopy, of the

- effect of Er:YAG laser on root surfaces submitted to scaling and root planing. *Bras Oral Res* 2002;16:308-312.
- 22) Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential application of Erbium:YAG laser in periodontics. *J Periodontol Res* 2004;39:275-285.
- 23) Schoop U, Moritz A, Kluger W M, et al. Changes in root surface morphology and fibroblast adherence after Er:YAG laser irradiation. *J Oral Laser Appl* 2002;2:83-93.
- 24) Feist IS, De Micheli G, Carneiro SR, Eduardo CP, Miyagi S, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. *J Periodontol* 2003;74:1398-1375.
- 25) Theodoro LH, Sampaio JEC, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and Diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. *J Periodontol Res* 2006; 41:381-390.
- 26) Crespi R, Romanos GE, Cassinelli C, Gherlone E. Effects of Er:YAG laser and ultrasonic system on fibroblast attachment to root surfaces : In vitro study. *J Periodontol* 2006;77:1217-1222.
- 27) Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. effect of Er:YAG laser combined with rhPDGF-BB on attachment of cultures fibroblast to periodontally involved root surfaces. *J Periodontol* 2007;78:1329-1341.
- 28) Schwarz F, Jepsen S, Heten M, Aoki A, Sculean A, Becker J. Immunohistochemical characterization of periodontal wound healing following nonsurgical treatment with fluorescence controlled Er:YAG laser irradiation in dogs. *Lasers Surg Med* 2007;39:428-440.
- 29) Folwaczny M, Benner KU, Flasskamp B, Mehl A, Hickel R. Effects of 2.94 μ m Er:YAG laser radiation on root surfaces treated in situ: a histological study. *J Periodontol* 2003;74:360-365.
- 30) Schwarz F, Sculean A, Georg T, Reich E. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to scaling and root planing. A controlled clinical study. *J Periodontol* 2001;72:361-367.

- 31) Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Georg T, Reich E, Becker J. Periodontal treatment with an Er:YAG laser or scaling and root planing. A 2-year follow-up split-mouth study. *J Periodontol* 2003;74:590-596.
- 32) Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Georg T, Reich E, Becker J. Clinical evaluation of an Er:YAG laser combined with scaling and root planing for non-surgical periodontal treatment. A controlled, prospective clinical study. *J Clin Periodontol* 2003;30: 26-34.
- 33) Crespi R, Cappare P, Toscanelli I, Gherlone E, Romanos GE. Effects of Er:YAG laser compared to ultrasonic scaler in periodontal treatment: a 2 year follow-up split-mouth clinical study. *J Periodontol* 2007;78:1195-1200.
- 34) Armitage G C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions *Annals of Periodontology* 1999;4:1-6.
- 35) Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dentistry J* 1975;25:229-235.
- 36) Johnson TC, Reinhardt RA, Payne JB, Dyr JK, Patie KD. Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. *J Clin Periodontol* 1997;24:618-625.
- 37) Derdilopoulou FV, Nonhoff J, Neumann K, Kielbassa AM. Microbiological findings after periodontal therapy using curettes, Er:YAG laser, sonic, and ultrasonic scalers. *J Clin Periodontol* 2007;34:588-598.
- 38) Tomasi C, Schander K, Dahlén G, Wennström JL. Short-term clinical and microbiologic effects of pocket debridement with and Er:YAG laser during periodontal maintenance. *J Periodontol* 2006;77:111-118.
- 39) Aoki A, Sasaki KM, Watanable H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2004;36:59-97.
- 40) Watanable H, Ishikawa I, Suzuki M, Hasegawa K. Clinical assessment of the erbium:YAG laser for soft tissue surgery and scaling. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14:67-75.
- 41) Ramfjord S, Caffesse R, Morrison E. Four modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-452.

- 42) Kaldahl W, Kalwarf KL, Patil KD, Moluar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol* 1996;67:93-102.
- 43) Kinane DF, Wistanley FP, Adonogranaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin – 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol* 1992;37:153-156.
- 44) Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 β concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994;65:423-428
- 45) Molvig J, Baek L, Christensen P et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E₂ shows stable inter-individual differences. *Scand J Immunol* 1988;27:705-716.
- 46) Liu C-M, Hou L-T, Wong M-Y, Lan W-H. Comparison of Nd:YAG laser versus scaling and root planing in periodontal therapy. *J Periodontol* 1999;70:1276-1282.
- 47) Yamaguchi H, Kobayashi K, Osada R et al. Effects of irradiation of an Erbium:YAG Laser on root surfaces. *J Periodontol* 1997;68:1151-1155.
- 48) Fujii T, Baehni PC, Kawai O, Kawakami T, Matsuda K, Kowashi Y. Scanning electron microscopic study of the effects of Er:YAG Laser on root cementum. *J Periodontol* 1998;69: 1283-1290.
- 49) Folwaczny M, Thiele L, Mehl A, Hickel R. The effect of working tip angulation on root substance removal using Er:YAG laser radiation: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2001;28: 220-226.
- 50) Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin 1 β levels in the gingival crevicular fluid in health and inflammatory periodontal disease. *J Periodontol Res* 2003;38: 111-114.
- 51) Shapira L, Soskolne WA, Sela MN, Offenbacher S, Barak V. The secretion of PG E₂, IL-1 β , IL-6, and TNF- α by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. *J Periodontol* 1994;65:139-146.

- 52) Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fisher RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:1457-1463.
- 53) Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29:48-53.
- 54) Hujoel PP & Loesche WJ. Efficiency of split-mouth designs. *J Clin Periodontol* 1990;17:722-728.

Legendas

Tabelas

Tabela 1 – Oligonucleotídeos bacterianos para as espécies avaliadas.

Tabela 2 – Condições da reação de PCR.

Tabela 3 – Comparação entre os tratamentos no início do estudo.

Tabela 4 – Profundidade de Sondagem (mm): média das medidas ($\pm$ DP, n=21 pacientes) dos diferentes grupos e períodos.

Tabela 5 – Nível de Inserção Clínico (mm): média das medidas ($\pm$ DP, n=21 pacientes) dos diferentes grupos e períodos.

Tabela 6 – Recessão Gengival (mm): média das medidas ($\pm$ DP, n=21 pacientes) dos diferentes grupos e períodos.

Tabela 7 – Porcentagem do número de sítios com prevalência das bactérias específicas estudadas nos diferentes grupos e períodos.

Figuras

Figura 1. Distribuição das proporções (%) obtidas para a variável IP para os grupos nos diferentes períodos.

* Diferença significativa quando comparado com o baseline no mesmo grupo.

Diferenças significantes quando comparado ao grupo RARL no mesmo período.

Teste Q de Cochran e Teste Exato de McNemar ($p < 0.05$).

