

TERAPIA FOTODINÂMICA: UMA OPÇÃO NA TERAPIA PERIODONTAL

PHOTODYNAMIC THERAPY: AN OPTION IN PERIODONTAL THERAPY

Juliano Milanezi de Almeida¹
Valdir Gouveia Garcia¹
Leícia Helena Theodoro²
Álvaro Francisco Bosco¹
Maria José Hitomi Nagata¹
Valmir Campos Macarini¹

RESUMO

O principal objetivo do tratamento periodontal é o restabelecimento da saúde periodontal pela remoção dos depósitos bacterianos e calcificados presentes na superfície radicular. Seu sucesso depende da eliminação dos agentes que promovem a destruição dos tecidos periodontais. No entanto a terapia mecânica não é capaz de eliminar os patógenos periodontais devido a capacidade que alguns microrganismos apresentam de invadir o interior dos tecidos, muitas vezes inacessíveis aos instrumentos periodontais. Desta forma, a busca por métodos coadjuvantes ao tratamento periodontal tem aumentado nos últimos tempos. Frente a estes fatos, constitui propósito do presente estudo apresentar uma revisão da literatura sobre o efeito da terapia fotodinâmica nos patógenos periodontais. A análise da literatura demonstrou que a terapia fotodinâmica mostrou-se eficaz na redução bacteriana, inclusive nas bactérias periodontopatogênicas, apresentando-se como um coadjuvante promissor à terapia periodontal básica. Embora existam evidências científicas desses achados, novos estudos devem ser realizados para se determinar parâmetros específicos do laser e do agente fotossensibilizador, para tornar a terapia fotodinâmica mais efetiva e previsível.

Descritores: Doença periodontal; laser; terapia fotodinâmica, fotossensibilização.

INTRODUÇÃO

Periodontite é uma doença inflamatória induzida por bactérias do biofilme da placa bacteriana localizadas na superfície subgengival. A inflamação conduz a formação de bolsa no tecido gengival, perda de inserção, destruição óssea e ultimamente uma possível perda do dente¹. Em países industrializados, a periodontite afeta 30 a 50% dos adultos, 10% apresentam sintomas severos. A doença periodontal é uma doença multifatorial modificada por inúmeros fatores de risco. Diferentes espécies de bactérias presentes no biofilme da placa são responsáveis pela indução e manutenção da inflamação².

O sucesso do tratamento periodontal depende da eliminação dos fatores que contribuem para a destruição dos tecidos periodontais de suporte. Dentre estes fatores, temos a eliminação ou controle dos agentes etiológicos em especial o controle do biofilme dental. A redução significativa da microbiota subgengival

³ Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.
² Departamento de Periodontia - Faculdade de Odontologia de Lins, UNIMEP

patogênica pode ser obtida pelo procedimento de raspagem e alisamento^{3,4,5}. No entanto o uso isolado da terapia mecânica não é capaz de manter os baixos níveis de microrganismos por períodos mais prolongados, principalmente, no interior dos tecidos moles e duros assim como em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais como regiões de furca e depressões radiculares¹. Neste interim, estas limitações, o melhor entendimento biológico da doença periodontal juntamente com a especificidade bacteriana, tem motivado muitos pesquisadores a buscarem métodos coadjuvantes à terapia periodontal básica.

O uso de antibióticos no controle antimicrobiano como terapia antimicrobiana coadjuvante ao tratamento periodontal tem sido discutido em muitos estudos^{6,7,8,9,10}. Estes autores questionam o uso indiscriminado de antibióticos favorecendo desta forma a seleção de cepas resistentes. Recentemente, temos observado um número muito grande de pesquisas tanto *"in vitro"*^{11,12,13,14} como *"in vivo"*^{9,10,15}, que demonstram as vantagens da utilização da terapia fotodinâmica no controle antimicrobiano como terapia coadjuvante no tratamento periodontal².

Esta terapia que consiste na associação de um corante ou agente fotossensibilizador a uma fonte de luz, foi descoberta acidentalmente em 1900 por *Von Tappeiner e Raab*¹⁶, que puderam observar que culturas de células em acridina quando expostas à luz solar resultava em morte celular. Atualmente, esta técnica vem sendo mais utilizada na Oncologia, para o tratamento de tumores malignos, evidenciando resultados animadores^{17,18}.

