



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

REGINA TERESA FRUET ARRUDA

**AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA LUZ LASER VERMELHA NO TECIDO
GENGIVAL EM PACIENTES COM PIGMENTAÇÃO MELÂNICA E DOENÇA
PERIODONTAL – ESTUDO CLÍNICO**

São Paulo, SP

2019

REGINA TERESA FRUET

**AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA LUZ LASER VERMELHA NO TECIDO
GENGIVAL EM PACIENTES COM PIGMENTAÇÃO MELÂNICA E DOENÇA
PERIODONTAL – ESTUDO CLÍNICO**

Trabalho apresentado para Defesa de Tese
para obtenção do título de Mestre em
Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde
Orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates

São Paulo, SP

2019

Arruda, Regina Teresa Fruet.

Avaliação da atenuação da luz vermelha no tecido gengival em pacientes com pigmentação melânica e doença periodontal- estudo clinico. / Regina Teresa Fruet Arruda. 2019.

29 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato Araujo Prates.

1. Antimicrobianos. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Tratamento periodontal. 5. Pigmentos melânicos.

I. Prates, Renato Araujo. II. Titulo

CDU 615.831

São Paulo, 07 de fevereiro de 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Regina Teresa Fruet Arruda

Título da Dissertação: "Avaliação da atenuação da luz laser vermelha no tecido gengival em pacientes com pigmentação melânica e doença periodontal – Estudo clínico"

Presidente: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF^a. DR^a SILVIA CRISTINA NUNEZ



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Anthenor Fruet e Isabel Simão Fruet,
ao meu esposo Carlos do Canto Arruda e a minha filha Luisa Fruet Arruda

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre estar presente no meu caminho

Aos meus pais, Anthenor e Isabel, por sempre me estimularem a crescer tanto profissionalmente quanto como ser humano e por me ensinarem que a educação é nosso melhor investimento.

Ao meu esposo Carlos, por confiar e sempre acreditar em mim. Seu apoio em todos os momentos foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Obrigada por me ensinar a ter fé, coragem e não desistir nunca dos meus sonhos.

A minha filha Luisa, agradeço por entender minha ausência em momentos tão preciosos e me trazer paz em meio às dificuldades.

Meu agradecimento especial ao meu orientador, Dr. Renato Araujo Prates. Obrigada por me incentivar e acreditar em minha capacidade, pela paciência e amizade e por todo o seu estímulo e incentivo por nunca deixar desistir

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica da Uninove, em especial a Dra. Kristiane Porta, Dra Sandra Kalil, Dra. Daniela Teixeira da Silva, Dra. Christiane Pavani, Dr Alessandro Deana, pela colaboração e ensinamentos.

Aos alunos de Iniciação Científica, Ana Carolina Gomes, Bianca Godoy e Ana Carolina Tortamano. Obrigada pela dedicação e esforço essenciais para que tudo desse certo.

Aos meus colegas de Pós-Graduação da Uninove, especialmente às amigas Maria Beatriz Biffi, Carol Brandt Alves, Simone Klein Martins, Paulo Henrique Boulitreau e Alexandre Bérigamo, companheiros de jornada. Obrigada por tornarem esse caminho mais suave.

Aos colegas e amigos professores da Uninove, principalmente aos meus amigos Pedro Henrique Cabral de Oliveira e Guiliana Anselmo Giovinazzo pelo apoio e por terem me incentivado a continuar essa jornada.

A Universidade Nove de Julho pelo suporte e incentivo à pesquisa.

A todos pacientes que tanto colaboraram com a pesquisa, agradeço a confiança.

Aos meus irmãos Mário Antônio, Luiz Fernando e a todos familiares e amigos que torceram por mais essa conquista.

RESUMO

A quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) é utilizada como tratamento coadjuvante ao tratamento periodontal e a presença exacerbada de pigmentação melanica pode interferir na absorção e espalhamento da dose de luz terapeutica. O objetivo deste estudo clinico foi mensurar a atenuação da luz vermelha $\lambda=660$ nm em tecido gengival naturalmente pigmentado com melanina. Foi utilizado um laser com potência de 100 mW (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil). As imagens foram coletadas com câmera T2i (Canon, Japão) com lente macro de 100 mm, distância focal de 35 mm comprimento, f 22 de abertura, 1/100 de velocidade do obturador e ISO 200. Os pacientes foram fotografados na região frontal e incisal. Este ensaio clínico incluiu 10 pacientes com pigmentação melanica no tecido gengival e estavam em tratamento periodontal na clínica de odontologia da UNINOVE. Seis sítios de cada paciente foram selecionados para as avaliações e foi eleito aleatoriamente um sítio frontal e um incisal de cada paciente. As imagens foram avaliadas no software IMAGEJ (NIH, Wayne Rasband, USA) e a intensidade em pixels foi quantificada em relação a distância do ponto de incidência da luz. Os dados foram normalizados e os resultados foram apresentados como intensidade luminosa relativa em função da distância. Os resultados demonstraram que a luz laser vermelha é exponencialmente atenuada em função da distância lateral e perde aproximadamente 50% de sua intensidade em 2,23 mm. Por outro lado, a luz percorre 3 mm em profundidade para decair 50%. Em conclusão, nossos dados sugerem que os protocolos de irradiação para terapia fotodinâmica antimicrobiana em tecido gengival devem levar em conta a atenuação da luz e a profundidade das bolsas tratadas para que aconteça uma iluminação eficiente do tecido alvo.