Figura 2. Distribuição das proporções (%) obtidas para a variável IG para os grupos nos diferentes períodos.

* Diferença significativa quando comparado com o baseline no mesmo grupo.

Diferenças significantes quando comparado ao grupo RARL no mesmo período.

§ Diferenças significantes quando comparado ao grupo C no mesmo período

Teste Q de Cochran e Teste Exato de McNemar ($p < 0.05$).

Figura 3. Distribuição das proporções (%) obtidas para a variável SS para os grupos nos diferentes períodos.

* Significant difference when compared with baseline in the same group.

§ Significant differences when compared with C group in the same period.

Teste Q de Cochran e Teste Exato de McNemar ($p < 0.05$).

Figura 4. Média da concentração de Interleucina 1- β (pg/ml) $\pm$ SD para os diferentes grupos, nos períodos do estudo (n=21 patients).

Teste de Friedman e Teste de Dunn.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos bacterianos para as espécies avaliadas.

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5´ AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3´ 5´ GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3´	593 pb
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5´ AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3´ 5´ ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3´	557 pb
<i>Tannerella forsythia</i>	5´ GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3´ 5´ TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3´	641 pb
<i>Prevotella intermedia</i>	5´ TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3´ 5´ TAC ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3´	575 pb
<i>Prevotella nigrescens</i>	5´ TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3´ 5´ ATG GCG AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3´	1100 pb

Tabela 2 – Condições da reação de PCR.

Primer	Condição da reação
<i>Inespecífico</i>	95 °C, 5minutos; 96 °C, 30 seg, 45 °C, 30seg, 72 °C, 30seg (30 ciclos)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythia</i>	95 °C, 2minutos; 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1minuto, 72 °C, 1minuto (36 ciclos)
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>Prevotella intermedia</i>	95 °C, 2minutos; 94 °C, 30 seg, 55 °C, 1minuto, 72 °C, 1minuto (36 ciclos)
<i>Prevotella nigrescens</i>	95 °C, 2minutos; 95 °C, 30 seg, 65 °C, 1minuto, 72 °C, 1minuto (36 ciclos)

Tabela 3 – Comparação entre os tratamentos no início do estudo.

Variáveis	Tratamentos (n= 21 pacientes por grupo)				Diferença entre grupos
	RARL	L	RAR	C	
IP(%)	43,86	38,10	52,38	42,86	$p>0,05^*$
IG(%)	52,38	33,33 [#]	42,68	47,62	$P<0,05^*$
SS(%)	100	100	100	100	//
PS(mm)	6,48±1,2	6,42±1,1	6,87±1,1	6,28±0,9	$p>0,05^{**}$
NI(mm)	6,71±1,4	6,61±1,1	7,20±1,3	6,80±1,5	$p>0,05^{**}$
RG(mm)	0,24±0,7	0,19±0,4	0,33±0,7	0,52±1,0	$p>0,05^{***}$
IL-1β(pg/mL)	509,6±317,1	363,0±232,0	507,3±317,8	320,9±206,0	$p>0,05^{***}$

[#]Diferenças significantes quando comparado ao grupo RARL no mesmo período.

* Teste Q de Cochran e Teste Exato de McNemar

**Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA) e Teste de Tukey.

*** Teste de Friedman e Teste de Dunn.

Tabela 4 – Profundidade de Sondagem (mm): média das medidas (± DP, n=21 pacientes) dos diferentes grupos e períodos.

Grupos	Baseline	1 mês	3 meses	6 meses	Diferença entre T ₀ e demais tempos*
RARL	6,48±1,2	4,80±1,3 ^{A*}	4,57±1,5 ^{B*}	4,38±1,6 [*]	$p<0,05$
L	6,42±1,1	5,30±1,2 [¥]	5,11±1,3 ^{C¥}	4,88±1,3 [¥]	$p<0,05$
RAR	6,87±1,1	5,20±1,4 [€]	4,92±1,6 ^{DE}	4,64±1,5 [€]	$p<0,05$
C	6,28±0,9	6,30±0,9 ^A	6,71±0,8 ^{BCD}	//	$p>0,05$
Diferença entre grupos*	$p>0,05$	$p<0,05$	$p<0,05$	$p>0,05$	

*Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA) e Teste de Tukey.

Letras iguais significam grupos com diferenças estatisticamente significantes na mesma coluna.

Símbolos sobre os valores significam diferença significativa com Baseline no mesmo grupo na mesma linha.

Tabela 5 – Nível de Inserção Clínico (mm): média das medidas ($\pm$ DP, n=21 pacientes) dos diferentes grupos e períodos.

Grupos	Baseline	1 mês	3 meses	6 meses	Diferença entre T ₀ e demais tempos*
RARL	6,71 $\pm$ 1,4	6,50 $\pm$ 1,4	5,88 $\pm$ 2,1 [*]	5,64 $\pm$ 2,0 [*]	$p < 0,05$
L	6,61 $\pm$ 1,1	6,58 $\pm$ 1,3	6,33 $\pm$ 1,7 [¥]	6,01 $\pm$ 1,3 [¥]	$p < 0,05$
RAR	7,20 $\pm$ 1,3	6,72 $\pm$ 1,3 [€]	6,01 $\pm$ 1,2 [€]	5,85 $\pm$ 1,5 [€]	$p < 0,05$
C	6,80 $\pm$ 1,5	6,94 $\pm$ 1,4	6,83 $\pm$ 1,5	//	$p > 0,05$
Diferença entre grupos*	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	

*Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA) e Teste de Tukey.

Letras iguais significam grupos com diferenças estatisticamente significantes.

Símbolos sobre os valores significam diferença significativa com Baseline no mesmo grupo.

Tabela 6 – Recessão Gengival (mm): média das medidas ($\pm$ DP, n=21 pacientes) dos diferentes grupos e períodos.

Grupos	Baseline	1 mês	3 meses	6 meses	Diferença entre T ₀ e demais tempos*
RARL	0,24 $\pm$ 0,70	1,05 $\pm$ 1,12 [*]	1,06 $\pm$ 0,70 [*]	1,07 $\pm$ 0,86 [*]	$p < 0,05$
L	0,19 $\pm$ 0,40	0,86 $\pm$ 0,91 [¥]	0,99 $\pm$ 0,33 [¥]	0,90 $\pm$ 0,33 [¥]	$p < 0,05$
RAR	0,33 $\pm$ 0,66	0,81 $\pm$ 1,17	0,83 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,49 [€]	$p < 0,05$
C	0,52 $\pm$ 0,98	0,62 $\pm$ 1,02	0,52 $\pm$ 0,47	//	$p > 0,05$
Diferença entre grupos*	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	

*Teste de Friedman e Teste de Dunn.

Letras iguais significam grupos com diferenças estatisticamente significantes.

Símbolos sobre os valores significam diferença significativa com Baseline no mesmo grupo.

