



UNESP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**NAIDA ZANINI ASSEM**

**“ESTUDO COMPARATIVO DO USO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) COM USO  
SISTÊMICO DE AMOXICILINA E METRONIDAZOL, NO  
TRATAMENTO DA PERIODONTITE CRÔNICA EM  
PACIENTES FUMANTES”**

ARAÇATUBA – SP

2015



UNESP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**NAIDA ZANINI ASSEM**

**“ESTUDO COMPARATIVO DO USO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ( $\alpha$ PDT) COM USO  
SISTÊMICO DE AMOXICILINA E METRONIDAZOL, NO  
TRATAMENTO DA PERIODONTITE CRÔNICA EM PACIENTES  
FUMANTES”**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).**

**Orientadora:** Profª. Dra. Leticia Helena Theodoro

**Co-orientador:** Professor Titular Valdir Gouveia Garcia

ARAÇATUBA – SP

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A844e Assem, Naida Zanini.  
Estudo comparativo do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com uso sistêmico de amoxicilina e metronidazol, no tratamento da periodontite crônica em pacientes fumantes / Naida Zanini Assem. - Araçatuba, 2015  
85 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Leticia Helena Theodoro  
Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia

1. Periodontite 2. Fotoquimioterapia 3. Raspagem dentária 4. Hábito de Fumar  
I. T.

Black D6  
CDD 617.64

## *Dados curriculares*

---

*Naida Zanini Assem*

Nascimento: 27.06.75 Santo André- SP

Filiação: Walter Ibrahim Assem  
Cenira Nilva Zanini Assem

1993-1997: Curso de Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Araras-  
Fundação Hermínio Ometto

2000-2001: Especialização em Radiologia-  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP

2003-2005: Especialização em Periodontia-  
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

2013-2015: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Área de Periodontia  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

*...Well I see trees of green and*

*Red roses too*

*I'll watch them bloom for me and you*

*And I think to myself*

*What a wonderful world!*

**(Harold Arlen/E.Y. Harburg)**

## *À Deus e aos meus amigos de Luz*

*Deus, sem Sua vontade, não estaríamos aqui presentes.*

*Obrigada pela oportunidade de me permitir ter reencarnado, e de ter sido na minha família. Obrigada pelo meu corpo físico saudável, por me permitir ver, ouvir, sentir, falar, andar... Ter a oportunidade de ver o céu azul, uma flor desabrochar, escutar um som de uma melodia plena....*

*Por esta oportunidade de crescimento e aprendizado. Por direcionar a minha vida acima de tudo. Por me proteger. Obrigada por ter colocado ao meu lado pessoas que sempre ajudaram nos momentos de aprendizado em minha jornada.*

*Aos amigos de Luz, que com a Sua permissão, estiveram ao meu lado, me intuindo, me protegendo, me guiando e me trazendo a serenidade necessária, quando foi preciso.*

*Obrigada por estarem sempre neste meu caminho. Abrindo-o em todos os momentos em que precisava de luz, e orientação.*

*A vida é uma eterna caminhada. E nesta viagem para nossa evolução, nos encontramos em momentos felizes e tristes. Mas sabemos que existe uma Força maior que nos rege e não nos desampara.*

Eu vivo contente feliz a cantar, em paz e

Alegria é o meu caminhar....

**(Chico Xavier)**

*Com amor dedico este trabalho...*

## *Aos Meus Pais ...*

*Amor, respeito e gratidão, tudo se resume quando expresso meus sentimentos por vocês.*

*Walter e Cenira*

*Nunca mediram esforços para me proporcionar tudo o que fosse realmente importante. Vocês são os meus maiores exemplos de vida.*

*Obrigada, por terem me ensinado, desde pequena, a viver integralmente, a cada dia. Pela educação e formação. Pelo amor dedicado a mim. Pela oportunidade que tive de ter realizado muitas coisas, que foram importantes para o meu crescimento, através do incentivo e ensinamento de vocês. Pela paciência, dedicação, esforço. E pela musicalidade, que também move minha vida.*

***Vocês são eternos na minha vida...***

***Amo Muito Vocês.***

*Prelúdio para ninar gente grande*

*“Quando estou nos braços teus  
Sinto o mundo bocejar.  
Quando estás nos braços meus  
Sinto a vida descansar.*

*No calor do teu carinho  
Sou menino-passarinho  
Com vontade de voar.  
Sou menino-passarinho  
Com vontade de voar.”*

***(Luiz Viera)***

## À Minha Irmã

À minha amada irmã *Deina*

*Quando você nasceu, meu pai comprou um botão de rosa vermelha, para que eu levasse ao hospital para conhecer você.... Eu não tinha muita noção do que ia encontrar lá. Mas quando eu cheguei perto de onde você estava, e eu pude te ver, o botão de rosa caiu.... Eu acho que, apesar da pouca idade, eu tinha consciência de que eu não ia mais reinar, mas que daquele momento em diante, eu também sabia que não estaria mais sozinha, e que teria uma eterna amiga em quem pudesse confiar,*

*Obrigada por ter me ajudado e continuar me ajudando quando preciso de ti. Obrigada por me incentivar e me motivar a ir à diante, sem esmorecer, porque a vida é curta e temos que viver o hoje (como você mesma diz)! Você é fundamental na minha caminhada! Obrigada por seu amor e por sua amizade!*

*“Você é isso: Uma beleza imensa,  
Toda recompensa de um amor sem fim.  
Você é isso: Uma nuvem calma  
No céu de minh'alma; é ternura em mim.*

*Você é isso: Estrela matutina,  
Luz que descortina um mundo encantador.  
Você é isso: É parto de ternura,  
Lágrima que é pura, paz do meu amor.”*

**(Luiz Vieira)**

## Aos Meus Sobrinhos

*Rafael Luis e Iris*

*Não tenho como expressar este amor imenso que eu sinto por estas três pessoas que Deus me emprestou para conviver e aprender o sentido da vida....*

*Estão comigo antes de nascerem, e a cada rosto, a cada gesto.... é uma emoção sem descrição. Nossa ligação tem motivos imensuráveis.*

*Se muitas vezes eu esmoreci, eu lembrava de vocês. E isto me dava e me dá força para continuar.*

*Estar com vocês, presenciar a evolução de cada um, cada qual do seu jeito, cantar músicas que fizeram parte da minha infância junto com vocês, ver vocês cantarem... Ah! Esta tia é muito babona!*

*Estar com vocês, é ter sorriso no rosto todos os dias, é sentir a brisa da manhã no meu rosto, é ouvir o canto de um passarinho...*

*Eu os amo profundamente e amarei eternamente,*

*“Todo domingo havia banda no coreto do jardim,  
E já de longe a gente ouvi a banda do Serafim.  
Porém um dia, entrou um gato na tuba do Serafim,  
E o resultado desta melodia,  
Fui que a tuba tocava assim ....  
Tum tum tum ....miau....tum turum rum tum tum ...Miau”*

*(Carlos Alberto Ferreira Braga)*



Ao meu cunhado, *José Fernando da Cunha Pinheiro,*

Muito obrigada por ter me acolhido no lar de vocês, quando eu precisei. Por ter me aguentado por seis meses, mudando a rotina e tumultuando mais um pouco.... rs. Aguentar a cunhada, nem sempre é tarefa fácil.

À minha tia *Marlene Assem,* pelas preces e por sempre torcer por mim.

Ao meu ex-marido, *Roger William Fernandes Moreira,*

Pelo incentivo de ingressar nesta nova jornada, sem medo e sem receios. Pelos conselhos e por ter me ouvido. Você é um amigo querido, que eu vou levar para toda a minha existência!

E ao meu companheiro, mais do que especial, *Júlio Manzatti,*

Pela paciência, primeiro de tudo!

Por me fazer mais feliz e acordar todos os dias com vontade de viver mais.

Por me ensinar a dançar, e perceber que através da dança a vida pode ser mais leve.

Ah! Que bom!

Aos meus amigos que torceram sempre por mim. **Jenner Pimenta dos Reis e Denise Oliveira, Maria Cláudia Tureli, Luciana Teófilo, Érika Perroni, Silvana Mendonça.** A todos que de alguma maneira torceram pela realização deste acontecimento comigo e me incentivaram a vivê-lo, meus sinceros agradecimentos.

*Obrigada pela amizade de vocês!*

*Smile, though your heart is aching  
Smile, even though it's breaking  
When there are clouds in the sky  
You'll get by...*

*If you smile  
With your fear and sorrow  
Smile and maybe tomorrow  
You'll see the sun come shining through, for you*

*Light up your face with gladness  
Hide every trace of sadness  
Although a tear may be ever so near  
That's the time you must keep on trying  
Smile, what's the use of crying?  
You'll find that life is still worthwhile  
If you'll just smile*

*That's the time you must keep on trying  
Smile, what's the use of crying?  
You'll find that life is still worthwhile  
If you'll just smile.*

**(Charles Chaplin)**

À minha querida orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Helena Theodoro,**

*E por algum motivo, que não sei ao certo, eu fui colocada no seu caminho e você no meu. Talvez inicialmente, eu não era para ser sua orientada, mas alguma coisa aconteceu, para que mudasse a trajetória. Falo você, e não Senhora, mas você sabe que não é por falta de respeito. Primeiro, porque é minha Professora e Orientadora. E isso é motivo singular e suficiente para que eu te respeite e também, segundo, que eu te admire. Admiração pela sua força, pela sua inteligência, capacidade, pelo seu trabalho, pela forma que o conduz. De qualquer forma, eu tenho que agradecer, por ter sido minha orientadora, prestativa, atenciosa. Me ouviu e me ajudou todos os momentos que eu precisei. Agradecer por ter “concedido” a mim, a responsabilidade de tocar este projeto. Muito Obrigada. Foi um prazer pra mim!*

Ao meu querido co-orientador **Professor Dr. Valdir Gouveia Garcia,**

*Professor Valdir, toda a minha admiração por sua sabedoria e profissionalismo acadêmico, e pelo ser humano que o senhor é.*

*Sempre otimista, motivador, simples, disposto a novas ideias e a contribuir com a ciência de uma forma única.*

*Obrigada pela sua atenção, disponibilidade e orientação neste meu trabalho. Que Deus te conserve sempre assim... sem medir esforços para a realização de novas conquistas e com a sua maneira peculiar de ser.*

*Um mestre para toda a vida ... Tenho muito orgulho e agradeço muito de ter sido sua co-orientada.*

*Obrigada!*

À minha “segunda co-orientadora” **Prof. Dr. Cristiane Duque,**

*Cris, (como a chamo carinhosamente). Você tem o dom do Magistério. Eu fico admirada pela sua capacidade de dar atenção para os seus orientados, seus alunos de iniciação científica, e ainda seus agregados (como eu, que é assim, que nos intitulamos), de uma forma tão prestativa e presente. Parabéns! Que Deus guie sua trajetória, e que ela seja trilhada com luzes abençoadas vindas do plano maior. Obrigada, por ter participado ativamente no meu trabalho. E de ter sido também, uma co-orientadora.*

Ao **Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida,**

*Agradeço pela orientação e ajuda durante as clínicas. Por me guiar todas as vezes que tive dificuldade, e me motivar a realizar experiências novas. Por momentos de alegria e descontração durante o meu aprendizado. Por sua grande amizade, carinho, respeito, pelo constante apoio e pelos conhecimentos transmitidos. Muito Obrigada por tudo!*

À **Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata,**

*Pela seriedade do seu trabalho, pelo convívio, pelas aulas ministradas com tanta precisão e dedicação. Por ser um exemplo também na nossa formação científica. Pelo incentivo de nos tornarmos alunos melhores e também bons professores. Obrigada! Minha grande admiração!*

Ao **Prof. Dr. Álvaro Francisco Bosco,**

*Eu gostaria de ter um dedinho da sua mão abençoada. Minha profunda a admiração pelo profissional que o senhor é. Pela forma única de operar. Obrigada por permitir que eu tivesse a oportunidade de vê-lo trabalhando e poder ter aprendido muito com o senhor. Pela ajuda e ótima convivência em todas as nossas clínicas.*

Ao Professor **Andrea Mombelli,** Professor da Divisão de Periodontia e Patofisiologia Oral, da Universidade de Genebra- Suíça, pelo auxílio e colaboração na elaboração e execução deste projeto. Muito obrigada!

Ao Professor **Dr. Rafael Nobrega Stipp,** Professor da Área de Microbiologia e Imunologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, por ter me concedido trabalhar no laboratório de Biologia Molecular para realizar parte dos meus experimentos.

Aos Professores **Prof. Adjunto José Fernando Garcia** e **Profa. Adjunto Cáriss Maroni Nunes,** Professores do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – DAPSA da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba –UNESP, por terem permitido que eu realizasse parte do meu trabalho no laboratório.

*Aos meus colegas de pós graduação, **Erivan Gualberto Júnior, Paula Faleiros, Natália Campos, Carolina Santinoni, Vivian Novaes, Mariéllen Longo, Márcio Ferro, Fabrício Cabrera, Adrielli de Paula Neves, Alessandra Lopes**, o meu muito obrigada! Todos de uma forma ou de outra me ajudaram e participaram desta minha caminhada. Toda a ajuda teve muito valor e muita importância!!!*

*“Ninguém cruza nosso  
caminho por acaso e  
nós não entramos na  
vida de alguém sem  
nenhuma razão”  
(Chico Xavier)*

*Ao **Joilson Lellis**, pela atenção e ajuda, com seus serviços prestados prontamente.*

*Aos meus colegas de outros Departamentos e Universidades, **Natália Colombo (Odontopediatria), Fernanda Müller de Oliveira (Medicina Veterinária-UNESP), Natália Vizoto (FOP-UNICAMP), Patrick Alves (USP-BAURU)**.*

*Aos alunos de Iniciação Científica, **Ana Paula Lima, Leonardo Feresin, Maryelisa Vicente, Tamara Seraphim, Thayane Businari, Natália Gimenez Paiva**, que permaneceram do meu lado, me ajudando, me dando força, me fazendo rir e me sentir mais jovem. Vocês são muito queridos!*

*Aos **meus pacientes**, que contribuíram para a realização desta pesquisa, depositando confiança e oportunidade de poder exercer o meu trabalho.*

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas da **Diretora Profa. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e Vice-Diretor Prof. Adj. Wilson Roberto Poi** por proporcionarem a realização desta pesquisa.