Palavras chaves: Antimicrobianos, Resistência antimicrobiana, Terapia fotodinâmica, tratamento periodontal, pigmentos melânicos,

ABSTRACT

Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) is used as adjunctive treatment for periodontitis and the presence of melanic pigmentation may interfere with absorption and scattering of the therapeutic dose light. The objective of this clinical study was to measure the red light attenuation $\lambda = 660$ nm in gingival tissue naturally pigmented with melanin. A laser with output power of 100 mW (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brazil) was used. Images were collected with T2i camera (Canon, Japan) with 100 mm macro lens, 35 mm focal focal length, aperture f22, 1/100 shutter speed and ISO 200. The patients were photographed in frontal and incisal regions. This clinical trial included 10 patients with melanin pigmentation in the gingival tissue and were under periodontal treatment at the UNINOVE dentistry clinic. Three sites of each patient were selected for evaluations and a frontal and an incisal site of each patient was randomly selected. The images were evaluated in the IMAGEJ software (NIH, Wayne Rasband, USA) and the intensity in pixels was quantified in relation to the distance from the light incident point. The data were normalized and the results were presented as relative light intensity as a function of distance. The results demonstrated that red laser light is exponentially attenuated as a function of lateral distance and loses approximately 50% of its intensity by 2.23 mm. On the other hand, the light travels 3 mm in depth to decay 50%. In conclusion, our data suggest that irradiation protocols for antimicrobial photodynamic therapy in gingival tissue should take into account the light attenuation and depth of the treated pockets so that efficient illumination of the target tissue occurs.

Keywords: Antimicrobial, Microbial resistance, Photodynamic therapy, Periodontal treatment, Melanin pigments.

SUMÁRIO

1. Contextualização	9
2. Objetivos:.....	14
2.1. Objetivos gerais	14
2.2. Objetivos específicos:.....	14
3. Materiais e métodos	15
3.1. Critérios de inclusão	15
3.2. Critérios de exclusão	16
3.3. Grupos experimentais e delineamento do estudo.....	16
3.4. Fotografias.....	16
3.5. Avaliação do espalhamento da luz no tecido gengival.....	17
4. Resultados.....	19
Discussão.....	20
Conclusão	24
Referências Bibliográficas	25
Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	27
Anexo II – Termo de consentimento Livre e esclarecido TCLE.....	28

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA - 1 FIGURA ILUSTRATIVA DO PADRÃO DE MELANINA TÍPICO DOS PACIENTES ALOCADOS E IMAGEM DA IRRADIAÇÃO EMPREGADA NO EXPERIMENTO. VISTA INCISAL DA IRRADIAÇÃO NA REGIÃO VESTIBULAR DA PACIENTE17
- FIGURA - 2 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA LUZ NO PROGRAMA IMAGEJ 18
- FIGURA - 3 A FIGURA REPRESENTA A ATENUAÇÃO DA LUZ NA GENGIVA DE PACIENTES PORTADORES DE MELANINA. NO EIXO Y TEMOS O INTENSIDADE LUMINOSA NORMALIZADA PARA 1 SENDO SEU MÁXIMO. O EIXO X REPRESENTA A DISTÂNCIA EM MILÍMETROS PERCORRIDA PELA LUZ LATERALMENTE AO PONTO DE INCIDÊNCIA DO FEIXE. OS DADOS SÃO O FIT POLINOMIAL EM SEGUNDO GRAU CALCULADOS A PARTIR DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE 10 TOMADAS FOTOGRÁFICAS.....20

1. Contextualização

A doença periodontal é uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes induzida por micro-organismos e influenciada pela resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, podendo ainda ser acelerada por fatores de risco (1, 2). Ela é iniciada por biofilme e caracterizada por destruição inflamatória induzida por bactérias de estruturas de suporte dentário e osso alveolar. Tem como um resultado de um desafio bacteriano constante, os tecidos periodontais, isto é, gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar de suporte são expostos continuamente à bactérias específicas, que são componentes que têm a capacidade de alterar muitas funções locais (1, 2).

A causa principal da doença periodontal, é o acúmulo desse biofilme dental nas superfícies dos dentes, capaz de produzir uma reação inflamatória nos tecidos periodontais (3-5).

O tratamento padrão para periodontite consiste em instruções de higiene oral (IHO) e debridamento mecânico das superfícies radiculares, raspagem e alisamento radicular (RAR), visando a remoção de cálculo e biofilme. Embora esta seja uma abordagem muito eficaz, (6) em muitos casos tem limitações inerentes, especialmente em pacientes com doença avançada. Como resultado, a RAR pode não ser suficiente para alterar o perfil bacteriano associado à periodontite a um perfil compatível com a saúde periodontal (7). Por esse motivo, outros tratamentos, como adjuvantes antibióticos sistêmicos, têm sido defendidos. Há fortes evidências para apoiar o uso sistêmico de antibióticos como adjuvantes da RAR no tratamento de periodontite (1, 7, 8).

Em alguns casos a infecção periodontal não é resolvida apenas com a instrumentação das superfícies dentais, devido a presença de alguns micro-organismos patógenos periodontais, como *Aggregatibacter actinomyceetemocomitans* e *Porphyromonas gingivallis*, os quais possuem estas possuem a capacidade de invasão tecidual, podendo penetrar em tecidos moles. Além disso, outros micro-organismos podem colonizar tecidos duros, sítios não periodontais e locais de difícil acesso para a instrumentação. A persistência dessas espécies bacterianas na superfície radicular pode facilitar a

recolonização de sítios já tratados e acarretar posteriormente a recidiva dessa doença (1, 5).