Tabela 7 – Porcentagem do número de sítios com prevalência das bactérias específicas estudadas nos diferentes grupos e períodos.

Grupos e Bactérias	Baseline	12 dias	1 mês	3 meses	6 meses	≠ entre T ₀ e demais tempos
RARL						
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	38,1	9,5 ^{*bc}	9,5 ^{*p}	14,3 [*]	14,3 [*]	$p<0,05$
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	71,4	19 ^{*fg}	14,3 ^{*rs}	23,8 ^{*F}	28,6 ^{*N}	$p<0,05$
<i>Prevotella intermedia</i>	47,6	23,8 [*]	28,6	23,8 [*]	28,6	$p<0,05$
<i>Prevotella nigrescens</i>	19 ^a	4,8 ^{*i}	0 ^{*vwy}	4,8 ^{*HIJ}	9,5 ^{*O}	$p<0,05$
<i>Tannerella forsythia</i>	76,2	14,3 ^{*m}	19 ^{*C}	28,6 ^{*M}	33,3 [*]	$p<0,05$
L						
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	28,6	4,8 ^{ebde}	9,5 ^{eq}	19,0	14,3 ^e	$p<0,05$
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	66,7	23,8 ^{eh}	19 ^{etu}	28,6 ^{EG}	38,1	$p<0,05$
<i>Prevotella intermedia</i>	42,9	28,6	33,3	42,9	47,6	$p>0,05$
<i>Prevotella nigrescens</i>	9,5 ^a	4,8 ^{ejk}	4,8 ^{evzA}	9,5 ^{HKL}	14,3	$p<0,05$
<i>Tannerella forsythia</i>	66,7	19,1 ^{en}	28,6 ^{ED}	38,1	42,9	$p<0,05$
RAR						
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	33,3	14,3 ^{yd}	14,3 ^y	23,8	19	$p<0,05$
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	61,9	42,9 ^f	38,1 ^{rt}	42,9	52,4 ^N	$p>0,05$
<i>Prevotella intermedia</i>	52,4	33,3	33,3	38,1	42,9	$p>0,05$
<i>Prevotella nigrescens</i>	14,3	9,5 ^{ijl}	9,5 ^{wzB}	19 ^{IK}	23,8 ^O	$p>0,05$
<i>Tannerella forsythia</i>	71,4	23,8 ^{yo}	33,3 ^{YE}	42,9	52,4	$p<0,05$
C						
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	23,8	19 ^{ce}	19 ^{pq}	23,8	//	$p>0,05$
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	66,7	57,1 ^{gh}	42,9 ^{su}	61,9 ^{FG}	//	$p>0,05$
<i>Prevotella intermedia</i>	38,1	38,1	33,3	38,1	//	$p>0,05$
<i>Prevotella nigrescens</i>	19	23,8 ^{ikl}	23,8 ^{yAB}	28,6 ^{JL}	//	$p>0,05$
<i>Tannerella forsythia</i>	66,7	61,9 ^{mno}	61,9 ^{CDE}	57,1 ^M	//	$p>0,05$

*Teste Q de Cochran e Teste Exato de MacNemar; ($p<0,05$).

Símbolos sobre os valores significam diferença significativa com Baseline no mesmo grupo.

Letras iguais significam grupos com diferenças estatisticamente significantes.

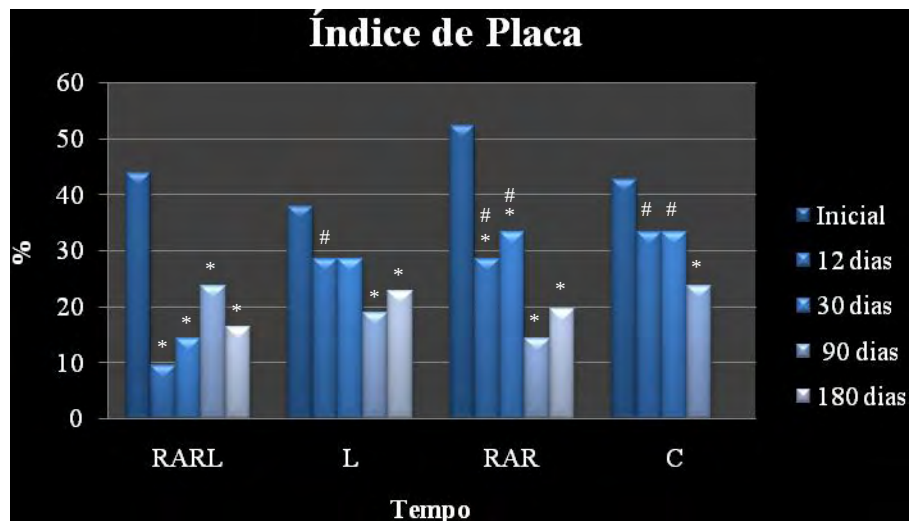


FIGURA 1. Distribuição das proporções (%) obtidas para a variável IP para os grupos nos direfrentes períodos.

*Diferenças significantes quando comparado com o baseline no mesmo grupo.

#Diferenças significantes quando comparado ao grupo RARL no mesmo período.

Teste Q de Cochran e Teste Exato de McNemar ($p < 0.05$).

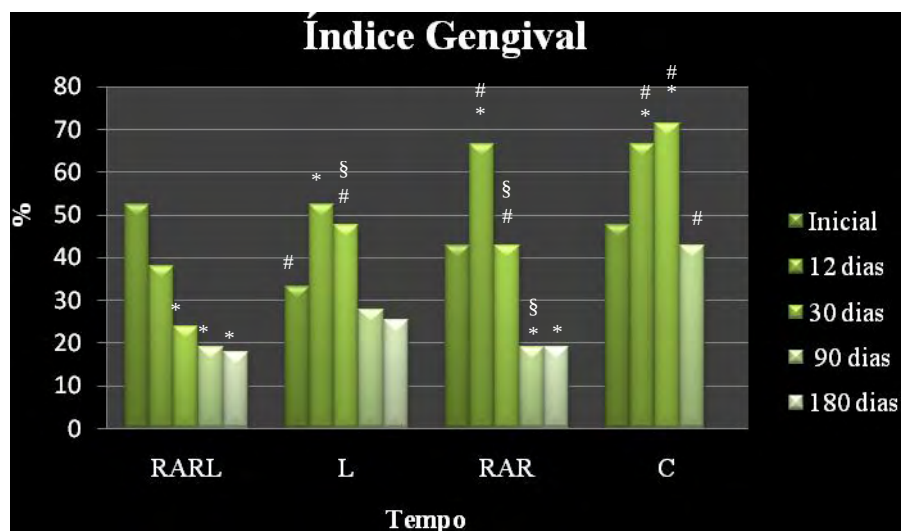


FIGURA 2. Distribuição das proporções (%) obtidas para a variável IG para os grupos nos direfrentes períodos.