À atual coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa da Professora **Maria José Hitomi Nagata**, por sua dedicação ao Curso e gosto pela docência.

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas Áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Clínica Integrada, Estomatologia, e Prótese Dental.

Aos Funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - **Cleide, Renato, Marcos e Paulo** obrigada pela ajuda e disposição.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Cláudio Hideo Matsumoto, Celinha, Valéria Marcondes Zagatto, Cristiane, Lilian** pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

À **FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo nº 2013/05424-3) para realização deste trabalho.

Obrigada!

“Mesmo quando tudo  
parece desabar,  
cabe a mim decidir  
entre rir e chorar,  
ir ou ficar,  
desistir ou lutar;  
porque descobri, no caminho  
incerto da vida, que o mais  
importante é o **decidir.**”

*(Cora Coralina)*



Assem, ZN. **Estudo comparativo do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com uso sistêmico de amoxicilina e metronidazol, no tratamento da periodontite crônica em pacientes fumantes.** [Dissertação]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2015.

**Objetivo:** Este estudo avaliou por meio de análise clínica e microbiológica os efeitos do Metronidazol associado à Amoxicilina (MTZ+AMX) e de múltiplas aplicações da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como coadjuvantes ao tratamento da periodontite crônica em fumantes.

**Métodos:** Um estudo clínico controlado, randomizado foi conduzido em 51 pacientes fumantes que receberam: Grupo RAR (n=17) - raspagem e aplainamento radicular e placebo; Grupo MTZ+AMX (n=17) - RAR e uso sistêmico de Metronidazol (400 mg 3 X por dia, 7 dias) e Amoxicilina (500 mg 3 X por dia, 7 dias); Grupo aPDT (n=17) - RAR e 3 aplicações de aPDT em dois sítios (1 bolsa moderada e 1 profunda) por quadrante, imediatamente, 48 e 72 horas após a raspagem e placebo durante 7 dias. Os exames clínicos e microbiológicos foram realizados no início, aos 90 e 180 dias após o tratamento. Os parâmetros clínicos de índice de placa visível (IPV), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínico (NIC) foram avaliados. Foram coletadas amostras de biofilme subgingival de uma bolsa  $\geq 4 \leq 6$  mm (bolsa moderada) e de outra  $\geq 7$  mm (profunda) em cada quadrante de cada paciente dos grupos RAR, MTZ+AMX e aPDT. A aPDT foi realizada, utilizando o Azul de metileno e o laser em baixa intensidade após 1 minuto (AsGaAl, 660 nm, 100 mW, 48 segundos,  $160 \text{ J/cm}^2$ ) imediatamente, 48 e 72 hs após o tratamento, nos mesmos sítios da coleta. Para análise microbiológica, três patógenos periodontais foram avaliados por Reação de Polimerase em

Cadeia em tempo real (PCR-*real time*): *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*) e *Prevotella intermedia* (*Pi*). Os dados clínicos e microbiológicos foram estatisticamente analisados ( $\alpha=5\%$ ).

**Resultados:** Os tratamentos com MTZ +AMX e aPDT promoveram melhoras nos parâmetros de PS, NIC, SS e IPV após tratamento. Os pacientes que receberam o tratamento com aPDT apresentaram maior redução de PS e NIC nas bolsas coletadas, quando comparado à RAR apenas. A aPDT promoveu maior redução de NIC em bolsas moderadas, quando comparado a RAR apenas. Todos os tratamentos foram efetivos na redução das bolsas residuais dos sítios coletados. Na comparação entre os períodos do grupo MTZ+AMX em bolsas moderadas, houve redução dos níveis de *Pg* e *Pn* entre *Baseline* e 180 dias e no grupo aPDT houve redução de *Pn* aos 180 dias. Com relação às bolsas profundas houve redução de *Pg*, *Pi* e *Pn* aos 180 dias no grupo MTZ+AMX quando comparado ao *Baseline* e nos níveis de *Pi* e *Pn* aos 180 dias e de *Pn* aos 90 dias.

**Conclusão:** A associação de MTZ+AMX ou de aPDT à RAR promoveu benefícios clínicos e microbiológicos adicionais no tratamento periodontal de pacientes fumantes. Vantagens clínicas significantes foram observadas com o uso da aPDT como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite em fumantes, enquanto a antibioticoterapia foi mais efetiva na redução de microrganismos.

**Palavras Chaves:** Periodontite, Fotoquimioterapia, Raspagem Dentária, Hábito de Fumar.

Assem, ZN. **Clinical and microbiological effects of aPDT compared with systemic Amoxicillin/ Metronidazole in the treatment of chronic periodontitis in smokers: a randomized controlled study.** [Dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2015.

**Aim:** The aim of this study was to evaluate the clinical and microbiological effects of Metronidazole combined with Amoxicillin (MTZ+AMX) and multiple applications of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as adjuvant treatment of smokers with chronic periodontitis.

**Methods:** A double-blind controlled, randomized clinical trial was conducted in 51 smoking patients who received: SRP Group (n=17): scaling and root planning and placebo; MTZ+AMX Group (n=17) and SRP with systemic use of Metronidazole (400 mg 3 X per day 7 days) and Amoxicillin (500 mg 3 X per day 7 days); aPDT Group (n=17): SRP and three aPDT applications at two sites (one moderate and one deep pocket) per quadrant, immediately 48 and 72 hours after scaling and MTZ and AMX (placebo) during 7 days. Clinical and microbiologic examinations were performed at Baseline, 3 and 6 months post-therapy. Clinical parameters of visible plaque index (VPI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD), and clinical attachment level (CAL) were measured. Samples were collected from a subgingival pocket  $\geq 4\text{mm} \leq 6\text{mm}$  (pocket moderate) and another  $\geq 7\text{mm}$  (pocket deep) in each quadrant of each patient, in the groups SRP, MTZ+AMX and aPDT. The APDT was carried out using methylene blue and the laser low level after 1 minute (GaAlAs 660 nm, 100 mW, 48 seconds, 160 J/cm<sup>2</sup>) 48 and 72 hours immediately after treatment, into the same sites of the collection. For microbiological analysis, three

periodontal pathogens were assessed by polymerase chain reaction in real time (PCR-real time): *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*) e *Prevotella intermedia* (*Pi*). The statistical analysis was performed ( $\alpha=5\%$ ).

**Results:** Treatments with MTZ + AMX and aPDT promoted improvements in PD, CAL, BOP and VPI parameters after treatment. Patients who received the treatment with aPDT showed a higher reduction of CAL and PD in pockets collected, when compared to SRP only. The aPDT promoted greater reduction in CAL in moderate pockets when compared to SRP alone. All treatments were effective in reducing the residual pockets of the collected sites. Comparing the periods of MTZ + AMX group in moderate pocket, there was a decrease of levels of *Pg* and *Pn* between Baseline and 180 days and, in aPDT group, there was a decrease of *Pn* to 180 days. Regarding deep pockets, there was a decreased of *Pg*, *Pi* and *Pn* to 180 days in MTZ + AMX group compared to Baseline and levels of *Pi* and *Pn* at 180 days and *Pn* to 90 days.

**Conclusion:** The combination of MTZ + AMX or aPDT to SRP promoted additional clinical benefits in periodontal treatment of smokers. Significant clinical benefits were observed with the use of aPDT as adjunctive therapy in the treatment of periodontal disease in smokers, while the antibiotic was more effective in reducing microorganisms.

**Key words:** Periodontitis, Photochemotherapy, Dental Scaling, Smoking.

### *Manuscrito para publicação*

Tabela 1	Características demográficas, média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) dos parâmetros clínicos (PS, NIC, SS, IPV) de boca toda no <i>Baseline</i> , 90 e 180 dias após tratamento.	64
Tabela 2	Média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) da redução de PS e NIC de bolsas coletadas (moderadas e profundas) entre <i>Baseline</i> e 90 dias, e <i>Baseline</i> e 180 dias.	65
Tabela 3	Média (mediana) erro padrão dos níveis dos periodontopatógenos avaliados em relação ao DNA total (16S) para <i>Baseline</i> , 90 e 180 dias.	66

### *Manuscrito para publicação*

- Figura 1 Fluxograma clínico. 67
- Figura 2 Redução percentual do número de bolsas residuais com sangramento ( $\geq 4\text{mm}$ ). 68
- Figura 3 Prevalência dos periodontopatógenos (*Pg*, *Pi* e *Pn*) em bolsas moderadas (m) e bolsas profundas (p) de pacientes submetidos aos tratamentos, no *Baseline*, 90 e 180 dias. 69

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular.

aPDT - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

MTZ - Metronidazol.

AMX - Amoxicilina.

PS - Profundidade de Sondagem.

SS - Sangramento à Sondagem.

NIC - Nível de Inserção Clínica.

IPV – Índice de Placa Visível.

nm - Nanômetro. Bilionésima parte do metro, utilizado para medir comprimento de onda.

DNA - Ácido desoxiribonucleico.

µg/ml - Microgramas por mililitros.

mg/ml - Miligramas por mililitro

µL – Microlitro, equivalente à milionésima parte de um litro.

Laser - Acrônimo da palavra Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

(Luz Amplificada pela Emissão Estimulada de Radiação).

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio.

mW - Miliwatt - Milionésima parte do Watt . 1/1000 Watt.

J/cm<sup>2</sup> - Joules por centímetro quadrado.

Joule - Unidade de energia, abreviada como J.

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.

TE – Tris-HCl

mg – Miligrama.

ml - Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

s - Segundo.

mm – Milímetro, equivalente à milésima parte do metro.

RNAse – Ribonuclease.

LED – Luz Emitindo de Diodo

g - Grama.

μM - Micromolar, equivalente à 10<sup>-3</sup> mol/L.

CT –Cycle Threshold



## Lista de Anexos

---

Anexo A	Certificado da Comissão de Ética em Pesquisa	70
Anexo B	Normas de publicação segundo o Periódico „Journal of Clinical Periodontology „.	72

# Sumário

Manuscrito para publicação	27
Página de título	28
Resumo	29
Introdução	31
Materiais e Métodos	35
Resultados	43
Discussão	46
Agradecimentos	52
Referências	53
Anexos	70

*Manuscrito*  
*para Publicação*<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Normalização Segundo a Revista "Journal of Clinical Periodontology"

**Título**

Estudo comparativo do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com uso sistêmico de amoxicilina e metronidazol, no tratamento da periodontite crônica em pacientes fumantes.

**Autores:**

Letícia Helena Theodoro <sup>a,\*</sup>, Naida Zanini Assem <sup>a</sup>

<sup>a</sup>GEPLO – Grupo de Estudos e Pesquisas com Lasers em Odontologia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Disciplina de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista– UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

**\*Autor correspondente:**

Letícia Helena Theodoro

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16015-050 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 18-36362860

E-mail: [letheodoro@foa.unesp.br](mailto:letheodoro@foa.unesp.br)

**Número de figuras:** 3

**Número de tabela:** 3

**Título resumido:** aPDT e terapia antibiótica sistêmica em fumantes.

## Resumo

**Objetivo:** Este estudo avaliou por meio de análise clínica e microbiológica os efeitos do Metronidazol associado à Amoxicilina (MTZ+AMX) e de múltiplas aplicações da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como coadjuvantes ao tratamento da doença periodontal crônica em fumantes.

**Métodos:** Um estudo clínico controlado, randomizado foi conduzido em 51 pacientes fumantes que receberam: Grupo RAR (n=17) - raspagem e aplainamento radicular; Grupo MTZ+AMX (n=17) - RAR e uso sistêmico de Metronidazol (400 mg 3 X por dia, 7 dias) e Amoxicilina (500 mg 3 X por dia, 7 dias); Grupo aPDT (n=17) - RAR e 3 aplicações de aPDT em dois sítios (1 bolsa moderada e 1 profunda) por quadrante, imediatamente, 48 e 72 horas após a raspagem, e receberam o placebo durante 7 dias. Os exames clínicos e microbiológicos foram realizados no início, aos 90 e 180 dias após o tratamento. Os parâmetros clínicos de índice de placa visível (IPV), sangramento a sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínico (NIC) foram avaliados. Foram coletadas amostras de biofilme subgingival de uma bolsa  $\geq 4 \leq 6$  mm (bolsa moderada) e de outra  $\geq 7$  mm (profunda) em cada quadrante de cada paciente dos grupos RAR, MTZ+AMX e aPDT. A aPDT foi realizada, utilizando o Azul de Metileno (10 mg/ml) e o laser em baixa intensidade após 1 minuto (AsGaAl, 660 nm, 100 mW, 48 segundos, 160 J/cm<sup>2</sup>) imediatamente, 48 e 72 hs após o tratamento, nos mesmos sítios da coleta. Para análise microbiológica, três patógenos periodontais foram avaliados por Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (PCR-*real time*): *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella nigrescens* (Pn) e *Prevotella intermedia* (Pi). Os dados clínicos e microbiológicos foram estatisticamente analisados ( $\alpha=5\%$ ).

**Resultados:** Os tratamentos com MTZ+AMX e aPDT promoveram melhoras nos parâmetros de PS, NIC, SS e IPV após tratamento. Os pacientes que receberam o tratamento com aPDT apresentaram maior redução de PS e NIC nas bolsas coletadas, quando comparado à RAR apenas. A aPDT promoveu maior redução de NIC em bolsas moderadas, quando comparado a RAR apenas. Todos os tratamentos foram efetivos na redução das bolsas residuais dos sítios coletados. Na comparação entre os períodos do grupo MTZ+AMX em bolsas moderadas, houve redução dos níveis de *Pg* e *Pn* entre *Baseline* e 180 dias e no grupo aPDT houve redução de *Pn* aos 180 dias. Com relação às bolsas profundas houve redução de *Pg*, *Pi* e *Pn* aos 180 dias no grupo MTZ+AMX quando comparado ao *Baseline* e nos níveis de *Pi* e *Pn* aos 180 dias e de *Pn* aos 90 dias.