Com o advento do Laser em 1960 por Theodoro Maiman¹⁹, esta terapia teve uma evolução significativa, pois possibilitou a utilização de uma fonte de luz intensa, coerente, colimada, monocromática, tendo ainda o efeito biomodulador sobre tecidos. O valor terapêutico do Laser é ainda controverso, variando desde o efeito placebo²⁰, a sua ação bactericida^{6,7,12,21}, a prevenção eficaz da cárie dental e à sua efetividade no processo de reparo^{9,10,22,23}. Estudos envolvendo a utilização do Laser em baixa intensidade associado a corantes tiazínicos têm demonstrado redução bacteriana em diversos modelos experimentais^{6,7,10,12,13}.

Frente a estes fatos, o propósito do presente estudo é apresentar uma revisão de literatura sobre o efeito da terapia fotodinâmica nos diferentes microrganismos, dentre eles, os patógenos periodontais.

REVISÃO DE LITERATURA

A terapia fotodinâmica fundamenta-se na possibilidade do Laser interagir com drogas fotossensibilizadoras (cromóforos), o que promoverá um maior efeito fotobiológico, podendo inclusive, promover a ação letal sobre células e microrganismos. Desta forma, a terapia fotodinâmica tem sido tema de muitos estudos. Inicialmente descrita para promover ação letal sobre células cancerígenas, tem sido utilizada nos últimos anos para outras doenças sendo inclusive procedimento aprovado pela U.S Food and Drug Administration (FDA) e por inúmeras agências de saúde ao redor de todo mundo²⁴.

O corante utilizado em função da absorção da luz, inicia uma série de reações químicas que levam a produção direta ou indireta de oxigênio "singlet" e outras espécies de oxigênio reativo capaz de promover modificações na célula²⁵.

Segundo Dougherty²⁵ a morte celular promovida pela terapia fotodinâmica é mediada pela formação de oxigênio singleto e outra espécies de oxigênio reativo, causando assim danos celulares direto, quer seja na membrana celular por alterações na sua permeabilidade ou quebra da cadeia de DNA. Relata também que a necrose e a apoptose ocorrida frente à terapia fotodinâmica depende do fotossensibilizante e da condição de tratamento.

Inúmeros agentes fotossensibilizadores têm sido utilizados, destacando-se o azul de toluidina O, cristal violeta, fitalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirinas, tionina, protoporfirina e azul de metileno. Relatos encontrados na literatura²⁶, demonstram que o azul de metileno foi utilizado com coadjuvante no tratamento de diferentes patologias, face às suas propriedades ansiolíticas e antidepressivas²⁶, inativação de vírus sobre suspensão de células vermelhas e capacidade de ativar o efeito fotobactericida sobre diferentes microrganismos^{6,7,12,13}.

Mais recentemente quando esta terapia busca um efeito antimicrobiano, alguns autores a denominam de quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT)^{6,27}, e, esta técnica mostra-se efetiva, "in vitro", contra bactérias, incluindo cepas resistentes a antibióticos⁶.

Em 1994, WILSON²¹, em uma revisão de literatura, ressaltou que a terapia fotodinâmica pode ser influenciada pelo pH, conteúdo de água, presença de matéria orgânica, densidade da população celular e intensidade do fluido

sulcular. O autor também relata que muitas bactérias da cavidade oral não apresentam cromóforos externos para absorver a luz laser no espectro vermelho ou infravermelho, exceção feita às espécies pigmentadas de preto como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* que apresentam protohematoporfirina e protoporfirina, respectivamente, como cromóforos naturais. O autor ressalta ainda que esta forma terapêutica possa ser utilizada na terapia de manutenção para prevenir a recolonização na região sub-gengival por bactérias periodontopatogênicas.

Com o objetivo de avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina O na fotossensibilização letal de microorganismos patogênicos, Usacheva et al.⁷ utilizaram o azul de metileno e o azul de toluidina O em diversas concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200 µM sobre diferentes bactérias, como *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pneumoniae*; *Enterococcus faecalis*; *Hemophilus influenzae*; *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores utilizaram o Laser de Argônio com comprimento de onda de 630 nm e o Laser diodo de comprimento de onda de 664 nm com fluência variando de 10 e 60 J/cm², variando a intensidade de potência de 50 a 100 mW/cm². Os resultados obtidos pelos autores indicaram que todos os microorganismos foram eliminados em diferentes porcentagens quando expostos ao laser na presença dos corantes. No entanto, a fotossensibilização dependeu do corante utilizado, da sua concentração, fluência e intensidade de potência do laser, bem como da espécie bacteriana envolvida estando a efetividade do corante relacionado com o tempo de contato e sua concentração.