*Diferenças significantes quando comparado com o baseline no mesmo grupo.

#Diferenças significantes quando comparado ao grupo RARL no mesmo período.

§Diferenças significantes quando comparado ao grupo C no mesmo período

Teste Q de Cochran e Teste Exato de McNemar ($p < 0.05$).

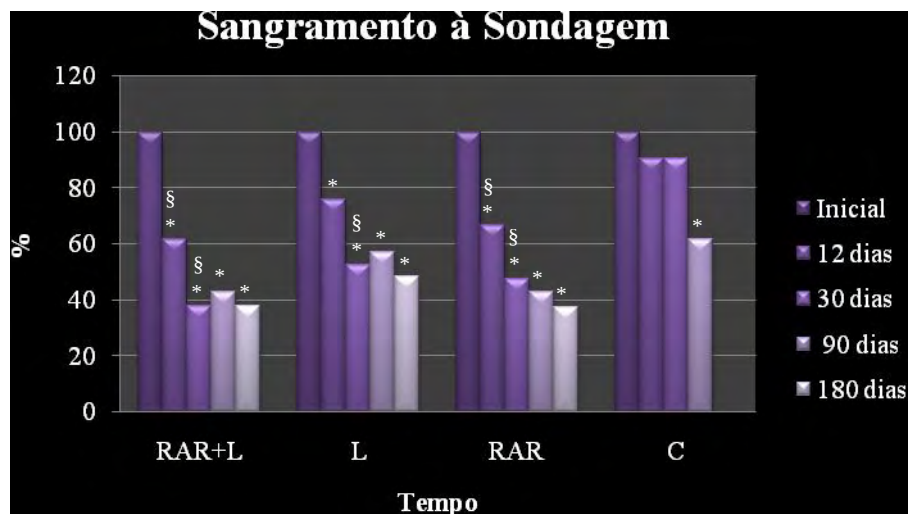


FIGURA 3. Distribuição das proporções (%) obtidas para a variável SS para os grupos nos direfrentes períodos.

*Diferenças significantes quando comparado com o baseline no mesmo grupo.

§Diferenças significantes quando comparado ao grupo C no mesmo período
Teste Q de Cochran e Teste Exato de McNemar ($p < 0.05$).

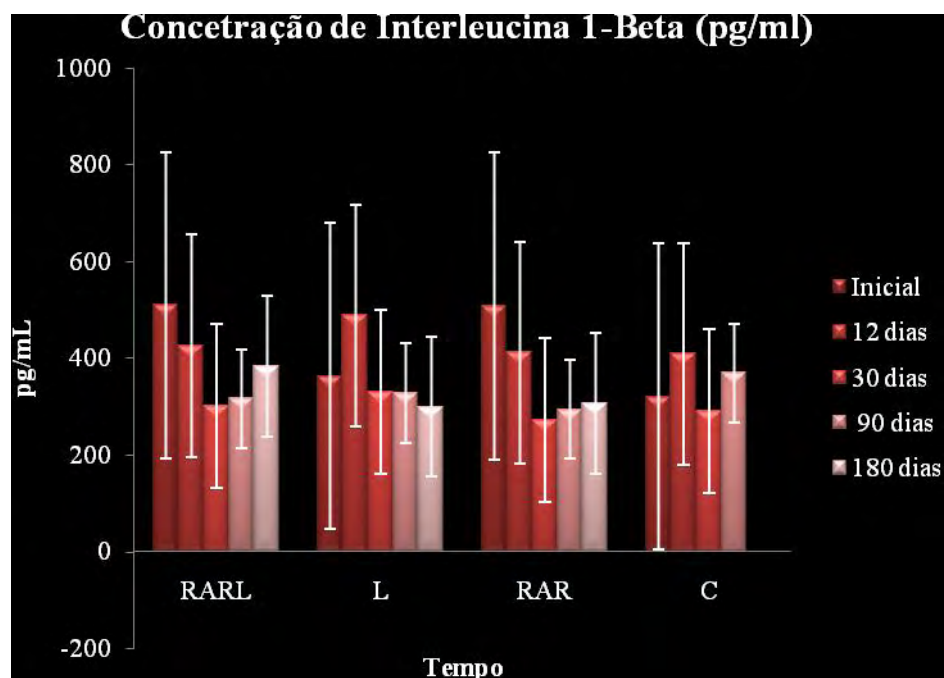


FIGURA 4. Média da concentração de Interleucina 1-β (pg/ml) ± SD para os diferentes grupos, nos períodos do estudo (n=21 pacientes).

Teste de Friedman e Teste de Dunn.

5 Discussão

O propósito do presente estudo foi avaliar clínica, imuno e microbiologicamente a resposta inicial e longitudinal do efeito do laser de Er:YAG em bolsas peridontais com doença periodontal crônica. Os participantes do estudo foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão descritos na metodologia.

A metodologia utilizada neste trabalho foi de boca dividida (split-mouth). Na literatura dos estudos periodontais os autores³² indicaram várias controvérsias no passado. Esse tipo de estudo tem a proposta de remover todos os fatores que possam interferir entre os sujeitos na comparação dos tratamentos. A vantagem das comparações dentro do mesmo paciente (ao contrário das comparações entre os pacientes) é que a variação do erro de confusão do estudo pode ser reduzida, e dessa forma obter um alto poder estatístico com um menor número de pacientes selecionados para o estudo³². No entanto, para alguns autores²⁰ nesse tipo de estudo os efeitos podem interagir entre os quatro métodos de tratamento, principalmente na redução microbiológica. Em nosso estudo os resultados não parecem ter sofrido esse problema.

As análises clínicas de IP, IG e SS e as análises imuno e microbiológicas foram realizadas após 12, 30, 90 e 180 dias dos tratamentos para que fosse verificado o efeito imediato do uso do laser de Er:YAG.

As análises clínicas que necessitavam de exame com sonda periodontal (PS, NI e RG) foram realizadas 30, 90 e 180 dias após os tratamentos. Estudos relatam que a avaliação da resposta do periodonto à RAR não deve ser realizada antes de 4 semanas após o tratamento.^{19,36} Mensurações tomadas prematuramente podem representar uma cicatrização incompleta dos tecidos e ser interpretada erroneamente como resposta insatisfatória aos tratamentos.

Autores relatam que as maiores reduções da PS e do ganho de NI ocorrem entre 1 e 3 meses após a RAR, embora a cicatrização e maturação final possam ocorrer até 9 e 12 meses após o tratamento.¹⁴

Acredita-se que o rigoroso programa de controle de placa supragengival realizado durante o estudo foi o responsável pelas reduções significantes dos IP, IG e SS no decorrer dos períodos^{18,29}. O SS pode ter regredido devido aos tratamentos, mas somente o controle de placa supragengival explica a redução do SS para o grupo controle (que não foi tratado) após 90 dias³⁷.