**Conclusão:** A associação de MTZ+AMX ou de aPDT à RAR promoveu benefícios clínicos adicionais no tratamento periodontal de pacientes fumantes. Vantagens clínicas significantes foram observadas com o uso da aPDT como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite em fumantes, enquanto a antibioticoterapia foi mais efetiva na redução de microrganismos.

**Palavras Chaves:** periodontite; fotoquimioterapia; raspagem dentária; hábito de fumar.

## **1. Introdução**

O controle mecânico do biofilme bacteriano e de depósitos mineralizados na superfície radicular tem sido o método de tratamento mais indicado da periodontite (Atieh 2010). No entanto, algumas condições torna este procedimento ineficaz quanto a completa remoção bacteriana, principalmente na presença de concavidade radicular, áreas de difícil acesso para instrumentação como área de furca e em bolsas profundas (Adriaens & Adriaens 2004, Umeda et al. 2004), além da invasão de bactérias nos tecidos circunvizinhos (Amano 2007). Métodos coadjuvantes ao mecânico têm sido propostos como o uso de antissépticos e antibióticos de uso local ou sistêmicos (Drisko 1996, Walker & Karpinia 2002).

Entre os vários antibióticos utilizados para o tratamento da periodontite crônica o metronidazol (MTZ) sozinho ou associado à amoxicilina (AMX) tem sido os mais utilizados (Silva et al. 2011). Estudos clínicos recentes têm demonstrado que associação do MTZ com AMX com terapia mecânica convencional para tratamento da periodontite crônica, apresenta vantagens no controle da doença periodontal (Rooney et al. 2002, Cionca et al. 2009, Cionca et al. 2010, Silva et al. 2011, Sgolastra et al. 2012, Zandbergen et al. 2013, Mombelli et al. 2015).

Embora os benefícios clínicos do uso sistêmico da antibioticoterapia no tratamento da periodontite crônica estejam evidenciados, a relação específica entre benefício e risco em várias situações clínicas permanece objeto de debate, especialmente com relação à prescrição individual e combinação com outros procedimentos (Mombelli et al. 2011). O uso restritivo de antibioticoterapia no tratamento da doença periodontal tem sido recomendado, basicamente para limitar o desenvolvimento de resistência microbiana a antibioticoterapia (Mombelli 2006). Há relatos da literatura que atestaram a presença de

cepas resistentes a estas terapias, principalmente em condições de uso frequente de antibióticos (Walker 1996, Feres et al. 2002, Ardila et al. 2010).

Nos últimos anos a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT), que é caracterizada pela associação de agentes fotossensibilizadores à diferentes fontes de luz como lasers ou luz emitindo de diodo (LED), com o objetivo de promover a geração de espécies reativas de oxigênio, como radicais livres e o oxigênio singleto, citotóxicos para alguns microrganismos, tem sido objeto de vários estudos na periodontia. Pesquisas experimentais tem demonstrado efetividade da aPDT na redução de bactérias periodontopatogênicas (Kömerick et al. 2003, Sigusch et al. 2005, Qin et al. 2008, Prates et al. 2011) com grau de redução variável de 63% (Fontana et al. 2009), 75% a 77% (Goulart et al. 2010) e 95% a 100% (Chan & Lai 2003; Soukos et al. 2005).

Alguns estudos tem avaliado os efeitos da aPDT na periodontite experimental em animais, por meio de análise histomorfométrica, sobre o controle da perda óssea e da extensão do processo inflamatório (Almeida et al. 2007, Almeida et al. 2008a, b, Qin et al. 2008, Prates et al. 2011), enquanto outros têm avaliado a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (Prates et al. 2011, Carvalho et al. 2011, Garcia et al. 2013). Os resultados destes estudos demonstraram que aPDT é uma terapia efetiva para o controle e tratamento da periodontite induzida quer utilizada isoladamente (Almeida et al. 2007, Almeida et al. 2008a, Qin et al. 2008) ou como coadjuvante ao tratamento mecânico convencional em condições sistêmicas adversas ou não (Almeida et al. 2008b, Fernandes et al. 2009, Garcia et al. 2011, Garcia et al. 2013, Garcia et al. 2014).

Na última década, vários estudos clínicos em humanos tem avaliado o efeito da aPDT como uma terapia coadjuvante ao tratamento da periodontite crônica (Andersen et al. 2007, Braun et al. 2008, Christodoulides et al. 2008, Chondros et al. 2009, Polansky et al. 2009, Pinheiro et al. 2010, Ge et al. 2011, Theodoro et al. 2012, Petelin et al. 2014). No entanto,



alguns destes estudos não tem demonstrado vantagens clínicas com o uso da aPDT (Polansky et al. 2009, Theodoro et al. 2012), enquanto outros estudos mostraram que a aPDT foi capaz de reduzir apenas o sangramento à sondagem de sítios tratados (Chondros et al. 2008, Cristodoulides et al. 2008, Ge et al. 2011, Petelin et al. 2014).

Com relação ao efeito da aPDT sobre a bactérias periodontopatogênicas em humanos, alguns autores demonstraram maior redução de bactérias após o uso de aPDT aos 3 ou 6 meses pós-tratamento (Chondros et al. 2008, Pinheiro et al. 2010, Siguschi et al. 2011, Theodoro et al. 2012).

A aPDT poderia ser muito útil em casos de pacientes que apresentam algum fator modificador sistêmico, que pode alterar a resposta biológica dos tecidos periodontais durante o reparo tecidual após o tratamento periodontal convencional ou ainda modificar a progressão da doença periodontal. Os pacientes fumantes apresentam alto risco de desenvolvimento de doenças periodontais (Bergström 2003) e resposta desfavorável ao tratamento periodontal, quando comparado a pacientes não fumantes (Heasman et al. 2006). Estudos demonstraram que indivíduos fumantes são mais colonizados por microrganismos periodontopatógenos (Haffajee & Socransky 2001, Shchipkova et al. 2010, Guglielmetti et al. 2014) enquanto outros estudos não demonstraram tais fatos (Apatzidou et al. 2005, Decaillet et al. 2012). Uma revisão sistemática sobre o uso de antibioticoterapia no tratamento de periodontite em pacientes fumantes concluiu que ainda a evidência de um benefício adicional de antibióticos em fumantes portadores de periodontite crônica é inconclusiva e insuficiente, havendo a necessidade da realização de outros estudos clínicos controlados e randomizados para avaliar o efeito do uso de antibióticos associado à terapia mecânica convencional no tratamento da periodontite crônica em fumantes (Angaji et al. 2010). No entanto, alguns estudos clínicos têm demonstrado benefícios clínicos com o uso da antibioticoterapia sistêmica no tratamento

de pacientes fumantes (Mascarenhas et al. 2005, Dastoor et al. 2007, Matarazzo et al. 2008).

Estudos recentes tem avaliado clinicamente o efeito da aPDT como terapia coadjuvante ao tratamento da periodontite em pacientes diabéticos (Al-Zahrani et al. 2009), portadores da Síndrome da Imunodeficiência adquirida (Noro Filho et al. 2012) e fumantes (Queiroz et al. 2013 e Queiroz et al. 2015). Com relação à frequência de aplicações da aPDT, Lulic et al. (2009) demonstraram que repetidas aplicações de aPDT associada ao tratamento de raspagem convencional (5 vezes) têm promovido melhora clínica em bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal com melhores efeitos observados pós 6 meses de avaliação. Neste mesmo contexto, estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que 3 aplicações de aPDT com intervalos de 24 horas, não promoveram vantagens no controle da perda óssea alveolar em ratos, quando comparado a uma sessão de aPDT (Garcia et al. 2013). No entanto, não há relatos na literatura da comparação clínica do uso de múltiplas sessões de aPDT com o uso de antibioticoterapia sistêmica em pacientes fumantes. Diante destes fatos, constituiu objetivo do presente estudo comparar, clinicamente e microbiologicamente, o efeito da terapia periodontal convencional associada ao uso de antibioticoterapia sistêmica (MTZ e AMX) ou a múltiplas aplicações de aPDT.

## 2. Materiais e Método

O presente trata-se de estudo clínico controlado randomizado prospectivo duplo cego com acompanhamento de 90 e 180 dias, segue as normas do novo CONSORT-STATEMENT de 2010 (Moher et al. 2012) para ensaios clínicos randomizados e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Humanos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP – CPE n° 173.653 e CAAE n° 05519412.5.0000.5420/2012. O projeto foi registrado no *International Clinical Trials Registry Platform* - UTN (U1111-1161-0982).

### **Cálculo da amostra**

O tamanho da amostra foi calculado considerando diferença de no mínimo 1 mm no nível clínico de inserção e com desvio padrão de 0,94 mm entre os grupos em bolsas profundas (> 6 mm) (Matarazzo et al. 2008). Diante disto, foi determinado que 14 pacientes por grupo seriam necessários para obter um poder de estudo de 80% com nível de significância de 5%.

### **Seleção dos pacientes e critérios de inclusão e exclusão**

Foram avaliados 135 pacientes na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, UNESP. Os pacientes preencheram um questionário completo sobre a sua saúde geral para avaliar se os mesmos estavam sistemicamente qualificados para participarem do estudo. No presente estudo foram incluídos 51 pacientes portadores de periodontite crônica generalizada, fumantes (mais que 10 cigarros por dia, por mais de 5 anos). Todos os pacientes foram individualmente informados sobre a natureza do estudo e

assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos. Os pacientes que foram enquadrados no estudo tinham que apresentar os seguintes critérios de inclusão (Silva et al. 2011): pacientes com idade  $\geq 30$  anos e  $\leq 70$  anos (Matarazzo et al. 2008), e diagnóstico de periodontite crônica generalizada severa, com no mínimo de 6 dentes, com no mínimo 1 sítio cada com profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção clínica (NIC)  $\geq 5$  mm, e no mínimo 30 % dos sítios com PS e NIC  $\geq 4$  mm e com sangramento à sondagem (SS) (Armitage 1999); presença de pelo menos uma bolsa periodontal profunda (PS  $\geq 7$  mm), e uma bolsa moderada (PS  $\geq 4 \leq 6$  mm) em cada quadrante onde foram realizadas as coletas microbiológicas; no mínimo 15 dentes, excluindo os terceiros molares. Os critérios de exclusão foram os seguintes: alterações periapicais nos dentes qualificados; desordens médicas que requeressem profilaxia antibiótica ou que pudessem influenciar na resposta do tratamento; terem recebido tratamento periodontal de raspagem e aplainamento radicular nos últimos 6 meses; terem consumido medicamentos que afetam os tecidos periodontais nos últimos 6 meses (antibióticos, anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, imunossupressores ou bloqueadores de canais de cálcio); ser portador de alergia a penicilina ou metronidazol; gravidez; portador de reabilitações protéticas extensas; em tratamento ortodôntico; portadores de desordens metabólicas como diabetes; desordens imunológicas; alcoolismo e uso de drogas ilícitas.

### **Parâmetros Clínicos**

Os exames clínicos de todos os pacientes foram realizados por um profissional especialista em periodontia (ML) cego aos tratamentos e calibrado. No exame clínico foi avaliado o índice de placa visível (IPV- presente ou ausente) de acordo com Ainamo & Bay (1975) nos seis sítios de todos os dentes da cavidade bucal. Na seqüência, foram realizados os exames de Profundidade à Sondagem (PS), Sangramento à Sondagem (SS – presente ou

ausente) e Nível de Inserção Clínica (NIC) (Armitage 2004) em todos os seis sítios da cavidade bucal. Todos estes parâmetros clínicos foram realizados com sonda periodontal milimetrada (PCPUNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) e anotados. Todos os exames clínicos foram realizados por um único examinador calibrado e cego ao estudo no início (antes do tratamento), 90 e 180 dias após os tratamentos. Previamente a realização dos exames clínicos, foi realizada coleta de fluido crevicular gengival para exame microbiológico em todos os períodos.

Foram obtidas médias e desvio-padrão das medidas de PS e NIC de todos os pacientes, para avaliação entre tratamentos e períodos de toda a boca e dos sítios coletados (bolsas moderadas e profundas). Os dados categóricos de IPV e SS foram transformados em porcentagens e foram obtidas médias e desvio-padrão de boca toda e das bolsas coletadas (moderada e profunda). Foram avaliadas as reduções das presenças de bolsas residuais (PS  $\geq 4$  mm com sangramento à sondagem) em porcentagem dos sítios coletados (Mombelli et al. 2015).

### **Calibração dos examinadores**

No período pré-experimental, foram realizados os procedimentos de calibração de um examinador cego para os tratamentos efetuados nos respectivos pacientes. Para tanto, cento e vinte sítios com profundidade à sondagem  $\geq 5$  mm foram randomicamente selecionados em 6 pacientes (20 sítios por paciente), estes sítios foram avaliados quanto a profundidade à sondagem em duas ocasiões distintas (intervalo de 7 dias) e os dados foram submetidos ao teste *t* student ( $p \leq 0,05$ ). A calibração foi aprovada uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre os exames ( $p > 0,05$ ) (Lopes et al. 2010).

## Tratamento

Os 51 pacientes foram divididos aleatoriamente em três grupos, utilizando um sistema de aleatorização online ([www.sealedenvelope.com](http://www.sealedenvelope.com)) e foram montados envelopes por uma pessoa diferente da que realizou os exames clínicos (LHT), com a distribuição dos tratamentos, os quais foram abertos apenas no dia do tratamento.

Os pacientes inicialmente receberam informações detalhadas sobre a etiologia da doença periodontal e instrução de higiene bucal incluindo o uso de escovas dentárias, fio dentário e escova interproximal de acordo com a necessidade. Os parâmetros clínicos iniciais (*Baseline*) foram obtidos 15 dias após este procedimento.