Teichert et al.²⁸ utilizaram cepas de *Cândida albicans* resistentes ao tratamento convencional da candidíase as quais foram coletadas de pacientes HIV - positivo. Estas cepas foram inoculadas na cavidade oral de ratos que posteriormente foram submetidos à aplicação tópica de 1 mL do azul de metileno nas concentrações de 250, 275, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/mL. Após 10 minutos da aplicação do corante os autores aplicaram o Laser de diodo com comprimento de onda de 664 nm com potência de 400 mW, por 687,5 segundos, resultando em uma densidade energética de 275 J/cm². Após aplicação única realizaram exame de cultura microbiana das amostras e os animais foram sacrificados para análise histológica da língua. Os resultados obtidos mostraram uma completa eliminação dos microorganismos quando utilizaram as concentrações de

450 e 500 µg/mL do corante. Na análise histológica os ratos tratados com terapia fotodinâmica não apresentaram candidíase e mínima resposta inflamatória. As línguas dos ratos do grupo controle apresentaram-se com elevada taxa de candidíase, restrita as camadas de queratina. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica é uma alternativa em potencial para o tratamento da candidíase, e apontaram como vantagens da técnica o fato de ser uma terapia realizada topicamente, de simples execução e inespecífica, ou seja, que atinge um grande número de microorganismos. Além disso, esta terapia pode ser repetida sem o risco da seleção de cepas resistentes.

Diante dos trabalhos que documentam "*in vitro*" o efeito da terapia fotodinâmica sobre bactérias periodontopatogênicas, Yilmaz et al.¹² realizaram estudo em humanos, para avaliarem o efeito desta terapia no tratamento da doença periodontal. O grupo de estudo foi composto por 10 pacientes os quais não haviam recebido tratamento periodontal anterior, nem feito uso de antibióticos 6 meses antes do estudo. Os autores utilizaram 4 dentes unirradiculares, sendo 1 por quadrante, apresentando perda de inserção de 4 mm na superfície mesial. Os pacientes foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo: G1: raspagem e alisamento radicular associado ao Laser de Arseneto de Gálio (685 nm de comprimento de onda, frequência de 5 Hz, potência de 30 mW, densidade de energia de 1,6 J/cm²) e azul de metileno 0,05%; G2, apenas a aplicação do Laser; G3, apenas raspagem e alisamento radicular e G4 somente técnicas de higiene oral. Quando os autores levaram em consideração todos os índices considerados no exame clínico e microbiológico periodontal, somente o debridamento subgengival associado ou não ao Laser foi mais efetivo quando comparado com o grupo que recebeu apenas a aplicação do Laser. Os autores concluíram o estudo relatando a necessidade de avaliar o efeito da associação de corantes com o Laser como coadjuvantes a terapia periodontal convencional e sugeriram que esta nova opção terapêutica possa ser vantajosa no tratamento da doença periodontal inflamatória.

Frente a observação de alguns autores que chamam a atenção dos fatores que influenciam na terapêutica periodontal local, tais como a presença do fluido gengival, sangue, saliva dentre outros, Matevski et al.¹⁴ realizaram um estudo para avaliar se alguns destes fatores externos podem influenciar a terapia fotodinâmica. A fotossensibilização letal foi analisada "*in vitro*" em culturas de bactérias periodontopatogênicas como a *P. gingivalis*,

Bacteroides forsythus, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associadas ao sangue ou ao soro fisiológico simulando o fluido gengival. Como fonte de luz os autores utilizaram o Laser de He-Ne 635 nm e lâmpada de xenônio com filtro vermelho. A droga fotossensibilizadora utilizada foi o azul de toluidina O, nas concentrações de 12,5 µmg/mL e 50 µmg/mL. Os autores concluíram relatando que a terapia fotodinâmica tem seu efeito afetado negativamente pela presença de sangue e fluido gengival, pois estes podem refletir ou absorver a luz, atuando desta forma como uma barreira protetora às bactérias interferindo na ação tanto do Laser como do corante.