A bolsa residual apresenta sítio com profundidade clínica de sondagem (PCS) maior ou igual a 5 mm após o tratamento inicial, fornecendo um ambiente propício à recolonização por periodontopatógenos e apresenta maior risco de perda de inserção e perda do respectivo dente, precisando ser realizadas cirurgias para esse acesso (9). Entretanto, em casos específicos, pode ser necessário o emprego de antibióticos em infecções mais graves. Ao longo das últimas décadas, uma gama diversificada de antimicrobianos tem sido usada como co-adjuvantes ao tratamento periodontal não cirúrgico. Entre estes, a associação de metronidazol e amoxicilina demonstrou ser eficaz no tratamento de periodontite grave em adultos (8, 10, 11). No entanto, apesar das evidências que apóiam a eficácia dos antimicrobianos sistêmicos co-adjuvantes, há uma falta de evidências para apoiar protocolos clínicos bem definidos (8) e algumas questões permanecem sem resposta.

Contudo, o uso não específico destes antibióticos podem provocar efeitos adversos e levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Desta forma, há grande interesse no desenvolvimento de outras formas de tratamento. A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) surge como alternativa ao emprego de antimicrobianos, trata-se de uma modalidade não invasiva de tratamento, e pode ser utilizada como adjuvante ao tratamento convencional das periodontites (12). Esta fototerapia, definida como quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT), se baseia no uso de substâncias fotoativas, conhecidas como fotossensibilizadores (FS), que se ligam à célula alvo, e ao serem ativadas pela luz com comprimento de onda adequado promoverão a morte de micro-organismos pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (12-14). Não foi relatado o desenvolvimento de resistência bacteriana à PACT, diferentemente do tratamento com antimicrobianos. Para utilização no tratamento periodontal, o fotossensibilizador deve ser inserido na bolsa periodontal e penetrar no biofilme ligando-se às bactérias (12).

A PACT apresenta baixa toxicidade em células de mamíferos, diferentemente do tratamento com antibióticos ou bochechos a base de

clorexidina, e não há relatos de resistência bacteriana. Porém, nota-se que ainda existe dificuldade em ajustar todos os parâmetros necessários para a realização da PACT, que suporte a sua eficácia a médio e a longo prazo (15, 16). Para que ocorra a morte microbiana, o FS deve ser capaz de absorver a radiação no comprimento de onda selecionado (13, 17, 18). O comprimento de onda e irradiância da luz, o tempo de exposição e o rendimento quântico do estado tripleto do FS determinam os resultados.

A PACT utiliza um FS associado à luz de baixa potência para alcançar o efeito antimicrobiano desejado (19). Portanto, a eficácia do tratamento depende da otimização de grande número de parâmetros (13, 18) e os estudos realizados com PACT em periodontia mostram que existem diversas discrepâncias entre os parâmetros empregados (15, 16). A falta de evidência clínica não permite ainda que a eficácia da PACT seja mensurada. As pesquisas realizadas empregam condições de tratamento diferentes, dificultando a comparação dos resultados (20). Outro fator importante para a efetividade da irradiação é analisar o espalhamento da luz nos tecidos ao redor da ponteira laser, pois, clinicamente, observa-se que a irradiação do tecido iluminado produz um espalhamento lateral com área maior do que a da ponteira do equipamento. No entanto, é necessário mapear a densidade de potência em toda a área iluminada para determinar se uma mesma bolsa periodontal deverá receber mais de um ponto de irradiação. Clinicamente, pode-se observar que as regiões adjacentes à ponteira laser recebem mais luz, enquanto as zonas mais afastadas da ponteira recebem menor quantidade de irradiação, o que pode diminuir os efeitos da PACT (21).

Sendo assim, os parâmetros dosimétricos para utilização clínica da PACT devem ser melhor investigados. Este é um passo importante no entendimento dos fenômenos de inativação microbiana que deverão ocorrer nos sítios infectados do periodonto dos pacientes.

Vários estudos estão sendo realizados para avaliar os efeitos da PACT na doença periodontal. Uma classe de fotossensibilizadores frequentemente utilizada é a dos corantes azuis da família das fenotiazinas, dentre eles o azul de toluidina e azul de metileno. As fenotiazinas são moléculas tricíclicas planas que possuem um átomo de nitrogênio quaternário e tem eficiente fototoxicidade

contra diversos micro-organismos. Em estudo *in vitro* realizado por Alvarenga e colaboradores (2015) (17), foi realizada terapia fotodinâmica com FS azul de metileno a 100 μ M e irradiação laser emitindo 660 nm com 100 mW de potência em biofilme de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, patógeno fortemente associado à doença periodontal. Foram testados 3 tempos de irradiação, de 1, 3 e 5 min. Os resultados do estudo indicam que o tempo de irradiação exerce influência na morte celular, e o melhor resultado foi encontrado no grupo testado com 5 minutos de irradiação, no qual foi alcançada redução bacteriana de 99,85% (17).

A associação da PACT ao tratamento convencional de bolsas periodontais vem sendo investigada. Em meta-análise realizada em 2013 por Sgolastra e colaboradores, concluiu-se que o uso da PACT como coadjuvante ao tratamento mecânico de RAR promoveu melhoras adicionais nos parâmetros pesquisados a curto prazo. Porém, foi observado que não existem evidências que suportem sua eficácia a médio e longo prazo (15, 16). Porém, outras pesquisas obtiveram resultados bem menos expressivos com o uso adjuvante da PACT (12, 22). Entretanto, dentre os parâmetros usados para realização da PACT nesses estudos foi empregado o FS do sistema HELBO® Blue, que possui alta concentração de azul de metileno (10,0 mg/mL, equivalente a 1,0% p/v), o que pode provocar um efeito de sombreamento em áreas importantes, mantendo os micro-organismos viáveis na bolsa periodontal. No caso das fenotiazinas, também pode haver uma diminuição dos efeitos fotoquímicos atribuída à dimerização do FS disposto em altas concentrações.