Após a randomização os 51 pacientes foram alocados de acordo com os seguintes grupos de tratamentos: **Grupo RAR** (n=17): os pacientes foram submetidos a uma sessão de raspagem e aplainamento radicular (Matarazzo et al. 2008, Ribeiro et al. 2009), com duração de 1 hora usando ultrassom e curetas manuais associado com a administração de um placebo 3 X ao dia durante 7 dias; Grupo **MTZ+AMX** (n=17): os pacientes foram submetidos a uma sessão de raspagem e aplainamento radicular com duração de 1 hora usando ultrassom e curetas manuais associado com a administração sistêmica de Metronidazol (400 mg) e Amoxicilina (500 mg) 3 X ao dia durante 7 dias (Cionca et al. 2009) ; **Grupo aPDT** (n=17): os pacientes foram submetidos a uma sessão de raspagem e aplainamento radicular com duração de 1 hora usando ultrassom e curetas manuais seguido de aplicação de aPDT em dois sítios (1 bolsa moderada e 1 profunda) por quadrante imediatamente, 48 e 72 horas após a raspagem, e administração de 2 comprimidos placebo três vezes ao dia durante 7 dias.

Os procedimentos de RAR e aPDT foram realizados sob anestesia pela técnica de bloqueio regional por um único operador (NZA) especialista em periodontia. O placebo e o antibiótico foram administrados imediatamente após o término da raspagem.

A aPDT foi realizada em dois sítios, 1 com profundidade de sondagem  $\geq 4 \leq 6$  mm (bolsa moderada) e outra  $\geq 7$  mm (profunda) em cada quadrante de cada paciente, tanto de dentes uni ou multiradiculares. Os sítios selecionados foram irrigados com 1 ml de 10 mg/ml de azul de metileno utilizando uma seringa de insulina e agulha sem bisel (13mm x 0.45mm) (Becton Dicknson Ind. Ltda., Curitiba, PR, Brasil). Após 1 minuto de irrigação com azul de metileno (Aphoticário Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil) os sítios foram irradiados com um laser de diodo de AsGaAl com 660 nm (Laser Duo, MM Optics, Ltda, São Carlos, SP, Brasil), durante 48 segundos, totalizando uma dose energética de  $160 \text{ J/cm}^2$ , energia de 4,8 J, com potência de 100 mW e fibra óptica com diâmetro de saída de  $0,03 \text{ cm}^2$ , imediatamente 48 e 72 horas após a raspagem. A ponta da fibra ótica do laser foi introduzida na área da bolsa periodontal, paralelamente ao longo eixo do dente, até atingir o fundo da bolsa. Todos os pacientes bem como o operador usaram óculos de proteção específico, durante todo o período de irradiação.

O placebo utilizado no presente estudo foi um talco farmacêutico (Talco Pharma SM-200; Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) que é um pó branco ou quase branco, untuoso, livre de arenosidade, inodoro e praticamente insolúvel em água e em álcool. Os medicamentos placebos e os antibióticos utilizados foram manipulados por uma Farmácia especializada de manipulação (Aphoticário Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil) e armazenados em cápsulas, que foram mantidas em 2 frascos identificados: um frasco representando a AMX (500 mg) e outro representando o MTZ (400 mg). Foram administradas 2 cápsulas do placebo (1 de cada frasco), 3x ao dia por sete dias, sem o conhecimento do paciente de que seria um placebo e da mesma forma o medicamento foi administrado. Nos medicamentos e nos placebos, constavam descrições diferentes no rótulo da embalagem, somente para o cirurgião-dentista diferenciá-los.

### **Acompanhamento do paciente**

Os pacientes foram chamados 8 dias após o início do procedimento para avaliação clínica dos tratamentos. Neste período a história médica, o uso de algum medicamento concomitante e todos os efeitos adversos relatados pelo paciente foram anotados. Além disto, foi solicitado aos pacientes trazerem os frascos dos medicamentos utilizados para checagem do uso total dos medicamentos. Os pacientes foram questionados sobre efeitos adversos dos medicamentos e nenhum paciente relatou tal fato.

### **Monitoramento Microbiológico**

#### *Coleta das amostras*

Foram coletadas amostras de biofilme subgingival de uma bolsa  $\geq 4 \leq 6$  mm (bolsa moderada) e outra  $\geq 7$  mm (profunda) em cada quadrante de cada paciente dos grupos RAR, MTZ+AMX e aPDT, no *Baseline*, aos 90 e 180 dias pós-tratamento. No grupo da aPDT, os sítios selecionados para a coleta, foram os mesmos que receberam o tratamento com aPDT (2 por quadrante). Para a realização do exame microbiológico nos sítios experimentais foi realizada a remoção do biofilme supragengival, seguida de irrigação leve, secagem (spray ar/água) e isolamento relativo (rolos de algodão ou gaze estéril). A seguir, cones de papel absorventes estéreis (# 30, Tanari, Manacapuru, AM, Brasil) foram introduzidos no sulco gengival, em direção apical até que uma leve resistência fosse sentida, permanecendo no local por 60 segundos. Após sua remoção, os cones de papel absorventes foram armazenados em tubos eppendorfs contendo 500 $\mu$ L de solução salina tamponada (PBS, pH 7.0) e congelados a 80°C negativos, para posterior análise microbiológica (Lopes et al. 2010).



*Processamento microbiológico por meio da técnica da Reação de Polimerase em cadeia em tempo real (PCR-real time).*

O DNA das amostras de biofilme do sulco gengival obtidas foram extraídas usando um protocolo descrito por Sardi et al. (2011). Resumidamente, as amostras foram submetidas a uma solução de lise (tampão de extração e de proteinase K) e depois purificou-se utilizando clorofórmio: isoamil-álcool, seguida de precipitação do DNA com isopropanol e foi seco com etanol a 70%. O DNA foi ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris-HCl), EDTA 0,1 mM, pH 7,5; com 10 ug/ml de RNase). O DNA foi quantificado num espectrofotômetro a 260 nm (EonBioTek, EUA), a fim de se obter uma concentração padrão de 100 ng/ml e armazenada a -20 ° C para as reações subsequentes de qPCR (Sardi et al. 2011).

As amostras foram analisadas por PCR (reação em cadeia de polimerase) em tempo real para detecção e quantificação de: *Porphyromonas gingivalis* (Pg) (Ashimoto et al. 1996), *Prevotella nigrescens* (Pn) (Kuboniwa et al. 2004), *Prevotella intermedia* (Pi) (Ashimoto et al. 1996). A mistura da reação de PCR (9 µl) foi realizada com 5µl de SYBR® Green Master (Life Technologies), 0,6 µl de iniciadores específicos (10 µM cada), 3,5 µl de água deionizada e posteriormente acrescentado 1 µl do DNA diluído de cada amostra correspondente ao sítio coletado. A amplificação do DNA foi efetuada em equipamento Step One - Real Time PCR Systems (AB-Applied Biosystems). DNA extraído de cepas padrão foram utilizados para curvas padrão para obtenção dos valores de *Cycle threshold* (CT). A análise da curva de *melting* foi realizada para confirmar o sinal observado pela ligação do SYBR Green ao produto de amplificação específico e não aos possíveis dímeros de *primers*, utilizando o programa do próprio equipamento (Abiko et al. 2010). A prevalência das bactérias (em %) foi determinada a partir da dicotomização dos dados de detecção bacteriana e expressos em detectado (1) ou não detectado (0). Os valores médios dos níveis das bactérias foram obtidos a partir das curvas padrões bacterianas e expressos em ng/ml pelo programa do equipamento. Para normalizar os níveis das bactérias testadas,

os valores médios em ng/ml obtidos para os primers 16SRNA foram considerados como 100% do DNA bacteriano total e calculou-se a porcentagem de cada bactéria testada em relação ao total (média ng/ml bactéria testada ( $P_g$  ou  $P_i$  ou  $P_n$ ) x 100/média ng/ml DNA total - 16SRNA) (Nadkarni et al. 2002).

### **Análise Estatística**

Todos os dados demográficos dos parâmetros clínicos avaliados foram tabulados e submetidos a um teste de normalidade (Teste de Lilliefors,  $p < 0,05$ ). Os dados paramétricos (PS, NIC, SS e IPV para toda boca) foram submetidos ao teste de ANOVA ( $p < 0,05$ ) de um critério, associado ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), e os dados não paramétricos (Idade, Cigarros por dia, PS, NIC, SS e IPV para bolsas coletadas, moderadas e profundas) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). A diferença entre a predominância de sexo foi avaliada pelo teste de Qui-Quadrado. Para a análise estatística da porcentagem de redução das bolsas residuais coletadas também foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Os dados dos níveis das bactérias avaliadas foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para comparação entre grupos e ao teste de Wilcoxon para comparação entre períodos em cada categoria de bolsa ( $p < 0,05$ ). A análise dos dados de prevalência das bactérias foram submetidas ao teste Qui-Quadrado para comparação inter-grupo e aos teste de Wilcoxon para comparação intra-grupo em cada categoria de bolsa ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas no software Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil) com nível de significância de 5%.

### 3. Resultados

Todos os pacientes recrutados (51) foram submetidos aos tratamentos propostos. Foram tratados 35 homens e 16 mulheres com média de idade de 48 anos (35- 65 anos). Destes 51 pacientes, foram excluídos da pesquisa 8 pacientes devido ao: uso de medicamentos como anti-inflamatórios (3); mudança de cidade (1) e por não comparecerem a terceira reavaliação de 6 meses (Figura 1).

#### Achados clínicos

A Tabela 1 apresenta as características demográficas e médias dos parâmetros clínicos de boca toda avaliados no *Baseline*, 90 e 180 dias. Os pacientes do grupo MTZ+AMX relataram fumar mais cigarros que os pacientes dos outros dois outros grupos ( $p=0,01$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada período avaliado nos parâmetros de PS ( $p > 0,05$ ), NIC ( $p > 0,05$ ) e SS ( $p > 0,05$ ). Houve maior porcentagem de IPV no período de 180 dias no grupo RAR quando comparado aos grupos MTZ+AMX e aPDT ( $p=0,01$ ). Nas análises intragrupo, foi observada melhora significativa entre o *Baseline* e 90 dias no parâmetro IPV no grupo RAR ( $p<0,05$ ); melhora nos parâmetros de PS e IPV no grupo MTZ+AMX ( $p<0,05$ ), e melhora nos parâmetros clínicos de PS, NIC, SS e IPV no grupo aPDT ( $p<0,05$ ). Entre o *Baseline* e 180 dias houve melhora significativa no parâmetro IPV no grupo RAR ( $p<0,05$ ), e nesse mesmo período foi observada melhora nos parâmetros de PS, NIC, SS e IPV para os grupos MTZ+AMX ( $p<0,05$ ) e aPDT ( $p<0,05$ ). Na comparação entre os períodos de 90 e 180 dias houve redução estatisticamente significativa no IPV em todos os grupos ( $p<0,05$ ).

As médias e desvio padrão de redução de PS e NIC das bolsas coletadas (moderadas e profundas) entre *Baseline* e 90 dias, e *Baseline* e 180 dias estão apresentadas na Tabela 2. Quando analisadas todas as bolsas coletadas houve melhora na comparação entre o grupo aPDT e RAR nos parâmetros PS ( $p=0,01$ ) e NIC ( $p=0,02$ ) entre o *Baseline* e 180 dias, melhora para NIC ( $p=0,01$ ) entre *Baseline* e 90 dias. Houve maior redução de PS no grupo aPDT quando comparado ao grupo MTZ+AMX entre *Baseline* e 180 dias ( $p=0,03$ ). Nas análises da redução de bolsas moderadas, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados para PS ( $p=0,10$ ), entretanto houve melhora significativa do NIC no grupo aPDT quando comparado ao grupo RAR entre *Baseline* e 180 dias ( $p=0,01$ ). Na análise da redução das bolsas profundas não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de PS ( $p=0,31$ ) e NIC ( $p=0,33$ ) entre os grupos em nenhum período nos parâmetros avaliados.

Com relação à presença de bolsas residuais houve diminuição do número de bolsas residuais ( $\geq 4$  mm) com sangramento à sondagem em todos os tratamentos, quando comparados com os respectivos *Baseline* ( $p<0,01$ ), no entanto não houve diferenças entre os tratamentos ( $p>0,05$ ; Figura 2).

### **Achados microbiológicos**

Na comparação entre os períodos do grupo MTZ+AMX em bolsas moderadas houve redução dos níveis de *Pg* e *Pn* entre *Baseline* e 180 dias e no grupo aPDT houve redução de *Pn* aos 180 dias. Com relação às bolsas profundas houve redução de *Pg*, *Pi* e *Pn* aos 180 dias no grupo MTZ+AMX quando comparado ao *Baseline* e nos níveis de *Pi* e *Pn* aos 180 dias e de *Pn* aos 90 dias no grupo aPDT quando comparado ao *Baseline* (Tabela 3).

Os dados dos níveis da quantidade de bactérias analisadas nas bolsas moderadas coletadas demonstraram menor quantidade de *Pg* aos 90 ( $p=0,05$ ) e 180 dias ( $p=0,008$ ) no grupo MTZ+AMX quando comparada ao grupo aPDT e menor quantidade de *Pg* no grupo MTZ+AMX que no grupo RAR aos 180 dias ( $p=0,03$ ). Com relação aos dados das bolsas profundas os resultados demonstraram maiores níveis de *Pg* no grupo aPDT quando comparado aos grupos MTZ+AMX ( $p=0,01$ ) e RAR ( $p=0,03$ ) aos 90 dias e menores níveis no grupo MTZ+AMX quando comparado a RAR ( $p=0,002$ ) e aPDT ( $p=0,003$ ) aos 180 dias. Os níveis de *Pi* foram maiores no grupo aPDT aos 180 dias quando comparado aos grupos RAR ( $p=0,03$ ) e MTZ+AMX ( $p=0,002$ ) enquanto que os níveis de *Pn* foram menores no grupo aPDT quando comparado aos grupos RAR ( $p=0,03$ ) e MTZ+AMX ( $p=0,005$ ) em bolsas profundas aos 90 dias (Tabela 3).

Com relação à prevalência dos microrganismos avaliados os resultados demonstraram que a *Pg* foi a bactéria mais prevalente em todos os períodos e grupos e que a antibioticoterapia foi o tratamento mais efetivo na redução da prevalência de *Pg*. Houve uma redução da prevalência de *Pi* nas bolsas moderadas tratadas com RAR e aPDT e nas bolsas profundas tratadas com antibioticoterapia, e redução de *Pn* nas bolsas moderadas e profundas tratadas com aPDT e MTZ+AMX (Figura 3).