Os dados de IP e IG alcançados aos 12 e 30 dias foram mantidos até os 6 meses em todos os grupos. Isso pode ter ocorrido devido aos pacientes estarem inseridos em um programa de controle de higiene oral há 6 meses antes do início dos tratamentos.

Após os 90 dias do tratamento realizado, o grupo C foi excluído do estudo. Todos os sítios que não haviam recebido tratamento foram raspados com instrumentos manuais. Nesse momento, nem todos os sítios do grupo C apresentavam doença ativa, ou seja, progressão de perda de NI. No entanto, no projeto de pesquisa enviado ao Comitê de Ética os pesquisadores se comprometeram a tratar os sítios não tratados aos 90 dias, condição essa solicitada pelo Comitê para que o projeto fosse aprovado. Esses sítios poderiam ter sido acompanhados até os 180 dias, desde que fossem monitorados para que a perda do NI não fosse maior que 1 mm.

As mudanças clínicas ocorridas, no grupo RAR parecem estar de acordo com estudos clínicos que descreveram a efetividade do tratamento não-cirúrgico na terapia periodontal. Estes estudos demonstram que o tratamento de RAR subgengival melhora significativamente as condições clínicas periodontais, por meio de diminuição da PS, ganho no NI e diminuição na prevalência do SS^{9,36,40}.

A redução da PS para os grupos tratados pode estar associado com o ganho do NI ou com o aumento da RG. Discrepâncias entre os estudos, podem ser explicadas por uma diferença na PS inicial. Estudos clínicos^{9,36,40} têm demonstrado que diminuição de PS e ganho de NI após tratamento periodontal não cirúrgico depende da PS inicial e que existe uma grande probabilidade de sucesso da redução de PS em bolsas mais profundas independente do tipo de tratamento.

Alguns autores⁴⁵ relatam que mudanças reais em PS e NI dificilmente podem ser diferenciadas de um erro de sondagem a menos que exceda 2 mm. Para minimizar esse erro foram realizadas sondagens com força padronizada, sonda computadorizada e placas de acrílico para padronizar a posição de inserção da sonda periodontal.

Os resultados encontrados para RG diferem dos demais trabalhos clínicos^{55,57-58} e podem estar relacionados com uma maior contração do tecido gengival e/ou a uma redução do edema gengival após os tratamentos provocados pelo laser de forma mais acentuada. Esses resultados podem estar associados ao tempo necessário para a instrumentação nos grupos que usaram o laser. No grupo RARL o tempo de irradiação com o laser foi de 30 s mais o tempo da RAR com as curetas. No grupo L o tempo de irradiação variou de 180 a 240 s. Esses fatos podem explicar a ocorrência dos danos térmicos causados pela irradiação do laser ou pela resposta imunológica individual dos pacientes frente ao tratamento.

Os resultados clínicos do presente estudo podem estar relacionados com um grupo de fatores como a energia usada durante a irradiação, a característica final das superfícies radiculares após a irradiação, posicionamento e angulação da ponta do laser e do efeito bactericida do laser⁶⁸.

Uma grande variação na resposta inflamatória de um indivíduo para o outro tem sido verificada.⁴⁴ Estudos observaram consideráveis variações na produção de IL-1 β no processo inflamatório, tanto para gengivite,³⁹ como para periodontite,⁵¹ demonstrando que estes resultados podem estar relacionados a uma resposta heterogênea, ou seja, uma resposta imunológica individual, quando os estudos envolvem diferentes pacientes.^{21,24,59}

A presença ou ausência do SS é usada como parâmetro clínico para avaliar atividade ou não de doença periodontal. No entanto, no presente estudo, após 90 e 180 dias, mesmo havendo uma melhora significativa ($p < 0,05$) na redução do SS, para os diferentes grupos, nenhuma alteração significativa foi observada em relação aos níveis de IL-1 β .

Somente um estudo⁴¹ demonstrou os efeitos dos lasers de alta intensidade nos níveis de IL-1 β usando o laser de Nd:YAG em tratamento de bolsas

periodontais. No estudo os autores demonstraram que a RAR convencional foi suficiente para diminuir os níveis de IL-1 β no fluido crevicular quando comparados o uso de laser e associação de laser e RAR.

Para a análise microbiológica no presente estudo foi utilizada a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR). Essa técnica é usada para analisar amostras provenientes de informações de material genético originado da bactéria contida na bolsa periodontal, não células vivas. É analisada a presença ou ausência de sítios com bactérias presentes ou ausentes sem saber a quantidade bacteriana e se essas bactérias estão viáveis ou não.

A composição bacteriana modificada após a raspagem representa a base para a cicatrização periodontal expressa como redução de profundidade de sondagem e ganho de inserção.⁶² Estudo demonstram que quando a periodontite progride apesar do tratamento, altos níveis de *Aa*⁷⁰, *Pg* e *Pi*^{12,30,45} e *Tf*¹² foram encontrados na placa subgengival. O nosso estudo mostrou reduções significantes no número de sítios com bactérias presentes, no entanto esse quadro tendeu a aumentar após os 90 e 180 dias dos tratamentos. Esse fato pode estar associado à presença elevada de sítios com presença de SS (entre 40 e 50%) e IG (entre 20 e 30%). Segundo Haffajee, Socransky²⁹ (1994) a presença de inflamação gengival em um sítio afeta muito a composição de sua microbiota. Bactéria como *Aa*, *Pg*, *Pi*, e *Tf* estão significativamente elevados em sítios que apresentam sangramento à sondagem, índice esse usado como um indicador clínico de inflamação periodontal. Os autores^{29,62,63} acreditam que as espécies que se apresentam elevadas nos sítios inflamados podem ter se beneficiado da inflamação, em parte porque elas eram as mais próximas da fonte de fluido do sulco gengival (as primeiras no canal de alimentação) e, em parte, porque esse fluido pode estar enriquecido com produtos de degradação tecidual que podem favorecer o crescimento de muitas espécies que requerem proteínas ou podem usar produtos metabólicos finais ou outras espécies para seu crescimento.^{29,42,62,63}

O alto poder bactericida do laser de Er:YAG é uma das maiores justificativas dos trabalhos, para seu uso no tratamento periodontal.^{3,20,55,57-58,69} O laser tem seu efeito bactericida atribuído às variações da morfologia e quantidade

de água da bactéria, e o nível de pigmentação da parede celular bacteriana e ainda os trabalhos in vitro demonstram que essa irradiação não remove todo o cimento radicular.²⁶