É importante ressaltar que a toxicidade celular somente ocorre quando o espectro de absorção do FS e a radiação emitida são compatíveis. O comprimento de onda e intensidade da luz, o tempo de exposição e a capacidade de absorção do FS determinam os resultados. Portanto, a eficácia do tratamento depende da otimização de grande número de parâmetros (18), e os estudos realizados com PACT em periodontia mostram que existem diversas discrepâncias entre os parâmetros empregados para a PACT. A falta de evidência clínica não permite ainda que a eficácia da PACT seja

mensurada. As pesquisas realizadas empregam condições de tratamento diferentes, dificultando a comparação dos resultados (9, 16, 20).

2. Objetivos:

2.1. Objetivos gerais

Avaliar a atenuação da luz no tecido periodontal com pigmento melânico.

2.2. Objetivos específicos:

Comparar a atenuação lateral da luz com seu comportamento em profundidade no tecido gengival pigmentado.

3. Materiais e métodos:

Este ensaio clínico foi executado com 10 pacientes sistemicamente saudáveis e que estavam em tratamento periodontal na Clínica Odontológica da Universidade Nove de Julho, onde foram realizados todos os procedimentos clínicos para o estudo. Os participantes da pesquisa leram, entenderam e receberam informações verbais sobre o conteúdo do projeto, e os procedimentos aos quais seriam expostos durante o trabalho. Estas informações constam no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que se encontra no anexo e foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Nove de Julho (CAAE: 54853216.0.0000.5511). Para ser considerado voluntário neste trabalho, o paciente estava em tratamento clínico periodontal. Este protocolo de tratamento foi preconizado para sanar a Periodontite Crônica e foi publicado pela Academia Americana de Periodontia (23, 24). Neste trabalho, não existe um grupo “tratamento convencional” visto que todos os pacientes estarão em tratamento para Periodontite Crônica e o objetivo da pesquisa não foi comparar tratamentos, mas sim avaliar parâmetros físicos de comportamento da luz na gengiva com melanina. Os voluntários não tiveram sua identificação visual fotografada. Todos os dados permanecem em posse dos pesquisadores responsáveis pelo estudo e foram divulgados sem exposição de nome ou fotografia da face do voluntário.

3.1. Critérios de inclusão

Dez pacientes portadores de periodontite crônica com alterações clínicas inflamatórias foram selecionados. Eles apresentaram idade mínima de 18 anos e ter pelo menos 15 dentes presentes, com o mínimo de 3 incisivos com profundidade de sondagem maior que 4 mm.

O paciente se encontrava em tratamento periodontal na Clínica Odontológica da Universidade Nove de Julho, instituição onde foi realizada esta pesquisa. Todos os pacientes foram tratados conforme o protocolo preconizado pela Academia Americana de Periodontia (23, 24).

3.2. Critérios de exclusão

Fumantes ou ex-fumantes que interromperam o hábito a menos de 12 meses antes da seleção, pessoas com câncer, gestantes e pacientes em tratamento ortodôntico.

3.3. Grupos experimentais e delineamento do estudo

Neste trabalho, todos os pacientes foram submetidos ao tratamento periodontal na clínica odontológica da Universidade Nove de Julho, e os procedimentos experimentais não tinham por objetivo tratar ou interferir na resolução da inflamação periodontal. Todos os pacientes foram orientados quanto aos objetivos da pesquisa e tinham pleno conhecimento de que a irradiação não traria benefícios clínicos diretos. O tamanho da amostra foi calculado baseado em estudos prévios existentes na literatura. Dez pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão (21, 22, 25).

3.4. Fotografias

Cada paciente teve três dentes incisivos selecionados para o procedimento. Duas fotografias digitais foram tiradas de cada incisivo selecionado - uma em posição frontal (Fig. 1A) e uma em posição incisal (Fig. 1B). Uma câmera T2i (Canon, Japão) com lente macro de 100 mm foi usada e os seguintes parâmetros foram adotados para todas as fotografias: distância focal de 35 mm comprimento, f22 de abertura de diafragma, velocidade de 1/100 do obturador e ISO 200. Enquanto as fotografias eram obtidas, cada incisivo selecionado recebeu irradiação de uma fonte de laser com emissão de radiação no comprimento de uma onda de $\lambda=660$ nm e saída de energia radiante de 100 mW. As imagens foram gravadas para análise no programa ImageJ e foi utilizada a rotina de processamento descrita por Alvarenga et al. 2018 (21).