## 4. Discussão

Na análise dos resultados de boca toda deste estudo observou-se que, clinicamente, a RAR isolada não foi efetiva para a redução de PS, SS e de NIC após 90 e 180 dias. Estes resultados são confirmados em outros estudos clínicos em fumantes que demonstraram que há uma grande dificuldade em conseguir sucesso no tratamento periodontal de pacientes fumantes (Pahkla et al. 2006, Grossi et al. 2007). Assim há um interesse crescente em definir a terapia periodontal mais efetiva para fumantes, pois o insucesso do tratamento está relacionado com o fato deste grupo de pacientes responder deficientemente às terapias mecânicas como RAR (Pahkla et al. 2006).

Por outro lado, os tratamentos coadjuvantes avaliados neste estudo (aPDT e MTZ+AMX) foram efetivos na redução de PS aos 90 e 180 dias. Além disto, houve maior redução do NIC e SS no grupo aPDT aos 90 e 180 dias e no grupo MTZ+AMX aos 180 dias.

Na comparação da redução de PS das bolsas coletadas pode-se observar que os pacientes do Grupo aPDT apresentaram maiores reduções de PS aos 180 dias, quando comparados ao tratamento de RAR apenas. O tratamento com aPDT promoveu maior redução de NIC aos 90 e 180 dias quando comparado com RAR apenas. Diante dos resultados deste estudo, pode-se considerar que a associação do MTZ à AMX utilizada durante 7 dias tem potencial para promover benefícios clínicos, quando utilizados como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes fumantes. Vários antibióticos sistêmicos ou associações de antibióticos têm sido utilizados como terapias coadjuvantes ao tratamento da periodontite crônica em fumante, como o uso de MTZ, Azitromicina, Doxiciclina, AMX+MTZ (Palmer et al. 1999, Mascarenhas et al. 2005, Dastoor et al. 2007, Needleman et al. 2007, Matarazzo et al. 2008). No entanto, ainda não há um consenso de

uso da antibioticoterapia sistêmica, pois poucos estudos têm avaliado seu efeito como coadjuvante ao tratamento periodontal e cada estudo faz uso de um antibiótico diferente. Estudo prévio demonstrou que não houve diferenças em nenhum parâmetro clínico, quando comparado RAR e RAR+MTZ (200 mg, 3 vezes ao dia durante 7 dias) em fumantes (Palmer et al. 1999). Estudos clínicos também têm relatado que na comparação de paciente fumantes e não fumantes, os fumantes respondem menos favoráveis ao tratamento (Pahkla et al. 2006, Favari et al. 2014). Todavia o uso de terapia adjunta com MTZ ou MTZ + AMX promove benefícios clínicos e microbiológicos no tratamento de pacientes com periodontite crônica em não fumantes (Winkel et al. 2001, Rooney et al. 2002, Haffajee et al. 2007, Haffajee et al. 2008) e em pacientes fumantes (Pahkla et al. 2006, Matarazzo et al. 2008). Outro estudo sugere que os fumantes podem ter uma vantagem específica, quando tratados com a combinação de AMX e MTZ na fase não cirúrgica, reduzindo a necessidade de cirurgias (Mombelli et al. 2015).

Além disso, tem sido demonstrado que as terapias com MTZ ou MTZ+AMX promovem mais benefícios clínicos significantes no tratamento de periodontite crônica em fumantes do que a RAR somente, e ainda que os maiores benefícios são observados no tratamento realizado com MTZ + AMX durante 14 dias (Matarazzo et al. 2008), quando comparado ao MTZ apenas. No entanto no presente estudo foi prescrita a mesma dosagem dos antibióticos durante 7 dias apenas. A variabilidade da dosagem, frequência, momento da utilização e escolha do antibiótico remete a questionamentos sobre a necessidade de determinar protocolos efetivos para esta terapia. A dosagem é primordial na determinação dos resultados clínicos e microbiológicos da terapia coadjuvante antimicrobiana sistêmica, tornando necessários futuros estudos para avaliar a melhor dosagem, em relação à ocorrência de eventos adversos e adesão do paciente ao protocolo de tratamento. Com relação a efeitos adversos nenhum paciente, incluso neste estudo, relatou a ocorrência após

o uso dos antibióticos, fato também observado em outros estudos que avaliaram o efeito de antibioticoterapia sistêmica em fumantes (Dastoor et al. 2007, Needleman et al. 2007, Matarazzo et al. 2008).

Com relação ao SS, houve uma melhora significativa nos Grupos MTZ+AMX aos 180 dias e no Grupo aPDT aos 90 e 180 dias. Mas estes resultados são controversos, já que devido à ação vasoconstritora da nicotina, a doença periodontal geralmente é mascarada devido à falta dos sinais clássicos da inflamação gengival, embora quando feita a sondagem possa ocorrer sangramento (Dietrich et al. 2004). Assim, devido ao fato de haver menor SS nos pacientes fumantes, quando comparado aos não fumantes, leva-nos crer que independentemente da terapia, este parâmetro clínico está alterado pelo cigarro. Com relação ao risco dos pacientes para progressão da periodontite, o número de bolsas residuais, a presença de sangramento à sondagem e o tabagismo são considerados fatores de risco (Lang & Tonetti 2003).

A vantagem do uso de antibioticoterapia associada ao tratamento mecânico convencional em fumantes poderia ser a diminuição da necessidade de retratamento pela redução de bolsas residuais, o que reduziria o custo em comparação a repetidos episódios de tratamento, além de que repetidos tratamentos de RAR podem promover maiores danos aos tecidos dentários mineralizados e produzir maior recessão gengival. No entanto, o uso restrito de antibioticoterapia tem sido recomendado para limitar o desenvolvimento da resistência microbiana (Mombelli 2006).

Por outro lado, na avaliação da presença de bolsas residuais, todos os tratamentos promoveram reduções percentuais significantes, no entanto, a porcentagem de SS manteve-se acima de 50%, cujo valor é considerado como valor de alto risco de progressão da doença (Lang & Tonetti 2003).



Com relação à aPDT, alguns estudos clínicos em humanos não mostraram vantagens clínicas na redução de PS e no ganho de NIC, quando utilizada em uma única sessão, no tratamento da periodontite crônica (Polansky et al. 2009, Theodoro et al. 2012), no entanto, outros demonstraram que esta terapia foi capaz de reduzir o SS de sítios tratados (Chondros et al. 2008, Cristodoulides et al. 2008, Ge et al. 2011). Por outro lado, estudos que avaliaram o efeito de múltiplas aplicações de aPDT no tratamento periodontal de bolsas residuais observaram melhoras clínicas na redução de PS com redução de sangramento (Lulic et al. 2009, Müller Campanile et al. 2015) corroborando os achados do presente estudo, enquanto que outro estudo que realizou três aplicações de aPDT em bolsas residuais no primeiro, terceiro e sétimo dia após a RAR não demonstrou melhoras clínicas em relação aos parâmetros PS e NIC, apenas maior redução de SS aos 3 e 12 meses (Petelin et al. 2014). Estas diferenças de resultados podem estar relacionadas às diferenças das metodologias empregadas nos estudos como tempo de pré-irradiação, parâmetros, modo, número e frequência das irradiações laser.

Com relação ao uso da aPDT no tratamento periodontal de fumantes um estudo clínico avaliou o efeito de uma sessão de aPDT no tratamento de periodontite e observou melhoras significantes na redução de IL-1 $\beta$ , uma semana após o tratamento e de MMP-8, 12 semanas após o tratamento, sugerindo a possibilidade de um efeito positivo na cicatrização periodontal, no entanto, quanto à redução de PS e ganho de NIC a aPDT não promoveu vantagens clínicas (Queiroz et al. 2013).

Na análise microbiológica do presente estudo observou-se que a antibioticoterapia foi efetiva para redução de todos os microrganismos avaliados e que a aPDT foi efetiva na redução de *Pi* e *Pn*. Por outro lado, o tratamento com RAR não promoveu redução significativa dos níveis dos microrganismos quando comparado ao *Baseline*.

Com relação aos estudos clínicos que avaliaram o efeito da aPDT sobre microrganismos periodontopatogênicos, a literatura relata uma variabilidade de resultados sendo que alguns estudos demonstraram redução de microrganismos periodontopatogênicos (Theodoro et al. 2012, Petelin et al. 2014) e outros estudos não demonstraram (Polansky et al. 2009, Queiroz et al. 2014, Müller-Campanile et al. 2015). Theodoro et al. (2012) demonstraram seis meses depois do tratamento, uma redução significativa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa)*, *Pg*, *Pi*, *Tannerella forsythia (Tf)* e *Fusobacterium nucleatum (Fn)* enquanto que Petelin et al. (2014), avaliaram o uso de 3 aplicações e demonstraram aos 6 meses pós-tratamento, redução de *Td*, *Aa* e *Tf*.

Corroborando os achados do presente estudo, outros estudos com antibioticoterapia em fumantes demonstraram que a associação de MTZ+AMX promoveu redução de proporção de *Tf*, *Pg* e *Treponema denticola (Td)* (Matarazzo et al. 2008, Favari et al. 2014) e o MTZ isolado promoveu a redução de *Aa*, *Pg* e *Pi* (Söder et al. 1999).

Na avaliação comparativa dos dados do presente estudo evidenciou-se que o tratamento mecânico convencional de RAR em fumantes deve ser complementado com um tratamento coadjuvante. Adicionado a este fato, na comparação dos tratamentos coadjuvantes observou-se que as duas terapias foram efetivas e promoveram benefícios adicionais no tratamento de fumantes, com a vantagem da aPDT ser uma terapia local, não promover resistência bacteriana e nem efeitos colaterais.

Assim, diante da metodologia empregada e dos resultados deste estudo pode-se concluir que o uso coadjuvante de MTZ+AMX ou de três sessões de aPDT constituem-se em terapias efetivas para o tratamento da periodontite em fumantes e que a aPDT promoveu maiores benefícios clínicos que o uso da antibioticoterapia, enquanto que a RAR isolada não é efetiva no tratamento de fumantes. Por outro lado, o uso de antibioticoterapia

mostrou-se como o tratamento mais efetivo na redução de microrganismos periodontopatogênicos. Entretanto, devido ao número limitado de estudos em fumantes há a necessidade da realização de mais estudos clínicos controlados randomizados para avaliar o efeito de antibioticoterapia e de outros protocolos de aPDT em pacientes fumantes.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a disciplina de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista, UNESP e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado (Processo FAPESP 2013/05424-3).

- Abiko, Y., Sato, T., Mayanagi, G., Takahashi, N. (2010) Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodont Res* **45**, 389–395.
- Adriaens, P.A., Adriaens, L.M. (2004) Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000* **36**, 121-145.
- Ainamo, J. & Bay, I. (1975) Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* **25**, 229-235.
- Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J.H., Oshiiwa, M., Garcia, V.G. (2007) Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* **78**, 566-575.
- Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Oschiwa, M., Garcia, V.G. (2008a) In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *J Periodontol* **79**, 1081-1088.
- Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Bonfante, S., Garcia, V.G. (2008b) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* **79**, 2156-2165.
- Al-Zahrani, M.S., Bamshmous, S.O., Alhassani, A.A., Al-Sherbini, M.M. (2009) Short-Term Effects of Photodynamic Therapy on Periodontal Status and Glycemic Control of Patients With Diabetes. *J Periodontol* **80**, 1568-1573.
- Amano, A. (2007) Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci* **12**, 3965-3974.

- Andersen, R., Loebel, N., Hammond, D., Wilson, M. (2007) Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J. Clin. Dent* **18**, 34-38.
- Angaji, M., Gelskey, S., Nogueira-Filho, G., Brothwell, D. (2010) A systematic review of clinical efficacy of adjunctive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. *J Periodontol* **81**, 1518-1528.
- Apatzidou, D.A., Riggio, M.P., Kinane, D.F. (2005) Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* **32**, 973–983.
- Ardila, C.M., Granada, M.I., Guzman, I.C. (2010) Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* **45**, 557–563.
- Armitage, G.C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Armitage, G.C. (2004) The complete periodontal examinations. *Periodontol 2000* **34**, 22-33.
- Ashimoto, A., Chen, C., Bacher, I., Slots, J. (1996) Polymerase chain reaction of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* **11**, 266-273.
- Atieh, M.A. (2010) Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci* **25**, 605-613.
- Bergström, J. (2003) Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J Clinical Periodontol* **30**, 107–113.
- Braun, A., Dehn, C., Krause, F., Jepsen, S. (2008) Short term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **35**, 877-884.

- Carvalho, A.S., Napimoga, M.H., Coelho-Campos, J., Silva-Filho, V.J, Thedei, G. (2011) Photodynamic Therapy Reduces Bone Resorption and Decreases Inflammatory Response in an Experimental Rat Periodontal Disease Model. *Photomed. Laser Surg* **29**, 735-740.
- Chan., Y, Lai, C.H. (2003) Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **18**, 51–55.
- Chondros, P., Nikolidakis, D., Christodoulides, N., Rössler, R., Gutknecht, N., Sculean, A. (2009) Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* **24**, 681-688.
- Christodoulides, N., Nikolidakis, D., Chondros, P., Becker, J., Schwarz, F., Rössler, R., Sculean, A. (2008) Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* **79**, 1638-44.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G., Mombelli, A. (2009) Amoxicilin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planning of Chronic periodontitis. *J periodontal* **80**, 364-371.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G., Mombelli, A. (2010) Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planning with or without Amoxicilin/Metronidazole in Chronic periodontitis. *J periodontal* **81**, 15-23.
- Dastoor, S.F., Travan, S., Neiva, R.F., Rayburn, L.A., Giannobile, W.V., Wang, H.L. (2007) Effect of adjunctive systemic azithromycin with periodontal surgery in the treatment of chronic periodontitis in smokers: A pilot study. *J Periodontol* **78**, 1887-1896.