A literatura mostra divergências sobre a quantidade necessária de remoção de cimento, para a criação de uma superfície radicular biocompatível, como o efeito das rugosidades nas superfícies radiculares.^{46,47} Alguns trabalhos demonstram que, em áreas subgengivais, a presença de rugosidade não é um fator que influencie de forma negativa o sucesso do tratamento periodontal.^{38,48} No presente estudo os resultados de NI, PS e SS demonstram que os tratamentos foram efetivos no controle da placa subgengival. Nos grupos, em que foi utilizado o laser de Er:YAG, as rugosidades das superfícies radiculares não interferiram no resultado dos tratamentos observado pela melhora clínica obtida. Estudos demonstram que a desintoxicação do cimento parece ser mais importante, que uma terapia que o remova.^{46,47}

Os resultados clínicos obtidos no presente estudo foram, de certa maneira semelhantes aos encontrados em outros estudos clínicos^{17,20,55,57-58,69} que usaram o laser de Er:YAG. No entanto, todos os trabalhos clínicos citados anteriormente^{16,20,55,57-58,69} que usaram o laser utilizaram doses de 160mJ/pulso; 10Hz de frequência. A dose utilizada em nosso trabalho foi de 100mJ/pulso; 10Hz de frequência e está mais adequada para não promover danos térmicos à superfície radicular.⁶⁸

Uma comparação entre vários estudos clínicos que utilizaram o laser de Er:YAG e RAR para o tratamento da doença periodontal crônica é muito difícil nesse momento. As razões para essa dificuldade são as variações nos parâmetros do laser e dados insuficientes desses parâmetros para que a metodologia seja reproduzida; diferenças no desenho do estudo; diferença na severidade da doença e na resposta dos tratamentos e diferenças nas mensurações clínicas nos períodos reavaliados.

Embora existam limitações nos resultados desse estudo, o laser de Er:YAG associado à RAR pareceu ser uma alternativa favorável para o tratamento de bolsas periodonatais com benefícios na redução de sítios com presença de

bactérias periodontopatógenas. Porém, como não houve benefícios para os parâmetros clínicos quando comparado à RAR convencional outros estudos com o laser de Er:YAG devem ser realizados.

6 Conclusão

Dentre as limitações deste estudo e de acordo com os resultados clínicos, imunológicos e microbiológicos obtidos, concluiu-se que a irradiação com o laser de Er:YAG, associado ou não a raspagem, como alternativa para o tratamento de bolsas periodontais promove benefícios microbiológicos sem, contudo, apresentar alterações clínicas e imunológicas significativas.

7 Referências *

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dentistry J.* 1975;25:229-35.
2. Alexander DC, Martin JC, King PJ, Powell JR, Caves J, Cohen ME. Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and imunoglobulin G subclasses in gingival fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol.* 1996;67:755-72.
3. Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med.* 1996;19:190-200.
4. Aoki A, Ando A, Watanabe H, Ishikawa I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an Er:YAG Laser. *J Periodontol.* 1994;65:1097-106.
5. Aoki A, Miura M, Akiyama F, Nakagawa N, Tanaka J, Oda S, et al. In vitro evaluation of Er:YAG laser scaling of subgingival calculus in comparison with ultrasonic scaling. *J Periodontol Res.* 2000;35:266-76.
6. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2004;36:59-97.
7. Armitage G C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions *Ann Periodontol.* 1999;4:1-6.
8. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11:266-73.
9. Baderstein A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1981;8:57-72.

*De acordo com estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. effect of Er:YAG laser combined with rhPDGF-BB on attachment of cultures fibroblast to periodontally involved root surfaces. J Periodontol. 2007;78:1329-41.
11. Ben Hatit Y, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: an in vivo study. J Clin Laser Med and Surg. 1996;14:137-43.
12. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetencomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. J Clin Periodontol. 2000;27:903-97.
13. Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. Ann Periodontol. 1996;1: 443-90.
14. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy an evidence-based perspective of scaling and root planing. J Clin Periodontol. 2002;29(Suppl2):6-16.
15. Cobb CM. Lasers in Periodontics: A review of the literature. J Periodontol. 2006;77:545-64.
16. Crespi R, Romanos GE, Cassinelli C, Gherlone E. Effects of Er:YAG laser and ultrasonic system on fibroblast attachment to root surfaces : In vitro study. J Periodontol. 2006;77:1217-22.
17. Crespi R, Cappare P, Toscanelli I, Gherlone E, Romanos GE. Effects of Er:YAG laser compared to ultrasonic scaler in periodontal treatment: a 2 year follow-up split-mouth clinical study. J Periodontol. 2007;78:1195-1200.
18. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effects of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12 month results. J Clin Periodontol. 2000;27:30-6.
19. Dahlén G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival flora in periodontal pockets. J Clin Periodontol. 1992;19:802-9.

20. Derdilopoulou FV, Nonhoff J, Neumann K, Kielbassa AM. Microbiological findings after periodontal therapy using curettes, Er:YAG laser, sonic, and ultrasonic scalers. *J Clin Periodontol.* 2007;34:588-98.
21. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2002;29:48-53.
22. Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin 1 β levels in the gingival crevicular fluid in health and inflammatory periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2003;38:111-4.
23. Feist IS, De Micheli G, Carneiro SR, Eduardo CP, Miyagi S, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. *J Periodontol.* 2003;74:1368-75.
24. Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fisher RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:1457-63.
25. Folwaczny M, Thiele L, Mehl A, Hickel R. The effect of working tip angulation on root substance removal using Er:YAG laser radiation: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2001;28: 220-6.
26. Folwaczny M, Benner KU, Flasskamp B, Mehl A, Hickel R. Effects of 2.94 μ m Er:YAG laser radiation on root surfaces treated in situ: a histological study. *J Periodontol.* 2003;74:360-5.
27. Folwaczny M, Mehl A, Haffner C, Benz C, Hickel R. Root substance removal with Er:YAG laser radiation at different parameters using a new delivery system. *J Periodontol.* 2000;71:147-55.
28. Fujii T, Baehni PC, Kawai O, Kawakami T, Matsuda K, Kowashi Y. Scanning electron microscopic study of the effects of Er:YAG Laser on root cementum. *J Periodontol.* 1998;69: 1283-90.
29. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 1994;5:78-111.

30. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters os periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1997;24:324-34.
31. Hanazawa S, Nakasa K, Ohmori Y, Miyoshi T, Amano S, Kitano S. Functional role of interleukin–1 in periodontal disease: induction of interleukin 1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharides in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. Infect Immun. 1985;50:262-70.
32. Hujoel PP & Loesche WJ. Efficiency of split-mouth designs. J Clin Periodontol. 1990;17:722-8.
33. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential application of Erbium:YAG laser in periodontics. J Periodontol Res. 2004;39:275-85.
34. Israel M, Cobb CM, Rossmann JA, Spencer P. The effects of CO₂, Nd:YAG and Er:YAG Lasers with and without surface coolant on tooth roots surfaces. J Clin Periodontol. .1997;24:595-602.
35. Johnson TC, Reinhardt RA, Payne JB, Dyr JK, Patie KD. Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. J Clin Periodontol. 1997;24:618-25.
36. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. J Periodontol. 1988;59:783-93.
37. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. J Periodontol. 1996;67:93-102.
38. Kathiblou FA, Ghoddsi A. Root surface smoothness or roughness in periodontal treatment. J Periodontol. 1983;54: 365-7.
39. Kinane DF, Wistanley FP, Adonogranaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin – 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. Arch Oral Biol. 1992;37:153-6.

40. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol. 1992;9:115-28.
41. Liu C-M, Hou L-T, Wong M-Y, Lan W-H. Comparison of Nd:YAG laser versus scaling and root planing in periodontal therapy. J Periodontol. 1999;70:1276-82.
42. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. J Clin Periodontol. 1984;11:193-207.
43. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. Nature. 1960;187:493-4.
44. Molvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable inter-individual differences. Scand J Immunol. 1988;27:705-16.
45. Mombelli A, Schmidt B, Rutar A, Lang NP. Persistent patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. J. Periodontol. 2000; 71:14-21.
46. Nyman S, Sarhed G, Ericsson I, Gottlow J, Karring T. Role of “diseased” root cementum in healing following treatment of periodontal disease. An experimental study in dog. J. Periodontol Res. 1986; 21:496-503.
47. Nyman S, Westfelt E, Sarhed G, Karring T. Role of “diseased” root cementum in healing following treatment of periodontal disease. A clinical study. J Clin Periodontol. 1988;15:464-8.
48. Oberholzen R, Rateitschak KH. Root cleaning or root smoothing. J Clin Periodontol. 1996;23: 326-30.
49. Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res. 1991; 26:230-42.
50. Persson GR, Page RC. Effect of sampling time and repetition on gingival crevicular fluid and aspartate aminotransferase activity. J Periodontol. 1990; 25:236-42.

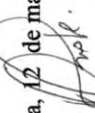
51. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 β concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1994;65:423-8.
52. Radvar M, Macfarlane TW, Mackenzie D, Whittres CJ, Payne A P, Kinane DF. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br Dental J.* 1996;180:57-62.
53. Rhemrev GE, Timmerman MF, Veldkamp I, Winkelhoff AJ, Van der Velden U. Immediate effect of instrumentation on the subgingival microflora in deep inflamed pockets under strict plaque control. *J Clin Periodontol.* 2006;33:42-8.
54. Schoop U, Moritz A, Kluger W, Patruta S, Goharkhay K, Sperr W, et al. Changes in root surface morphology and fibroblast adherence after Er:YAG laser irradiation. *J. Oral Laser Appl.* 2002;2:83-93.
55. Schwarz F, Sculean A, Georg T, Reich E. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to scaling and root planing. A controlled clinical study. *J Periodontol.* 2001;72:361-7.
56. Schwarz F, Jepsen S, Heten M, Aoki A, Sculean A, Becker J. Immunohistochemical characterization of periodontal wound healing following nonsurgical treatment with fluorescence controlled Er:YAG laser irradiation in dogs. *Lasers Surg Med.* 2007;39:428-40.
57. Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Georg T, Reich E, Becker J. Clinical evaluation of an Er:YAG laser combined with scaling and root planing for non-surgical periodontal treatment. A controlled, prospective clinical study. *J Clin Periodontol.* 2003;30: 26-34.
58. Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Georg T, Reich E, Becker J. Periodontal treatment with an Er:YAG laser or scaling and root planing. A 2-year follow-up split-mouth study. *J Periodontol.* 2003;74:590-6.
59. Shapira L, Soskolne WA, Sela MN, Offenbacher S, Barak V. The secretion of PG E₂, IL-1 β , IL-6, and TNF- α by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. *J Periodontol.* 1994;65:139-46.

60. Sherman PR, Hutchens LH, Jewson LG, Moriarty JM, Greco GW, McFall WT. The effectiveness of subgingival scaling and root planing. I. Clinical detection of residual calculus. *J Periodontol.* 1990;61:3-8.
61. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci.* 2003;45:17-23.
62. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002;28:12-55.
63. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-87.
64. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-44.
65. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obermesser MJ, Prostak L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991;18:548-54.
66. Theodoro LH, Garcia VG, Haypek P, Zezell DM, Eduardo CP. Morphologic analysis, by means of scanning electron microscopy, of the effect of Er:YAG laser on root surfaces submitted to scaling and root planing. *Bras Oral Res.* 2002;16:308-312.
67. Theodoro LH, Haypek P, Bachmann L, Garcia VG, Sampaio JE, Zezell DM, et al. Effect of Er:YAG and Diode laser irradiation on the root surface: morphological and thermal analyses. *J Periodontol.* 2003;74:838-843.
68. Theodoro LH, Sampaio JEC, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and Diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. *J Periodontol Res.* 2006; 41:381-390.
69. Tomasi C, Schander K, Dahlén G, Wennström JL. Short-term clinical and microbiologic effects of pocket debridement with and Er:YAG laser during periodontal maintenance. *J Periodontol.* 2006;77:111-8.

70. Van Winkelhof AJ, Van der Valden U, De Graaff J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra and subgingival debridement. *J Clin Periodontol.* 1987;15:116-22.
71. Watanable H, Ishikawa I, Suzuki M, Hasegawa K. Clinical assessment of the erbium:YAG laser for soft tissue surgery and scaling. *J Clin Laser Med Surg.* 1996; 14:67-75.
72. Yamaguchi H, Kobayashi K, Osada R, Sakuraba E, Nomura T, Arai T, et al. Effects of irradiation of an Erbium:YAG Laser on root surfaces. *J Periodontol.* 1997;68:1151-5.

8 Anexos

8.1 Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA	 Comitê de Ética em Pesquisa
Certificado	
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO LASER DE ER:YAG, ASSOCIADO OU NÃO À RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR, SOBRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS DA DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA", sob o protocolo nº 95/02, de responsabilidade do Pesquisador (a) BEATRIZ MARIA VALÉRIO LOPES, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 01 (um) ano, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.	
Certify that the research project titled "EFFECTS OF ER:YAG LASER IRRADIATION, ON PERIODONTAL MECHANICAL THERAPY. CLINICAL, MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ANALYSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTITIS", protocol number 95/02, under Dr BEATRIZ MARIA VALÉRIO LOPES responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 01 (one) year when the final review of this study will occur.	
Araraquara, 12 de março de 2003.	
 Profª Drª Mirian Aparecida Onofre Coordenadora	

8.2 – Anexo 2 Modelo da ficha clínica utilizada na pesquisa.