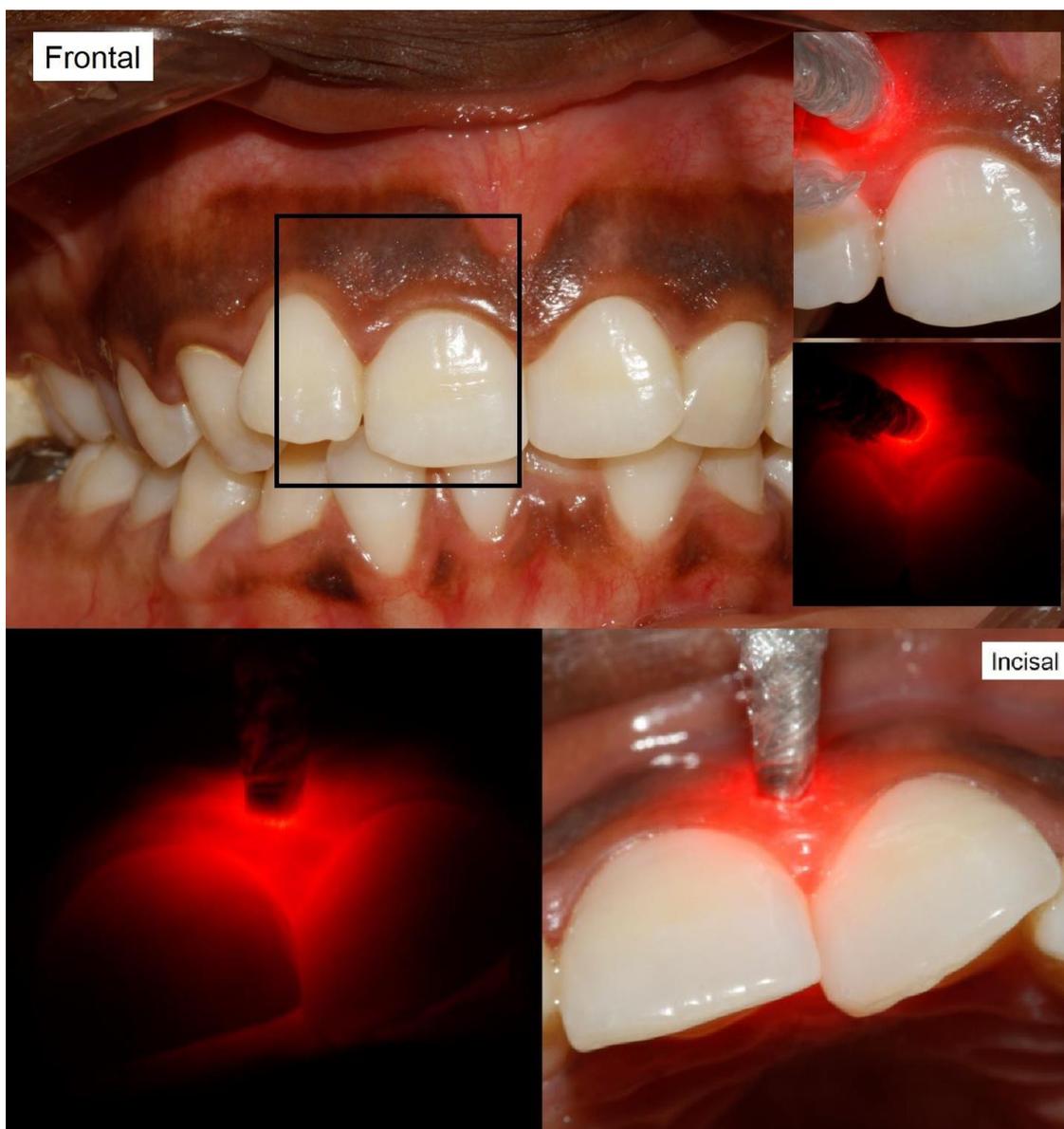


Figura - 1 Figura ilustrativa do padrão de melanina típico dos pacientes alocados e imagem da irradiação empregada no experimento. Vista incisal da irradiação na região vestibular da paciente

3.5. Avaliação do espalhamento da luz no tecido gengival

Cada região selecionada recebeu a irradiação, sem a irrigação com FS para realização de fotografias intra-orais. Foi utilizado um laser com comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil). Estas fotografias foram utilizadas para avaliação do espalhamento da luz no tecido gengival, com uso do programa ImageJ. Foram realizadas fotografias digitais com lente macro 100 posicionada em distância padronizada na posição vestibular e Incisal, que foram realizadas duas

fotografias por dente e pelo menos 6 dentes incisivos de cada participante foram examinados e fotografados. Todo equipamento fotográfico que foi utilizado na pesquisa é de propriedade dos pesquisadores envolvidos no projeto.

3.6 Análise dos dados

As imagens foram selecionadas aleatoriamente, com dois arquivos por paciente. Um arquivo referente à vista incisal e outro frontal. Os arquivos foram carregados no programa ImageJ com formato RGB e a ferramenta “plot” foi ativada. Uma linha foi traçada a partir do ponto de maior intensidade próximo à ponteira laser e uma tabela de intensidade por distância foi criada para cada paciente. Os dados foram normalizados pelo maior valor de intensidade medido e foi criando uma média e desvio padrão para cada valor de profundidade. Para converter a profundidade de pixels para milímetros, o diâmetro da ponteira laser foi medido e usado como referência em cada fotografia. A figura 2 ilustra o modelo de avaliação dos dados.