- Décaillet, F., Gainnopolou, C., Cionca, N., Almaghlouth, A., Mombelli, A. (2012) Microbial profiles of patients seeking treatment for periodontitis. Influence of origin, smoking and age? *Schweiz Monatsschr Zahnmed* **122**, 198-204.
- Dietrich, T., Bernimoulin, J.P., Glynn, R.J. (2004) The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. *J Periodontol* **75**, 16-22.
- Drisko, C.H. (1996) Non-surgical pockets therapy: pharmacotherapeutics. *Ann Periodontol* **1**, 491-566.
- Faveri, M., Rebello, A., de Oliveira Dias, R., Borges-Junior, I., Duarte, P.M., Figueiredo, L.C., Feres, M. (2014) Clinical and microbiologic effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized chronic periodontitis: smokers versus non-smokers. *J Periodontol* **85**, 581-591.
- Feres, M., Haffajee, A.D., Allaard, K., Som, S., Goodson, J.M., Socransky, S.S. (2002) Antibiotics residence of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* **29**, 724-735.
- Fernandes, L.A., de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J.H., Martins, T.M., Okamoto, T., Garcia, V.G. (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* **36**, 219-228.
- Fontana, C.R., Abernethy, A.D., Som, S., Ruggiero, K, Doucette, S., Marcantonio, R.C., Boussios, C.I., Kent, R., Goodson, J.M., Tanner, A.C.R., Soukos, N.S. (2009) The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodont Res* **44**, 751-759.
- Garcia, V.G, Gualberto Júnior, E.C., Fernandes, L.A, Bosco, A.F., Hitomi Nagata, M.J., Casatti, C.A., Ervolino, E., Theodoro, L.H. (2013) Adjunctive Antimicrobial Photodynamic Treatment of Experimentally Induced Periodontitis in Ovariectomized Rats. *J Periodontol* **84**, 556-565.



- Garcia, V.G., Fernandes, L.A., Macarini, V.C., de Almeida, J.M., Martins, T.M., Bosco, A.F., Nagata, M.J.H., Cirelli, J.A., Theodoro, L.H. (2011) Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol* **38**, 1106-1114.
- Garcia, V.G., Longo, M., Fernandes, L.A., Junior, E.C, dos Santos Santinoni, C., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Theodoro, L.H. (2013) Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **28**, 143-150.
- Garcia, V.G., Longo, M., Gualberto Júnior, E.C., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Ervolino, E., Theodoro, L.H. (2014) Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* **49**, 584-594.
- Ge, L., Shu, R., Li, Y., Li, C., Luo, L., Song, Z., Xie, Y., Liu, D. (2011) Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg* **29**, 33-37.
- Goulart, R.de C., Thedei, G. Jr, Souza, S.L, Tedesco, A.C, Ciancaglini, P. (2010) Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* **28**, 85-90.
- Grossi, S.G., Goodson, J.M., Gunsolley, J.C., Otomo-Corgel, J., Bland, P.S., Doherty, F., Comiskey, J. (2007) Mechanical therapy with adjunctive minocycline microspheres reduces red-com plex bacteria in smokers. *J Periodontol* **78**, 1741–1750.
- Guglielmetti, M.R., Rosa, E.F., Lourenção, D.S., Inoue, G., Gomes, E.F., De Micheli, G., Mendes, F.M., Hirata, R.D., Hirata, M.H., Pannuti, C.M. (2014) Detection and

- Quantification of Periodontal Pathogens in Smokers and Never-Smokers With Chronic Periodontitis by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Periodontol* **85**, 1450-1457.
- Haffajee, A.D., & Socransky, S.S. (2001) Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* **28**, 377–388.
- Haffajee, A.D., Torresyap, G., Socransky, S.S. (2007) Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J Clin Periodontol* **34**, 243-53.
- Haffajee, A.D, Patel, M., Socransky, S.S. (2008) Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 148-157.
- Heasman, L., Stacey, F., Preshaw, P.M., McCracken, G.I., Hepburn, S., Heasman, P.A. (2006) The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontol* **33**, 241–253.
- Kömerik, N., Nakanishi, H., Macrobert, A.J., Henderson, B., Speight, P., Wilson, M. (2003) In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 932-940.
- Kuboniwa, M., Amano, A., Kimura, K.R., Sekine, S., Kato, S., Yamamoto, Y., Okahashi, N., Iida, T., Shizukuishi, S. (2004) Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol* **19**, 168-176.
- Lang, N.P. & Tonetti, M.S. (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health & Preventive Dentistry* **1**, 7-16.

- Lopes, B.M., Theodoro, L.H., Melo, R.F., Thompson, G.M., Marcantonio R.A. (2010) Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planing. *J Periodontol* **81**, 682-91.
- Lulic, M., Leiggener Görög, I., Salvi, G.E., Ramseier, C.A., Mattheos, N., Lang, N.P. (2009) One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **36**, 661-666.
- Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K., Hill, R., Soehren, S., Fenno, J.C., Giannobile, W.V., Wang, H.L. (2005) Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Periodontol* **76**, 426-36.
- Matarazzo, F., Figueiredo, L.C., Cruz, S.E., Faveri, M., Feres, M. (2008) Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* **35**, 885-896.
- Moher, D., Hopewell, S., Schulz, K.F., Montori, V., Gøtzsche, P.C., Devereaux, P.J., Elbourne D, Egger M, Altman DG; CONSORT. (2012) CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Int J Surg* **10**, 28-55
- Mombelli, A. (2006) Heresy? Treatment of chronic periodontitis with systemic antibiotics only. *J Clin Periodontol* **33**, 661-662.
- Mombelli, A., Cionca, N., Almaghlouth, A. (2011) Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery? *Periodontol 2000* **55**, 205-216.

- Mombelli, A., Almaghlouth, A., Cionca, N., Courvoisier, D.S., Giannopoulou, C. (2015) Differential benefits of amoxicillin-metronidazole in different phases of periodontal therapy in a randomized controlled crossover clinical trial. *J Periodontol* **86**, 367-375.
- Müller Campanile, V.S., Giannopoulou, C., Campanile, G., Cancela, J.A., Mombelli, A. (2015) Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lasers Med Sci* **30**, 27-34.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* **148**, 257-66.
- Needleman, I., Suvan, J., Gilthorpe, M.S., Tucker, R., St George, G., Giannobile, W., Tonetti, M., Jarvis, M. (2007) A randomized-controlled trial of low-dose doxycycline for periodontitis in smokers. *J Clin Periodontol* **34**, 325-33.
- Noro Filho, G.A., Casarin, R.C., Casati, M.Z., Giovani, E.M. (2012) PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: A split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers Surg Med* **44** [Epub ahead of print] DOI 10.1002/lsm.22016.
- Pahkla, E.R., Koppel, T., Naaber, P., Saag, M., Loivukene, K. (2006) The efficacy of nonsurgical and systemic antibiotic treatment on smoking and non-smoking periodontitis patients. *Stomatologija Baltic Dental and Maxillofacial Journal* **8**, 116–121.
- Palmer, R.M., Matthews, J.P., Wilson, R.F. (1999) Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol.* **26**, 158-166.

- Petelin, M., Perkič, K., Seme, K., Gašpirc, B. (2014) Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci* **24**, doi 10.1007/s10103-01401632-2.
- Pinheiro, S.L., Donegá, J.M., Seabra, L.M., Adabo, M.D., Lopes, T., Do Carmo, T.H., Ribeiro, M.C., Bertolini, P.F. (2010) Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* **25**, 87-91.
- Polansky, R., Haas, M., Heschl, A., Wimmer, G. (2009) Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* **36**, 575-580.
- Prates, R.A., Yamada, A.M., Suzuki, L.C., França, C.M., Cai, S., Mayer, M.P., Ribeiro, A.C., Ribeiro, M.S. (2011) Histomorphometric and Microbiological Assessment of Photodynamic Therapy as an Adjuvant Treatment for Periodontitis: A Short-Term Evaluation of Inflammatory Periodontal Conditions and Bacterial Reduction in a Rat Model. *Photomed Laser Surg* **12**, 835–844.
- Qin, Y., Luan, X., Bi, L., He, G., Bai, X., Zhou, C., Zhang, Z. (2008) Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci* **23**, 49-54.
- Queiroz, A.C., Suaid, F.A., de Andrade, P.F., Oliveira, F.S., Novaes, A.B. Jr, Taba, M. Jr, Palioto, D.B., Grisi, M.F., Souza, S.L. (2013) Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci* **30**, 617-625.
- Queiroz, A.C., Suaid, F.A., de Andrade, P.F., Oliveira, F.S., Novaes, A.B. Jr, Taba, M. Jr., Palioto, D.B., Grisi, M.F., Souza, S.L. (2015) Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci* **30**, 617-625.

- Ribeiro, E.D.P., Bittencourt, S., Zanin, I.C.J., Ambrosano, G.M.B., Sallum, E.A., Nociti Jr, F.H., Gonçalves, R.B., Casati, M.Z. (2009) Full mouth ultrasonic debridement associated with amoxicillin and metronidazole in treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol* **80**, 1254-1264.
- Rooney, J., Wade, W.G., Sprague, S.V., Newcombe, R.G., Addy, M. (2002) Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *J Clin Periodontol* **29**, 342–350.
- Sardi, J.C., Duque, C., Camargo, G.A., Höfling, J.F., Gonçalves, R.B. (2011) Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis--a pilot study. *Arch Oral Biol.* **56**, 1098-1105.
- Sgolastra, F., Gatto, R., Petrucci, A., Monaco, A. (2012) Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planning in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* **10**, 1257-1269.
- Shchipkova, A.Y., Nagaraja, H.N., Kumar, P.S. (2010) Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Dent Res* **89**, 1247-1253.
- Sigusch, B.W., Pfitzer, A., Albrecht, V., Glockman, E. (2005) Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* **76**, 1100-1105.
- Silva, M.P., Feres, M., Siroto, T.A., Soares, G.M., Mendes, J.A., Faveri, M. Figueiredo, L.C. (2011) Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **38**, 828–837.

- Söder, B., Nedlich, U., Jin, L.J. (1999) Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol* **70**, 761-771.
- Soukos, N.S., Som, S., Abernethy, A.D., Ruggiero, K., Dunham, J., Lee, C, Doukas, A.G., Goodson, J.M. (2005) Phototargeting oral blackpigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1391–1396.
- Theodoro, L.H., Silva, S.P., Pires, J.R., Soares, G.H., Pontes, A.E., Zuza, E.P., Spolidório, D.M., de Toledo, B.E., Garcia, V.G. (2012) Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci* **27**, 687-693.
- Umeda, M., Takeuchi, Y., Noguchi, K., Huang, Y., Koshy, G., Ishikawa, I. (2004) Effects of non surgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* **36**, 98-120.
- Walker, C. & Karpinia, K. (2002) Rationale for use of antibiotic in periodontics. *J Periodontol* **73**, 1188-1196.
- Walker, C.B. (1996) The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000* **10**, 79-88.
- Winkel, E.G., van Winkelhoff, A.J., Timmerman, M.F, van der Velden, U., van der Weijden, G.A. (2001) Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo controlled study. *J Clin Periodontol* **28**, 296–305.
- Zandbergen, D., Slot, D.E., Cobb, C.M., Van der Weijden, F.A. (2013) The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *J Periodontol* **84** 332-351.

Tabela 1. Características demográficas, média e desvio padrão (M ± DP) dos parâmetros clínicos (PS, NIC, SS, IPV) de boca toda no *Baseline*, 90 e 180 dias após tratamento.

Variável	Grupo RAR*	Grupo MTZ+AMX*	Grupo aPDT*	P-valor **
Idade (anos)	46,2 ± 6,7	48,9 ± 5,1	48,8 ± 3,9	0,80
Mulheres, n(%)	4 (28,6%)	5 (35,7%)	5 (33,3%)	0,91
Cigarros por dia	14,93 ± 3,52	18,93 ± 3,50	15,00 ± 3,27	0,01; 0,93; 0,01
PS (mm)				
<i>Baseline</i>	4,19 ± 0,85	4,04 ± 0,38	4,02 ± 0,42	0,83; 0,84; 0,99
90 dias	4,84 ± 0,62	3,59 ± 0,59†	3,58 ± 0,36†	0,51; 0,29; 0,70
180 dias	3,85 ± 0,73	3,48 ± 0,35†	3,54 ± 0,33†	0,10; 0,23; 0,64
NIC (mm)				
<i>Baseline</i>	4,68 ± 0,94	4,64 ± 0,37	4,55 ± 0,39	0,54; 0,92; 0,60
90 dias	4,51 ± 0,80	4,21 ± 0,58	4,12 ± 0,36†	0,53; 0,12; 0,35
180 dias	4,47 ± 0,80	4,12 ± 0,38†	4,11 ± 0,34†	0,17; 0,13; 0,92
SS %				
<i>Baseline</i>	76,48 ± 22,68	87,57 ± 9,33	87,88 ± 9,61	0,14; 0,13; 0,97
90 dias	69,12 ± 19,44	79,45 ± 12,60	69,40 ± 13,08†	0,23; 0,71; 0,11
180 dias	68,89 ± 22,02	70,66 ± 18,89†	59,69 ± 17,97†	0,94; 0,11; 0,09
IPV %				
<i>Baseline</i>	97,00 ± 3,72	93,29 ± 4,69	97,80 ± 3,02	0,24; 0,80; 0,15
90 dias	86,50 ± 4,35†	85,79 ± 6,95†	88,40 ± 5,45†	0,97; 0,59; 0,62
180 dias	66,21 ± 9,74†‡	58,79 ± 6,93†‡	56,80 ± 5,35†‡	0,01; 0,01; 0,72

\* Média ± desvio padrão ou número de participantes (porcentagem).

\*\* p-valor para RAR vs MTZ+AMX; RAR vs aPDT; MTZ+AMX vs aPDT.

† Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao *Baseline* do mesmo grupo.

‡ Diferença estatisticamente significativa quando comparado com a avaliação de 90 dias do mesmo grupo.



Tabela 2. Média e desvio padrão (M ± DP) da redução de PS e NIC de bolsas coletadas (moderadas e profundas) entre *Baseline* e 90 dias, e *Baseline* e 180 dias.