Shibli et al.¹⁵ realizaram um estudo piloto, utilizando cultura microbiana, para avaliarem a efetividade da fotossensibilização sobre os microrganismos envolvidos na periimplantite em cães. Após dois meses de indução da periimplantite em cães as ligaduras foram removidas e controle de placa com clorexidina a 0,12%, foi adotado por 12 meses. Decorrido este período retalho mucoperiosteó foi elevado e amostras foram coletadas com cones de papel antes e após tratamento da superfície do implante com 100 µg/mL de azul de toluidina-O e subsequente aplicação do Laser de diodo semiconductor de Arseneto de Gálio e Alumínio com comprimento de onda de 685 nm por 80 segundos. Os autores obtiveram redução e eliminação, em algumas amostras, de patógenos da periimplantite em cães, principalmente nas espécies *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium* sp e *Streptococcus* beta hemolíticos. Relatam também que esta abordagem adotada para promover a fotossensibilização letal a patógenos periodontais apresenta vantagens como a de não desenvolver a seleção de microrganismos resistentes, utilizados em baixas concentrações e de fácil aplicação.

Kömerik et al.⁹ realizaram um estudo para avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica na viabilidade de microrganismos. Os autores utilizaram *P. gingivalis* da linhagem W50, as quais foram inoculadas no interior da cavidade oral de ratos. Imediatamente a inoculação de 25 µl de *P. gingivalis*, na região dos molares superiores foi administrado topicamente azul de toluidina nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/ml. Como fonte de luz os autores utilizaram o Laser diodo de 630 nm depositando na área doses de 6, 12, 24 e 48 Joules correspondendo aos tempos de 1, 2, 4 e 8 minutos. Na análise histológica dos resultados os autores não observaram nenhuma alteração nas estruturas do periodonto como, ulcerações e inflamação no tecido conjuntivo, mesmo nas concentrações mais altas tanto do corante quanto do Laser

utilizado. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica tendo como corante o azul de toluidina, promoveu a redução de importante periodontopatógeno, sem causar danos aos tecidos adjacentes. A perda óssea alveolar foi significativamente menor nos ratos tratados com a terapia fotodinâmica, sendo uma terapia antimicrobiana alternativa para o tratamento da doença periodontal.

Chan e Lai¹³ avaliaram a influência da dose de energia do laser e qual droga fotossensível a ser utilizada na eliminação de bactérias periodontopatogênicas. Os autores utilizaram o Laser de He-Ne, com potência de 30 mW e comprimento de onda de 632,8 nm e o Laser diodo de AsGaAl, com potência de 100 mW e comprimentos de onda de 665 nm e 830 nm. Utilizaram o azul de metileno na concentração de 0,01% peso/volume, como droga fotossensível. As bactérias utilizadas pelos autores foram *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycescomitans* e *Streptococcus sanguis*, as quais foram mantidas em meio de cultura anaeróbio com posterior quantificação. O Laser de He-Ne foi utilizado por 30 e 60 segundos, e proporcionou nos microorganismos uma densidade de energia de 3,2 J/cm² e 6,4 J/cm². Já o Laser de diodo promoveu uma densidade de energia de 10,6 J/cm² e 21,2 J/cm². Os resultados mostraram que a terapia foi tempo-dependente para ambos os sistemas de Laser. Porém, o Laser diodo de 830 nm foi o mais efetivo e a exposição por 60 segundos com densidade de energia de 21,2 J/cm², promoveu a morte de 99-100% das bactérias pigmentadas (*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*) e *S. sanguis*. Já para as espécies de *Actinobacillus actinomycescomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, este tipo de tratamento promoveu a redução microbiana de 95 e 96%, respectivamente. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica apresenta a vantagem de ser uma terapia aplicada topicamente no interior da bolsa, sem o perigo dos efeitos indesejáveis de uma droga administrada sistemicamente, e que a morte de microorganismos pode ocorrer quando são utilizados parâmetros adequados.

Gad et al.¹⁰ relataram em seus estudos que a emergente resistência antimicrobiana entre bactérias patogênicas tem levado muitos pesquisadores a buscarem alternativas para a substituição das terapias antimicrobianas por terapias capazes de promoverem a morte bacteriana sem causar a seleção de bactérias resistentes. Os autores consideram que uma alternativa pode ser a terapia fotodinâmica, pois muitas infecções locais em animais apresentam resultados satisfatórios, no entanto, os fatores que influenciam a morte bacteriana

ainda não estão elucidados, pois os resultados da terapia fotodinâmica podem sofrer influência negativa das exotoxinas bacterianas. Quando analisaram o efeito de corantes catiônicos (azul de metileno) ativados pelo Laser com 665 nm de comprimento de onda e 40 J/cm² de densidade de energia depositada em colônias de *Staphylococcus epidermoides* e *S. aureus* com alterações na cápsula e na produção de exotoxinas, os autores relataram que os resultados obtidos indicaram alterações na morte celular em virtude da produção de exotoxinas, que pode ser um obstáculo para a terapia fotodinâmica e que corantes catiônicos podem superar o efeito negativo da presença de exotoxinas quando associados ao Laser.