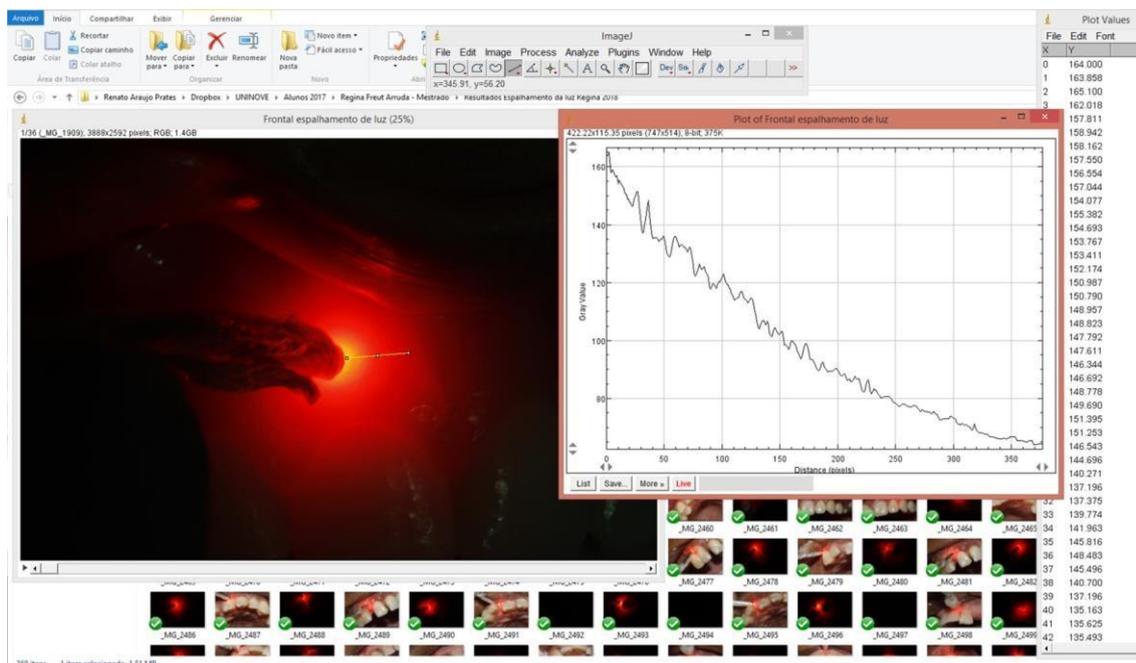


Figura - 2 Método de quantificação da luz no programa ImageJ

Os valores médios e o desvio padrão foram exportados para o programa (OriginLab, Northampton, USA) e foi criado uma curva de ajuste de decaimento exponencial de segunda ordem com cálculo de R^2 .

De acordo com a análise das 20 tomadas fotográficas das tomadas incisais e frontais, observamos a atenuação da luz na gengiva de pacientes portadores de melanina e zonas de intensidade da luz ao redor da ponteira laser em contato com o tecido gengival, quando a mesma penetra no tecido gengival e sofre espalhamento e absorção. Através desse gráfico observamos que o eixo Y, representa a intensidade luminosa normalizada. Foi realizado uma normalização dos dados, com todos os dados obtidos de cada paciente, uma divisão pelo maior número de intensidade na coluna, criando-se uma proporção relativa para esses dados para cada paciente. Foi feito uma média do dado normalizado por cada profundidade e para cada paciente resultando numa curva com média e desvio padrão. A partir dessa média e do desvio padrão, uma curva de decaimento exponencial foi calculada para incisal e frontal. O R^2 foi obtido no programa OriginLab.

4. Resultados

A curva gerada demonstrou o comportamento que a luz apresentou no tecido gengival com melanina. Na região lateral ela chegou a 50% mais rápida em 2,3 mm, enquanto que em profundidade ela chegou a aproximadamente 3,0 mm. Os resultados mostram que quanto maior a distância em milímetros percorrida pela luz lateralmente ao ponto de incidência do feixe, menor é a intensidade luminosa normalizada no tecido gengival com melanina.

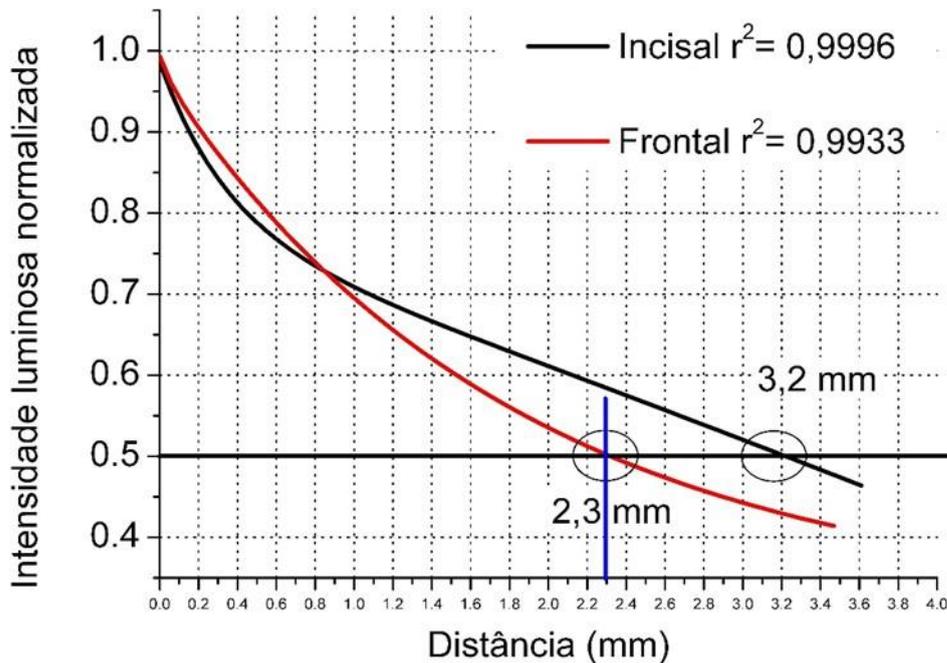


Figura - 3 A figura representa a atenuação da luz na gengiva de pacientes portadores de melanina. No eixo Y temos o intensidade luminosa normalizada para 1 sendo seu máximo. O eixo X representa a distância em milímetros percorrida pela luz lateralmente ao ponto de incidência do feixe. Os dados são o fit polinomial em segundo grau calculados a partir da média e desvio padrão de 10 tomadas fotográficas.

Discussão

Os nossos resultados podem trazer informações para os estudo referentes a fototerapia em tecido gengival. O uso do laser para redução da carga microbiana em bolsas periodontais é feito com PACT. No entanto, os resultados dos estudos, relativos a este uso, são inconsistentes quanto à existência de um resultado melhorado ao usar a PACT para reduzir as bactérias subgengivais (26).