Variável	Grupo RAR*	Grupo MTZ+AMX*	Grupo aPDT*	P-valor **
<b>Bolsas Coletadas</b>				
PS (mm)				
0 - 90 dias	1,27 ± 0,63	1,29 ± 0,68	1,66 ± 0,75	0,82; 0,06; 0,10
0 - 180 dias	1,29 ± 0,66	1,42 ± 0,41	1,95 ± 0,76	0,25; 0,01; 0,03
NIC (mm)				
0 - 90 dias	1,01 ± 0,74	1,34 ± 0,65	1,64 ± 0,86	0,19; 0,01; 0,27
0 - 180 dias	1,17 ± 0,82	1,46 ± 0,37	1,92 ± 0,95	0,18; 0,02; 0,38
<b>Bolsas Moderadas</b>				
PS (mm)				
0 - 90 dias	0,66 ± 0,46	0,89 ± 0,68	0,92 ± 0,66	0,10
0 - 180 dias	0,68 ± 0,49	0,86 ± 0,55	1,15 ± 0,51	0,10
NIC (mm)				
0 - 90 dias	0,52 ± 0,70	1,03 ± 0,55	0,88 ± 0,67	0,06; 0,06; 0,99
0 - 180 dias	0,68 ± 0,61	0,76 ± 0,67	1,20 ± 0,64	0,58; 0,01; 0,06
<b>Bolsas Profundas</b>				
PS (mm)				
0 - 90 dias	2,04 ± 1,12	1,88 ± 1,76	2,50 ± 1,76	0,31
0 - 180 dias	2,40 ± 1,14	2,40 ± 1,55	3,54 ± 2,43	0,31
NIC (mm)				
0 - 90 dias	2,19 ± 1,95	1,79 ± 1,83	3,04 ± 2,50	0,33
0 - 180 dias	2,38 ± 1,91	2,43 ± 1,60	3,49 ± 2,61	0,33

\* Média ± desvio padrão

\*\* p-valor para RAR vs MTZ+AMX; RAR vs aPDT; MTZ+AMX vs aPDT

Tabela 3. Média (mediana) erro padrão dos níveis dos periodontopatógenos avaliados em relação ao DNA total (16S) no *Baseline*, 90 e 180 dias.

Variável	Grupo RAR*	Grupo MTZ+AMX*	Grupo aPDT*	P-valor **
<b>Bolsas moderadas</b>				
<b><i>P. gingivalis</i></b>				
<i>Baseline</i>	1,21 (0,39)0,57	5,2 (0,02)4,15	1,13(0,04)0,62	0,734;0,621;0,949
90 dias	4,97 (0) 4,79	0,3(0)0,21	0,97(0,16)0,45	0,390;0,496;0,05
180 dias	0,45(0,15)0,22	0,37 (0)0,32‡	1,20(0,26)0,55	0,03;0,488;0,008
<b><i>P. intermedia</i></b>				
<i>Baseline</i>	0,31(0)0,3	0,01(0)0,01	0,17(0,01)0,1	0,511;0,186;0,063
90 dias	0	0,04(0)0,02	0,02(0)0,01	0,311;0,555;0,650
180 dias	0	0	1,58(0)1,49	1;0,175;0,175
<b><i>P. nigrescens</i></b>				
<i>Baseline</i>	0,33(0)0,23	0,09(0)0,03	1,79(0)1,78	0,511;0,780;0,270
90 dias	0,12(0)0,1	0,1(0)0,06 ¥	0,01(0)0	0,579;0,964;0,496
180 dias	0,02(0)0,01	0 ‡	0 ‡	0,511;0,440;1
<b>Bolsas profundas</b>				
<b><i>P. gingivalis</i></b>				
<i>Baseline</i>	0,88(0,36)0,36	1,44 (0,04)0,63	1,33(0,51)0,49	0,650;0,618;0,683
90 dias	0,45 (0) 0,21	0,15(0)0,11	2,51(0,49)1,51	0,550;0,03;0,01
180 dias	1,08 (0,16) 0,63	0,1(0)0,05 ‡	2,79(0,54)1,60	0,002;0,836;0,003
<b><i>P. intermedia</i></b>				
<i>Baseline</i>	0	0,17(0)0,02	0	0,259;0,751;0,158
90 dias	0,02(0)0,02	0,42(0)0,39¥	0,01(0)0,01	0,202;0,342;0,339
180 dias	0	0 ‡	0,07(0)0,03 ‡	1;0,003;0,002
<b><i>P. nigrescens</i></b>				
<i>Baseline</i>	0,03(0)0,02	0,1(0)0,06	0,05(0)0,03	0,259;0,525;0,533
90 dias	0,07(0)0,07	0,01(0,01)0,07¥	0†	0,094;0,03;0,005
180 dias	0	0 ‡	0‡	0,756;0,446;0,722

\* Média (mediana) erro- padrão

\*\* p-valor para RAR vs MTZ+AMX; RAR vs aPDT; MTZ+AMX vs aPDT, de acordo com o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ )

† Diferença estatisticamente significativa quando comparado *Baseline* e 90 dias do mesmo grupo, de acordo com o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ )

‡ Diferença estatisticamente significativa quando comparado *Baseline* e 180 dias do mesmo grupo, de acordo com o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ )

¥ Diferença estatisticamente significativa quando comparado 90 e 180 dias do mesmo grupo, de acordo com o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ )

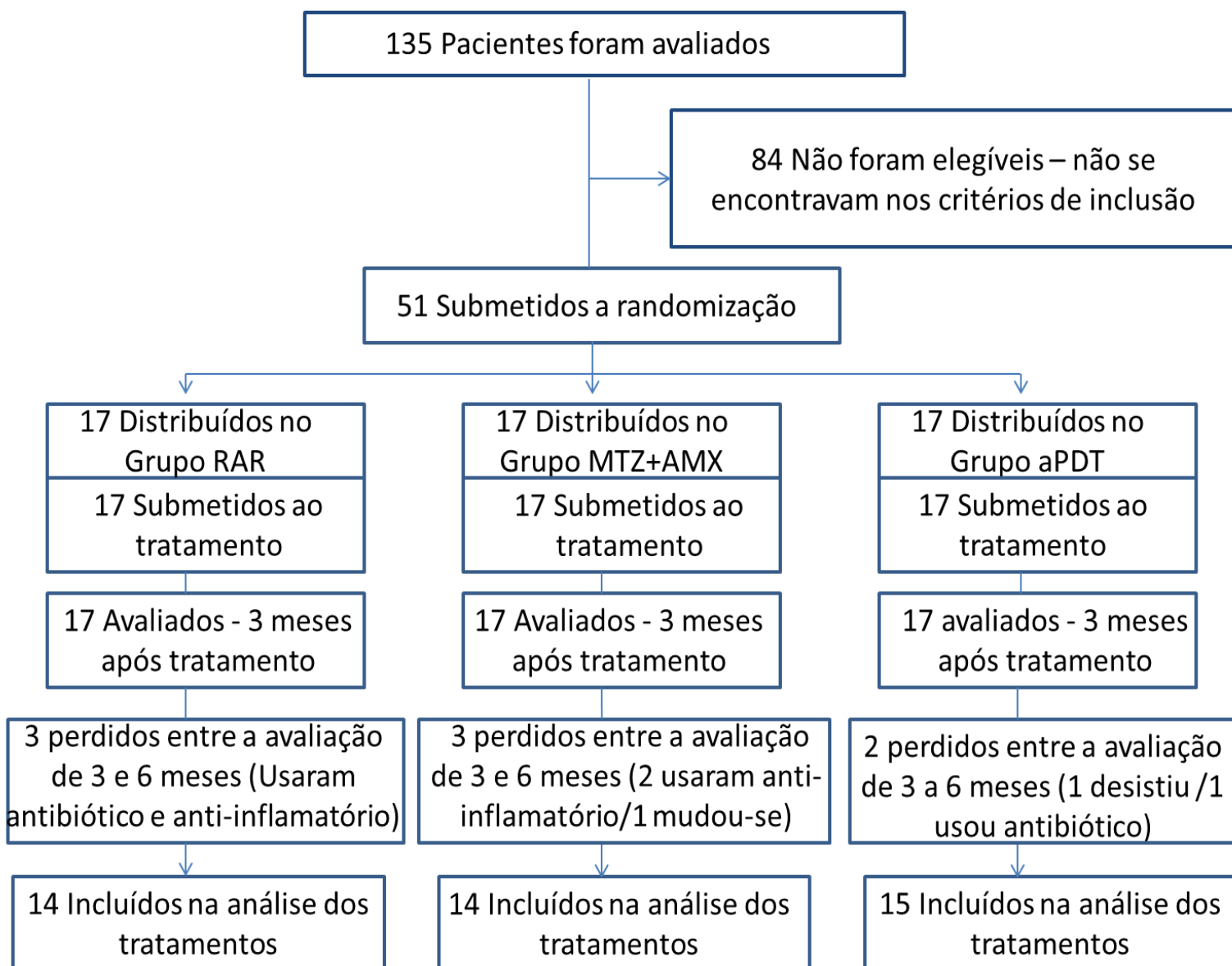


Figura 1. Fluxograma clínico.

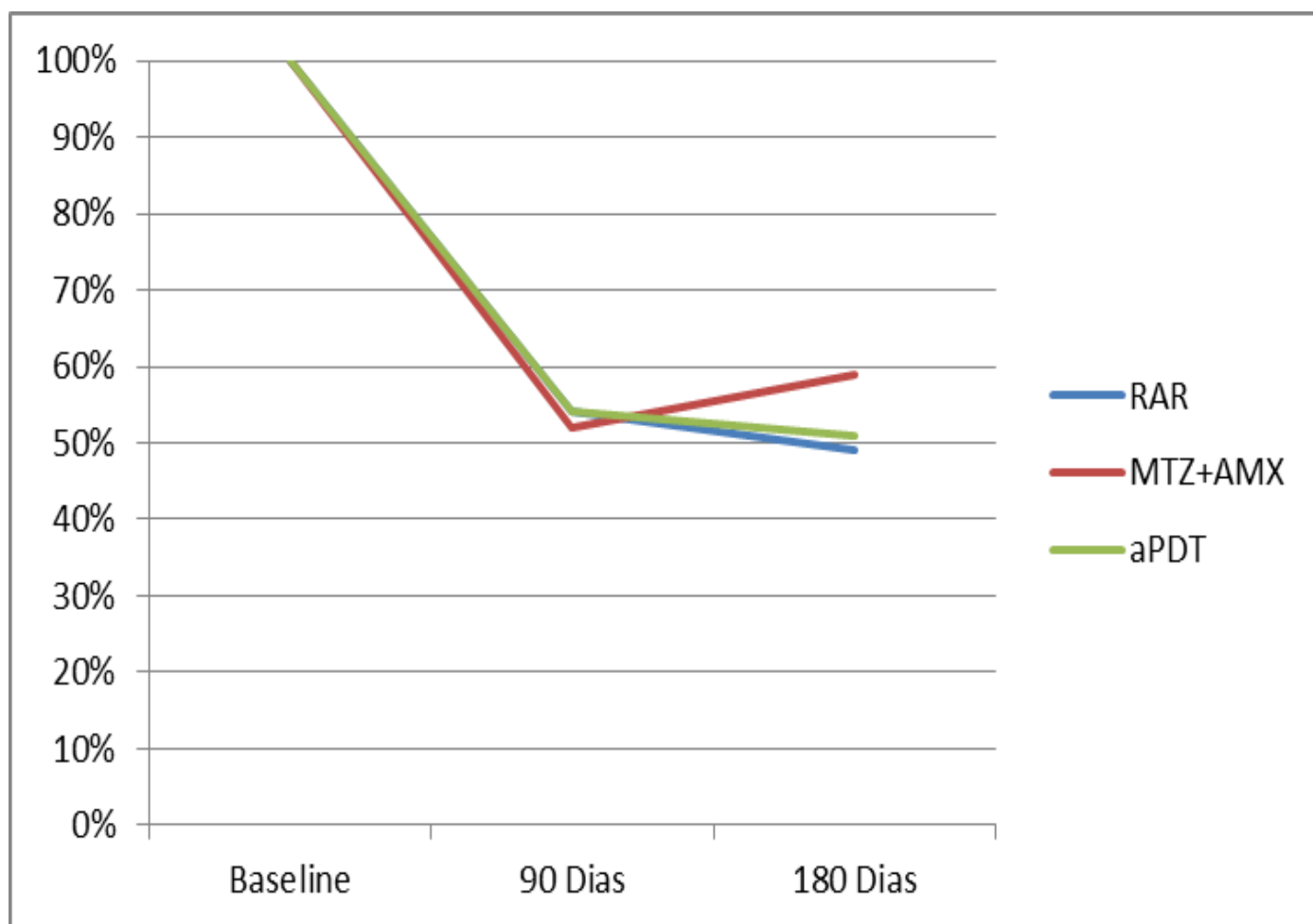
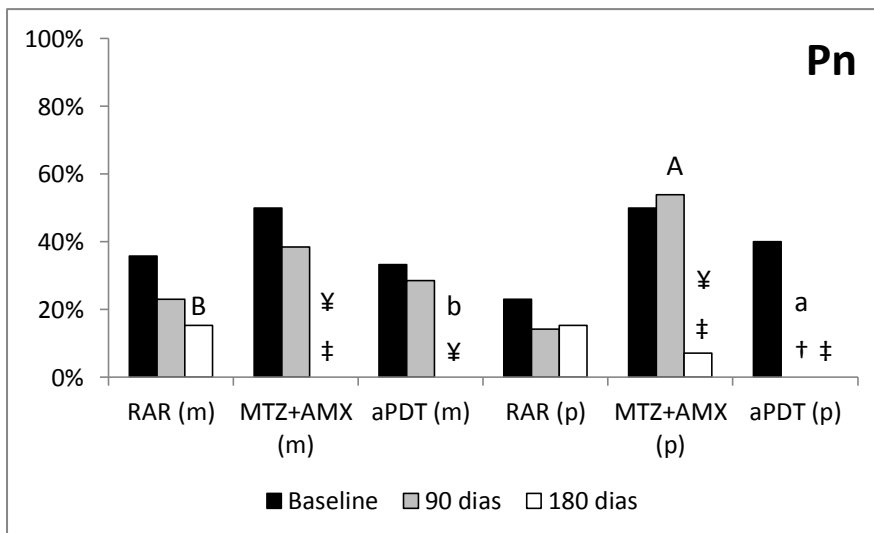
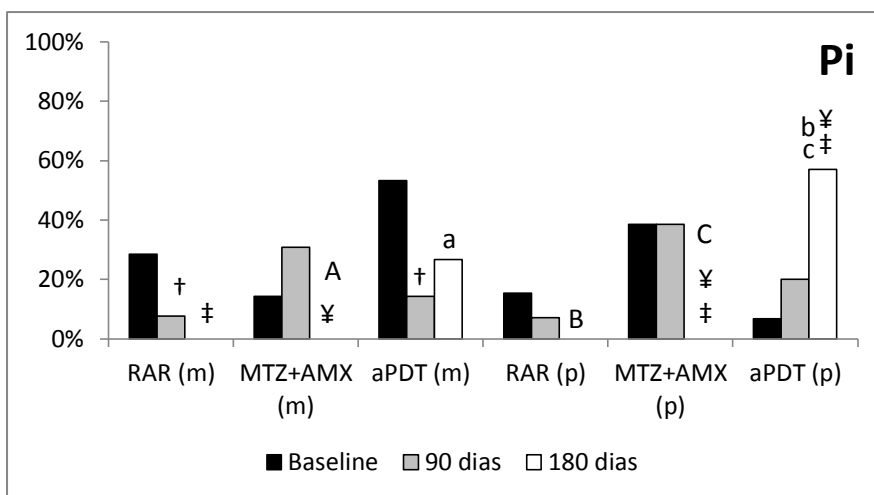
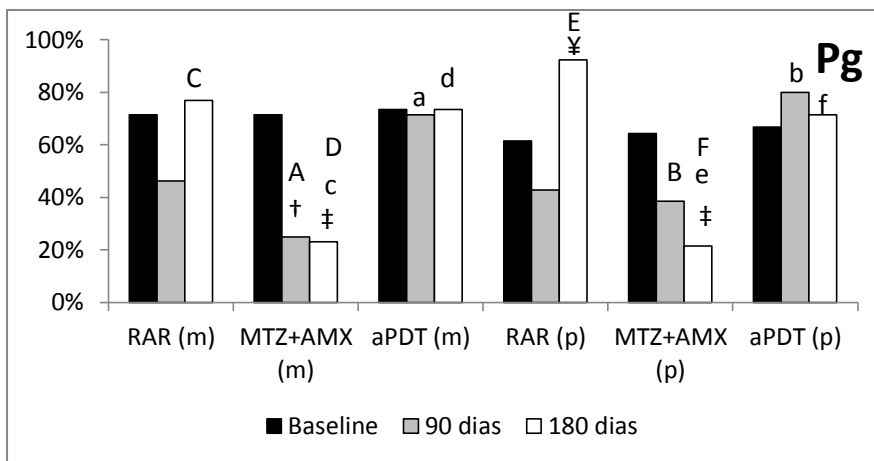