DISCUSSÃO

Comprovada pelos diversos estudos na literatura a terapia periodontal através da raspagem e alisamento radicular é de extrema importância, pois remove depósitos bacterianos, cálculos e camadas superficiais das raízes, como cimento e dentina. Este cimento e/ou dentina remanescente após raspagem e alisamento radicular podem ainda estar contaminados tanto pela presença de microrganismos nas suas superfícies bem como na camada de *smear layer* formada durante o procedimento de raspagem e alisamento radicular^{1,3}, podendo interferir assim no processo de reparo periodontal.

É notório na literatura a preocupação dos autores com o tratamento químico como agente coadjuvante aos procedimentos mecânicos na remoção do biofilme dental sobre a superfície radicular^{29,30,31}. Recentemente a terapia envolvendo o uso do Laser de baixa intensidade tem despertado atenção de muitos pesquisadores principalmente o seu uso na terapia fotodinâmica. Esta, definida como a irradiação de células/bactérias marcadas por uma espécie de oxigênio reativo produzido por meio de uma droga fotossensibilizadora e luz com comprimento de onda apropriado²⁵, tem, apresentado resultados animadores com resultados efetivos em promover a morte bacteriana^{6,7,9,13,21}.

A utilização da terapia fotodinâmica no controle antimicrobiano apresenta como vantagens ser uma terapia de fácil execução que utiliza corantes com baixas concentrações e de custo reduzido. Por ser uma terapia tópica, possibilita a absorção pela microbiota local sem os efeitos indesejáveis de um agente administrado sistemicamente, que solicitaria altas concentrações, necessidade de metabolização, atingindo a área

interessada de forma inespecífica através da corrente sanguínea, o que não ocorre com a terapia fotodinâmica a qual apresenta efeito local e específico. Outra vantagem desta terapia é a não seleção de cepas resistentes além de ter o efeito biomodulador do Laser em baixa intensidade associado favorecendo desta forma a reparação tecidual⁶, pois o Laser favorece a neoangiogênese²³, a migração e proliferação celular e maturação do colágeno mais diferenciada²².

A ação bactericida desta nova opção terapêutica tem sido evidenciada em diferentes microrganismos como as *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Cândida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium nucleatum* e *S. sanguis*^{7,9,11,12,13,14,28} apresentando resultados superiores nas bactérias pigmentadas de preto, pois apresentam cromóforos naturais²¹.

Esta terapia pode sofrer influências de alguns fatores como, a concentração da droga, tempo de permanência da droga no interior do tecido, pH do meio, presença de exsudato, matéria orgânica, sangue, fluxo do fluido gengival, modo de aplicação da droga, comprimento de onda do Laser, energia utilizada e tempo de exposição da droga ao Laser²¹. Esta pode também sofrer influência de exotoxinas produzidas por bactérias gram negativas envolvidas com a destruição periodontal, sendo que a utilização de corantes catiônicos (p.ex azul de metileno e azul de toluidina O) associado ao Laser, os efeitos negativos das exotoxinas sobre a terapia fotodinâmica tornam-se nulos¹⁰.

Devido aos inúmeros questionamentos na literatura em relação ao tratamento da doença periodontal, há evidências excitantes na realização de estudos controlados para comprovar os efeitos benéficos da utilização da terapia fotodinâmica como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal convencional. Esta terapia pode ser benéfica nos locais de difícil acesso como áreas de furca, depressões, invaginações e concavidades. Desta forma, reduz a necessidade de retalhos e o tempo de tratamento, aumentando assim o conforto ao paciente, diminui o risco de bacteremia a qual ocorre rotineiramente após tratamento periodontal e ser uma possível alternativa para o uso indiscriminado de antibióticos. A terapia fotodinâmica pode ser também promissora durante o período de manutenção agindo sobre o biofilme não

havendo a necessidade da remoção de dentina radicular. Assim, o paciente pode passar por menores períodos de hipersensibilidade dentinária.