Ficha Clínica do Pesquisador I (Exames e Raspagem) Paciente nº _____

Nome: _____
Endereço: _____ nº _____
Complemento: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____
Telefones: (____) _____ res./ (____) _____ com. / (____) _____ cel.
Idade: _____ anos - Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: _____

1º Exame: ____/____/____ (Inicial) – IP/IG/CI/CM/PS/RG/NI/SS e Tratamento

Inicial – Dia -2					Inicial – Dia 0				
Grupo	Dente	Sítio	IP	IG	PS	RG	NI	SS	RAR
									sim
									não
									sim
									não

2º Exame: ____/____/____ (12 dias) – IP/IG/CI/CM/SS

Grupo	Dente	Sítio	IP	IG	SS

3º Exame: ____/____/____ (30 Dias) – IP/IG/CI/CM/PS/RG/NI/SS

Inicial – Dia -28					Inicial – Dia 30				
Grupo	Dente	Sítio	IP	IG	PS	RG	NI	SS	RAR
									sim
									não
									sim
									não

4º Exame: ____/____/____ (90 Dias) – IP/IG/CI/CM/PS/RG/NI/SS

Inicial – Dia -88					Inicial – Dia 90				
Grupo	Dente	Sítio	IP	IG	PS	RG	NI	SS	RAR
									sim
									não
									sim
									não

5º Exame: ____/____/____ (180 Dias) – IP/IG/CI/CM/PS/RG/NI/SS

Inicial – Dia -178					Inicial – Dia 180				
Grupo	Dente	Sítio	IP	IG	PS	RG	NI	SS	RAR
									sim
									não
									sim
									não

LEGENDA:

IP - Índice de Placa / IG - Índice Gengival / CI – Coleta Imunológica / CI – Coleta Microbiológica
/ PS - Profundidade de Sondagem / RG – Recessão Gengival / NI - Nível de Inserção / SS -
Sangramento à Sondagem

Ficha Clínica do Pesquisador II (Tratamentos com o Laser)
Paciente nº _____

Nome: _____

Inicial: _____ / _____ / _____ (Inicial) – IP/IG/CI/CM/PS/RG/NI/SS e
Tratamento

Inicial – Dia 2							
Grupo	Dente	Sítio	RAR	LASER Er:YAG	Energia total	Nº de pulsos	Tempo de Exposição
1			sim	A	21,3J	300	30 segundos
2			não	A			
3			sim	B	-----	-----	-----
4			não	B	-----	-----	-----

LEGENDA:

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular / A – com uso do Laser / B – sem uso do Laser

8.3 Anexo 3 – Carta de Aceitação do *Journal of Periodontology*.

From: kkornman@ilgenetics.com
To: odontolaser.odontolaser@uol.com.br
Cc: biavlopes@hotmail.com, adriana@foar.unesp.br, gloriath@foar.unesp.br
Subject: Journal of Periodontology - Manuscript JOP-07-0600.R1
Body: 27-Jan-2008

Dear Dr. Theodoro,

I am pleased to inform you that your revised manuscript, Short-term clinical and immunological effects of scaling and root planing with Er:YAG laser in chronic periodontitis (JOP-07-0600.R1), **is accepted for publication in the Journal of Periodontology**, with an **acceptance date of 21-Jan-2008**. Thank you for the detailed response to reviewers. This greatly facilitated the review of your revised manuscript.

Please complete and return a Copyright Agreement at your earliest convenience. This form can be found in the upper right-hand corner of your screen at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio> under "Instructions & Forms." A copy is also attached here.

Please fax or e-mail this form to Bethanne Wilson (fax: 312-573-3225; e-mail: bethanne@perio.org).

Note that all authors must sign this form. In assigning the copyright, you agree to an embargo on the material contained in the manuscript until such time as you are advised of a publication date, and shall not release the manuscript or any part thereof to any individual, organization, or institution. If you wish to use any portion of the manuscript in an oral presentation at a meeting of a recognized scientific organization, you may request such permission from the Journal of Periodontology.

Further information regarding publication date, page proofs, and reprints will come to you directly from the Managing Editor. Thank you for your support of the Journal of Periodontology.

Sincerely,

Dr. Kenneth Kornman
Journal of Periodontology
E-mail: kkornman@ilgenetics.com
Date Sent: 27-Jan-2008

File 1* [Journal-of-Periodontology-Copyright.pdf](#)

8.4 Anexo 4 – Composição do coquetel imunológico e do PBS.

Composição do coquetel de inibidores de protease utilizado para a coleta do fluido crevicular para a realização do exame imunológico:

solução salina tamponada (PBS)	500ml
soro de albumina bovina (BSA, 1mg/ml)	500mg
antipain (1µg/ml)	500µg
aprotinin (1µg/ml)	500µg
leupeptin hydrochloride (1µg/ml)	500µg
N-ethylmaleimide (1mM)	62,5mg
N-Dodecyl-N, N-Dimethyl-3-Ammonio-1-propanesulfonate (50µg/ml)	25mg

Composição do PBS (tampão salina fosfato):

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ PO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O	1000 ml
pH	7,3

8.5 Anexo 5 – Valores de energia e tempo utilizados (Grupo L).

Quadro 3 – Valores originais dos dados: energia total no painel, energia total transmitida (71%), número de pulsos e tempo do laser de Er:YAG, utilizados no Grupo L.

Paciente	Energia total (J) No Painel	Energia total (J) Transmitida	Nº total de pulsos	Tempo (s)
1.	143	101,53	1436	143,6
2.	103	73,13	1039	103,9
3.	171	121,41	1711	171,1
4.	134	95,14	1347	134,7
5.	156	110,76	1568	156,8
6.	132	93,72	1321	132,1
7.	112	79,52	1127	112,7
8.	148	105,08	1483	148,3
9.	168	119,28	1682	168,2
10.	161	114,31	1615	161,5
11.	114	80,94	1147	114,7
12.	119	84,49	1194	119,4
13.	101	71,71	1019	101,9
14.	179	127,09	1791	179,1
15.	149	105,79	1492	149,2
16.	116	82,36	1169	116,9
17.	165	122,12	1650	165,0
18.	137	97,27	1373	137,3
19.	106	75,26	1068	106,8
20.	177	125,67	1775	177,5
21.	133	94,43	1332	133,2

Média da Energia total (J) - Painel = 139J por sítio periodontal;

Média da Energia total (J) - Transmitida = 98,69J por sítio periodontal;

Média do número total de pulsos = 1397,14 pulsos por sítio periodontal;

Média do tempo = 139,71 segundos de irradiação por sítio periodontal.

Autorização para Reprodução

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 26 de março de 2008.

BEATRIZ MARIA VALÉRIO LOPES