Campanile et al. estudaram o efeito da PACT em bolsas residuais. Um fotossensibilizador de cor azul de metileno foi aplicado nas bolsas e os locais foram irradiados por 60 segundos. Os autores relataram melhorias adicionais com o uso da PACT (27). Para alcançar bons resultados com o uso de um laser, é essencial haver uma melhor compreensão dos parâmetros dosimétricos ideais, tais como energia, tempo de irradiação e exposição

radiante. Adicionalmente, no caso da PACT, a eficácia do tratamento é influenciada pelas características do fotossensibilizador e pela distribuição de luz no tecido irradiado. A atenuação de luz no tecido é causada por absorção, dispersão e uma pequena parte por refletância. Cromóforos, tais como a melanina, a hemoglobina e as proteínas, podem influenciar o espalhamento e a absorção de luz, e a superfície do tecido pode produzir refletância (28). Quando temos uma bolsa periodontal e colocamos um FS, esse irá diminuir ou matar as bactérias dessa bolsa, tanto em paciente com melanina ou sem melanina. Ambos precisam da mesma quantidade de luz, levando em consideração o tamanho da bolsa. Nosso trabalho incluiu 10 pacientes com pigmentação melanica no tecido gengival de proteção, todos pacientes possuíam periodontite crônica generalizada. Três sítios de cada paciente foram selecionados para os procedimentos experimentais e foi eleito aleatoriamente um sítio frontal e um incisal de cada paciente para avaliação. Nos pacientes com melanina, precisa ser reduzido o espaço, mais próximo de 3 mm de distância entre um ponto de irradiação e outro.

Em estudo de Lui et al. (2011), foi utilizado o azul de metileno a 1% (10 mg/mL) para realização da PACT nos pacientes com periodontite crônica e a irradiação foi feita com laser de diodo de 940 nm e 1 W de potência durante 30 segundos. É importante ressaltar que a toxicidade celular somente ocorre quando o espectro de absorção do FS e a radiação emitida são ressonantes. O FS azul de metileno, que absorve luz em 664 nm, foi usado associado a um laser de diodo com emissão no infra-vermelha ($\lambda=940$ nm). O azul de metileno, assim como outros fotossensibilizadores (ex.: azul de toluidina, verde de malaquita), possui uma banda de absorção no vermelho do espectro eletromagnético (29). Em estudo de Betsy et al. (2014) foi avaliada a eficácia da PACT no tratamento da periodontite crônica utilizando-se o azul de metileno com concentração de 10 mg/mL e irradiação com laser de diodo com comprimento de onda de 665 nm e potência de 1 W por 60 segundos (25). Porém, a potência de 1 W empregada nestes estudos promove um efeito térmico, principalmente se a energia for entregue com fibra óptica em uma área pequena. Este é um efeito de lasers em alta potência. Nestes casos devemos levar em consideração a possibilidade de efeito térmico aos tecidos. Em estudo

de Prates et al. (2009) foi observado que quanto maior a irradiância, maior a morte celular alcançada, portanto, maior a eficácia da PACT. Porém, foi notado aumento da temperatura de 3°C na suspensão irradiada com 300 mW/cm², mas esse aumento de temperatura não é suficiente para causar morte celular. Sendo assim, o tempo de irradiação é um parâmetro importante que deve ser considerado para se potencializar a morte celular (13).

Autalmente, a luz do feixe do laser é entregue normalmente em apenas um ponto por sítio, e as vezes não é feito com o tempo adequado (12, 22, 25, 29-31). Muitas vezes não tem mais de um ponto de irradiação por sítio, independente do tamanho da bolsa. Isso pode ser que explique o mal resultado da PACT em trabalhos já realizados. Desse modo, mais estudos clínicos são necessários para investigar a irradiação no tecido gengival, levando em consideração a quantidade de irradiação pelo tamanho da bolsa periodontal e as características próprias da gengiva, como pigmentação e espessura. Na gengiva sem melanina, a quantidade da luz do laser que foi absorvida é igual em profundidade e lateralidade a 3 mm (21). Quando o tecido gengival tem melanina, ocorreu então uma diminuição na atenuação lateral, devido a melanina localizada dentro do epitélio, que proporcionou perda de luz no caminho óptico de dissiminação lateral. Observamos uma atenuação de 50% da luz a uma distância de 2,3 mm da ponteira laser. A diminuição significativa da luz ao redor do alvo pode justificar a grande gama de resultados diferentes provenientes de diferentes ensaios clínicos; isso depende da profundidade de sondagem das bolsas, uma vez que a luz não alcançará todas as seções e as bactérias permanecerão ativas nessa região. Com a otimização dos parâmetros, a PACT poderá ser utilizada no futuro como tratamento adjuvante de pacientes com periodontite crônica de forma adequada, visando reduzir o uso de antimicrobianos sistêmicos e, conseqüentemente, a resistência bacteriana (21). Assim, os parâmetros dosimétricos leves para uso clínico da fototerapia no tecido periodontal devem ser abordada no início do estudo, para ensaios clínicos, ou para a criação de um plano de tratamento a ser utilizado para práticas diárias (21). Nossos resultados colaboram que o decaimento da luz deve ser levada em conta para otimizar os parâmetros de irradiação para PACT no tratamento da doença periodontal. Como a sondagem de bolsas de

profundidades variam muito, é importante considerar que em bolsas mais profundas, mais de um ponto de irradiação deve ser realizada.

Conclusão

Podemos concluir que na presença de melanina, a luz vermelha percorre menor distância lateral devido à localização superficial do pigmento. No entanto, as camadas mais profundas do tecido não são prejudicadas com a absorção superficial da luz.

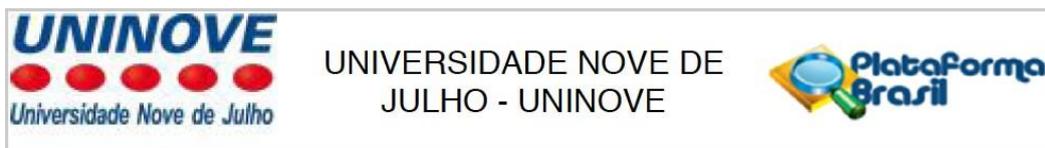
As condições gengivais de pigmentação devem ser levadas em consideração para determinar a quantidade de pontos de irradiação em bolsas periodontais profundas.