Figura 2. Redução percentual do número de bolsas residuais com sangramento ( $\geq 4$ mm).



**Figura 3.** Prevalência dos periodontopatógenos (*Pg*, *Pi* e *Pn*) em bolsas moderadas (m) e bolsas profundas (p) de pacientes submetidos aos tratamentos no *Baseline*, 90 e 180 dias. Símbolos e abreviaturas: † Diferença estatisticamente significativa quando comparado *Baseline* e 90 dias do mesmo grupo, de acordo com o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); ‡ Diferença estatisticamente significativa quando comparado *Baseline* e 180 dias do mesmo grupo, de acordo com o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); ¥ Diferença estatisticamente significativa quando comparado 90 e 180 dias do mesmo grupo, de acordo com o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ). <sup>Aa</sup> Mesma letra maiúscula e minúscula representa diferença estatística significativa quando comparada a prevalência das bactérias nos diferentes grupos, considerando o mesmo tempo, de acordo com o teste de Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

## Anexo A – Certificado da Comissão de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE  
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e do uso sistêmico de Amoxicilina/Metronidazol no tratamento de periodontite crônica: estudo clínico e microbiológico

**Pesquisador:** Leticia Helena Theodoro

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 05519412.5.0000.5420

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 173.653

**Data da Relatoria:** 05/11/2012

#### Apresentação do Projeto:

O presente projeto pretende avaliar 102 indivíduos (fumantes e não fumantes) com doença periodontal crônica que serão tratados com raspagem e alisamento radicular associados com metronidazol, amoxicilina e de multiplas aplicações da terapia fotodinâmica antimicrobiana sendo coadjuvantes ao tratamento. A análise será por meio de verificações clínicas e microbiológicas. Será analisado índice placa periodontal, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção clinica. Os riscos serão decorrentes do próprio procedimento terapêutico que será diminuído pelo tratamento realizado com as associações coadjuvantes.

#### Objetivo da Pesquisa:

indivíduos fumantes e não fumantes com doença periodontal crônica serão tratados com raspagem e alisamento radicular associados ou com terapia fotodinâmica como recurso coadjuvante ao tratamento ou com uso sistêmico de antibióticos ou com uso de placebo, num total de 6 grupos de indivíduos

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos decorrente do próprio processo de diagnóstico e tratamento da doença periodontal
- a terapêutica está fundamentada isoladamente, em várias publicações em periódicos indexados.
- Benefícios ao sujeito, tratamento da doença, orientações sobre higienização bucal
- possibilidade de inclusão de métodos terapêutico associados alternativos mais adequados.

**Endereço:** JOSE BONIFACIO 1193

**Bairro:** VILA MENDONCA

**CEP:** 16.015-050

**UF:** SP

**Município:** ARACATUBA

**Telefone:** (18)3636-3200

**Fax:** (18)3636-3332

**E-mail:** anacmsn@foa.unesp.br

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE  
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A metodologia terapêutica da pesquisa baseia-se na utilização de fármacos de uso frequente pelos profissionais da saúde sendo o diferencial a associação deste com o laser de baixa potência que também tem sua utilização frequente em tratamentos odontológicos.

Pesquisa interessante pois busca resultados mais adequados ou alternativas de tratamentos da doença periodontal.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador anexou os documentos comprobatórios de identificação e utilização do aparelho laser, a bula dos medicamentos e identificação do placebo que serão utilizados neste projeto

**Recomendações:**

n.d.n.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O presente processo está de acordo com as normas da Resolução 196, portanto, somos favoráveis a sua aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

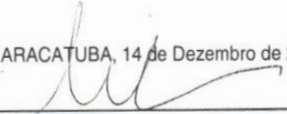
**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP recomenda a aprovação do projeto.

ARACATUBA, 14 de Dezembro de 2012

  
Assinador por:  
Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune  
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193  
Bairro: VILA MENDONCA CEP: 16.015-050  
UF: SP Município: ARACATUBA  
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

# Anexo B - Normas para Publicação segundo o Periódico – Journal of Clinical Periodontology

## Author Guidelines

**Content of Author Guidelines:** [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#)

**Relevant Document:** [Sample Manuscript](#)

**Useful Websites:** [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Clinical Periodontology](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.



### 1. GENERAL

*Journal of Clinical Periodontology* publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Clinical Periodontology*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell's Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

### 2. ETHICAL GUIDELINES

*Journal of Clinical Periodontology* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

#### 2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.



*Journal of Clinical Periodontology* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements. Please note that it is a requirement to include email addresses for all co-authors at submission. If any of the email-addresses supplied are incorrect the corresponding author will be contacted by the journal administrator.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

## 2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

## 2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

*Journal of Clinical Periodontology* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

## 2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made

available on the publication date from the authors directly.

## **2.5 Conflict of Interest and Sources of Funding**

Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Sources of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Sources of Funding](#) and [www.icmje.org/#conflicts](http://www.icmje.org/#conflicts) for generally accepted definitions.

## **2.6 Appeal of Decision**

Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at [atcpeedoffice@wiley.com](mailto:atcpeedoffice@wiley.com) with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

## **2.7 Permissions**

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

## **2.8 OnlineOpen**

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## **2.9 Copyright Assignment**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions: [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

### For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant selfarchiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

### 3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Journal Admin, Rosie Ledger, at [cpeedoffice@wiley.com](mailto:cpeedoffice@wiley.com).

#### 3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>

- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as a new user.
  - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will automatically send you your user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Corresponding Author Center'.

### 3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Corresponding Author Center', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Upload your manuscript main document complete with title page, statement concerning source(s) of funding and conflict(s) of interest, abstract, clinical relevance section, references, tables and figure legends as "main document". Upload figures as 'figures'. For clinical trials a Consort Checklist will be required, and it should be uploaded as "supplementary file for review". If any unpublished papers are referenced in the reference list, a digital version of the referenced paper should also be uploaded as "supplementary file for review".
  - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
  - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format). Notice that all documents uploaded as supplementary files for review will not be viewable in the HTML and PDF format. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### 3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

### 3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Clinical Periodontology* will be reviewed by two or more experts in the field. Papers that do not conform to the general aims and scope of the journal will, however, be returned immediately without review. *Journal of Clinical Periodontology* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

### 3.5. Suggest a Reviewer

*Journal of Clinical Periodontology* attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the name and current email address of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the editor will choose one or two reviewers as well.

### 3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

### 3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

### 3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

### 3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

### 3.10 Resubmissions

If your manuscript was given the decision of reject and resubmit, you might choose to submit an amended version of your manuscript. This should be submitted as a new submission following the guidelines above under 3.2. In addition you should upload comments to the previous review as "supplementary files for review".

## 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

*Journal of Clinical Periodontology* publishes original research articles, reviews, clinical innovation reports and case reports. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research.

**Original Research Articles** must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

**Clinical Innovation Reports** are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

**Case Reports** illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

**Reviews** are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of

state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1. Format

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. Please refer to English Language Editing Services offered by Wiley at <http://wileyeditingservices.com/en/>. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

### 5.2. Structure

All articles submitted to *Journal of Clinical Periodontology* should include Title Page, Abstract, and References. In addition, *Journal of Clinical Periodontology* requires that all articles include a section on Clinical Relevance and disclose Source of Funding and Conflict of Interests. Figures, Figure Legends and Tables should be included where appropriate. All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

**Title Page:** The title must be concise and contain no more than 100 characters including spaces. The title page should include a running title of no more than 40 characters; 5-10 key words, complete names of institutions for each author, and the name, address, telephone number, fax number and e-mail address for the corresponding author.

**Conflict of Interest and Source of Funding:** Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Source of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding](#) and [www.icmje.org/#conflicts](http://www.icmje.org/#conflicts) for generally accepted definitions.

**Abstract:** is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper. For Original Research Articles the abstract should be organized with aim, materials and methods, results and conclusions. For clinical trials, it is encouraged that

the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

**Clinical Relevance:** This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice. It should be structured with the following headings: scientific rationale for study, principal findings, and practical implications. Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

### 5.3. Original Research Articles

These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

The word limit for original research articles is 3500 words, and up to 7 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

**Main Text of Original Research Articles** should be organized with Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

**Introduction:** should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

**Material and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

**(a) Clinical trials** should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A **CONSORT checklist** should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

*Journal of Clinical Periodontology* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

**(b) Statistical Analysis:** As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

**(c) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations:** Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

**(d) Experimental Subjects:** Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

**Results:** should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

**Discussion:** may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by [Richard Horton \(2002\), The Hidden Research Paper, The Journal of the American Medical Association, 287, 2775-2778](#)). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in mind.

#### Summary of key finding

- \* Primary outcome measure(s)
- \* Secondary outcome measure(s)
- \* Results as they relate to a prior hypothesis

#### Strengths and Limitations of the Study



- \* Study Question
- \* Study Design
- \* Data Collection
- \* Analysis
- \* Interpretation
- \* Possible effects of bias on outcomes

#### Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

- \* Is there a systematic review to refer to?
- \* If not, could one be reasonably done here and now?
- \* What this study adds to the available evidence
- \* Effects on patient care and health policy
- \* Possible mechanisms

#### Controversies Raised by This Study Future Research Directions

- \* For this particular research collaboration
- \* Underlying mechanisms
- \* Clinical research

### **5.4. Clinical Innovation Reports**

These are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

The word limit for clinical innovation reports is 3000 words, and up to 12 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

The main text of Clinical Innovation Reports should be organized with Introduction, Clinical Innovation Report, Discussion and Conclusion.

### **5.5. Case Reports**

Case reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

The main text of Case Reports should be organized with Introduction, Case report, Discussion and Conclusion.

### **5.6. Reviews**

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

The word limit for reviews is 4000 words.

The main text of Reviews should be organized with Introduction, Review of Current Literature, Discussion and Conclusion.

### 5.7. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

#### Reference style (Harvard):

References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966. A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references: name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher.

c) Authors' names should be arranged thus: Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Authors' names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967).

e) The title of the paper should be included without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers.

Examples: Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* 10, 820-828. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00565.x

Lindhe, J., Lang, N.P. & Karring, K. (2003) *Periodontology and Implant Dentistry*. 4th edition, p. 1014, Oxford. Blackwell Munksgaard.

Bodansky, O. (1960) Enzymes in tumour growth with special reference to serum enzymes in cancer. In *Enzymes in Health and Disease*, eds. Greenberg, D. & Harper, H. A., pp. 269-278. Springfield: Thomas.

URL: Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Example: Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November 2003]

### 5.8. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Each copy should be marked with the figure number and the corresponding author's name. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size. Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

#### Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Detailed information on our digital illustration standards can be found

at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

**Permissions:** If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

**Figure Legends:** should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

### 5.9. Supplementary Material

Supplementary material, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition, can be uploaded as 'Supporting information for review and online publication only'. Please

see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp> for further information on the submission of Supplementary Materials.

## 6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

### 6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web

site: [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html). This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

### 6.2 Early View (Publication Prior to Print)

The Journal of Clinical Periodontology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

### 6.3 Production Tracking

Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with **Wiley-Blackwell's Author Services**.

### 6.4 Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Given that copyright licensing is a condition of publication, a completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.