CONCLUSÃO

Diante desta revisão de literatura observamos que o uso da terapia fotodinâmica em promover ação letal sobre microorganismos envolvidos na destruição periodontal, nos levam a concluir que:

1. A terapia fotodinâmica mostrou-se eficaz na redução bacteriana, principalmente as periodontopatogênicas;
2. A terapia fotodinâmica apresenta um futuro promissor como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico;
3. Novos estudos são necessários para se determinar parâmetros específicos do laser e da droga, para tornar a terapia fotodinâmica mais efetiva.

ABSTRACT

The main goal of the periodontal treatment is the re-establishment of the periodontal health. The success of periodontal therapy depends on the adequate elimination of the etiological factors, such as dental plaque and calculus deposited on the root surface. However, mechanical therapy may not be sufficient for the total elimination of bacterial plaque. Some areas such as furcations and root depressions are inaccessible to adequate periodontal instrumentation. Thus, some periodontal pathogenic bacteria can invade the soft tissues and dentin. Therefore, there is a continuous search for adjunctive methods to improve the results obtained by mechanical therapy. The purpose of this paper is to present a review of the literature focusing on studies that have evaluated the effect of photodynamic therapy (PDT) on periodontal pathogens. The studies have demonstrated that PDT is effective in reducing the amount of bacteria, including periodontal pathogens; and, thus, proves to be an adjunctive method for non-surgical periodontal treatment. New studies should be conducted in order to determine the specific parameters of the lasers and drugs to make the PDT more effective and predictable.

Key words: Periodontal disease; laser; photodynamic therapy.

REFERÊNCIAS

1. Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. J Periodontol. 1988; 59:493-503.
2. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. J Photochem Photobiol B 2005; 13:159-170.

3. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol.* 1984; 55:443-446.
4. Reichwage DP, Strickler CM, Castle KM, Marr DL, Jaress AM. The effectiveness of conservative, contemporary, nonsurgical periodontal treatment. *Dent Today.* 2006; 25: 48-49.
5. Zee KY, Lee DH, Corbet EF. Repeated oral hygiene instructions alone, or in combination with metronidazole dental gel with or without subgingival scaling in adult periodontitis patients: a one-year clinical study. *J Int Acad Periodontol.* 2006; 8:125-135.
6. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42:13-28.
7. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:165-173.
8. Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1999; 26:347-351.
9. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:932-940.
10. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2173-2178.
11. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20:325-333.
12. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med.* 2002; 30:60-66.
13. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003;18:51-55.
14. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003; 38:428-435.
15. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci.* 2003; 45:17-23.
16. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 1989; 56: 691-704.
17. Tomaselli F, Maier A, Sankin O, Anegg U, Stranzl U, Pinter H. Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer—a clinical pilot study. *Lasers Surg Med.* 2001; 28:399-403.
18. Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S. Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem Photobiol Sci.* 2006;5:31-38.
19. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature.* 1960; 187:493-494.
20. Ryden H, Persson L, Preber H, Bergstrom J. Effect of low level energy laser irradiation on gingival inflammation. *Swed Dent J.* 1994; 18:35-41.
21. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J.* 1994;44:181-189.
22. Mester E. The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. *Laser Rev.* 1968; 1: 3.
23. Garcia, VG. Comportamento de feridas cutâneas submetidas à ação do raio laser: estudo clínico, biométrico e histológico em ratos. (livre-Docência) Araçatuba, São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista. 1992. 170 p.
24. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology* 2000; 2004; 36: 59-97.
25. Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20:3-7.
26. Oliveira, R. W., Guimarães, F.S. Anxiolytic effect of methylene blue

- microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999; 32:1529-1532.
27. Ribeiro, M. S.; Zezell, D. M. Laser de baixa intensidade. In: Gutknecht, N.; EDUARDO, C. P. A *Odontologia e o Laser*. 1ª ed. São Paulo: Quintessence ed., 2004, cap. 5, p. 217-240.
 28. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93:155-160.
 29. Trombelli L, Scabbia A, Carotta V, Scapoli C, Calura G. Clinical effect of subgingival tetracycline irrigation and tetracycline-loaded fiber application in the treatment of adult periodontitis. *Quintessence Int.* 1996; 27:19-25.
 30. Greenstein G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review. *J Am Dent Assoc.* 2000; 131:1580-1592.
 31. Pavia M, Bianco A, Pileggi C, Angelillo IF. Meta-analysis of residential exposure to radon gas and lung cancer. *Bull World Health Organ.* 2003; 81:732-738.