Referências Bibliográficas

1. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *Journal of periodontal research*. 2002;37(5):389-98.
2. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology 2000*. 2009;51:109-40.
3. Singmund Socransky ADH. *Microbiologia da Doença Periodontal*. In: Koogan G, editor. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia oral*. 1. Munksgaard, Copenhagen 1997. p. 92-126.
4. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002;28:12-55.
5. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*. 2005;38:135-87.
6. Drisko CL. Periodontal debridement: still the treatment of choice. *The journal of evidence-based dental practice*. 2014;14 Suppl:33-41 e1.
7. Feres M, Figueiredo LC, Soares GM, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontology 2000*. 2015;67(1):131-86.
8. Sgolastra F, Gatto R, Petrucci A, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*. 2012;83(10):1257-69.
9. Franco TPM, Dos Santos APP, Canabarro A. The effects of repeated applications of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of residual periodontal pockets: a systematic review. *Lasers in medical science*. 2018.
10. Borges I, Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Retamal-Valdes B, Montenegro SCL, et al. Different antibiotic protocols in the treatment of severe chronic periodontitis: A 1-year randomized trial. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(8):822-32.
11. Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2009;80(3):364-71.
12. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *Journal of periodontology*. 2009;80(1):98-105.
13. Prates RA, Silva EGd, Yamada-Jr. AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. *Laser Phys*. 2009;19(5):1038-44.
14. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, Franca CM, Cai S, Mayer MP, et al. 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. *Photomedicine and laser surgery*. 2011;29(12):835-44.
15. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in medical science*. 2013;28(2):669-82.
16. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R, Monaco A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(5):514-26.

17. Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, Kato IT, Suzuki LC, Ribeiro MS, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2015;12(1):131-5.
18. Prates RA, Yamada AM, Jr., Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2007;86(1):70-6.
19. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(1):13-28.
20. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):143-66.
21. Alvarenga LH, Ribeiro MS, Kato IT, Nunez SC, Prates RA. Evaluation of red light scattering in gingival tissue - in vivo study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2018;23:32-4.
22. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2009;36(7):575-80.
23. Treatment of Plaque-induced Gingivitis, Chronic Periodontitis, and Other Clinical Conditions. *Pediatric dentistry*. 2017;39(6):445-54.
24. American Academy of Periodontology--Research S, Therapy C, American Academy of Pediatric D. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis, and other clinical conditions. *Pediatric dentistry*. 2005;27(7 Suppl):202-11.
25. Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J, Subhash N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(6):573-81.
26. American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2011;82(4):513-4.
27. Muller Campanile VS, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombelli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lasers in medical science*. 2015;30(1):27-34.
28. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in medicine and biology*. 2013;58(11):R37-61.
29. Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2011;46(1):89-96.
30. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(10):877-84.
31. Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, Casarin RC, Cirano FR, Saraceni CH, et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers in medical science*. 2013;28(1):317-24.

Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Atenuação da Luz Laser Vermelha no tecido Gengival em pacientes com pigmentação melânica e Doença Periodontal - estudo clínico

Pesquisador: Renato Araujo Prates

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91546818.4.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.732.032

Anexo II – Termo de consentimento Livre e esclarecido TCLE

Nome do Voluntário: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____

E-mail: _____

1. Título do Trabalho Experimental: Avaliação da Atenuação da Luz Laser Vermelha no tecido Gingival em pacientes com pigmentação melânica e Doença Periodontal – estudo clínico

2. Objetivo: Avaliar o decaimento da luz (660 nm) no tecido gengival durante a irradiação com o laser em tecido gengival de diferentes condições.

3. Justificativa: No tratamento periodontal, pode ser necessário o emprego de antibióticos, especialmente em infecções periodontais mais graves. Porém, o uso desses agentes pode causar efeitos adversos e levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Sendo assim, há grande interesse no desenvolvimento de novas formas de tratamento, e a terapia fotodinâmica cumpre este objetivo. A PACT é uma modalidade não invasiva de tratamento, e pode ser utilizada como adjuvante ao tratamento das periodontites.

4. Procedimentos da Fase Experimental: Irradiação da gengiva com um laser sem efeitos térmicos, ou seja, ele não esquenta ou corta. Serão realizadas fotografias para quantificar o espalhamento da luz vermelha pela gengiva. O atendimento levará aproximadamente 20 min e o procedimento não faz parte do processo de tratamento periodontal.

5. Desconforto ou Riscos Esperados: Desconforto ou dor não são esperados. Existe um leve risco de exposição dos olhos à luz laser, e para isto, os profissionais, voluntários e auxiliares utilizarão óculos de proteção. O corante usado (azul de metileno) não apresenta riscos dentro das concentrações que utilizaremos no estudo. Casos de hipersensibilidade ao azul de metileno são considerados raríssimos. Não é esperado que ocorra pigmentação (*manchamento*) dos dentes. O voluntário não receberá contribuição direta ao participar da pesquisa, porém, os resultados poderão beneficiar outros pacientes no futuro.

6. Métodos Alternativos Existentes: Não existe atualmente método alternativo para terapia fotodinâmica. Um efeito antimicrobiano pode ser conseguido com técnicas de higiene oral.

7. Retirada do Consentimento: O participante da pesquisa poderá retirar seu consentimento, decidindo não participar da pesquisa a qualquer tempo, sem nenhum prejuízo. A retirada do consentimento não influenciará a continuidade do tratamento periodontal na clínica. Ou seja, o paciente continuará a receber o protocolo de tratamento periodontal.

8. Garantia do Sigilo: O sigilo dos dados será mantido pelos pesquisadores e somente serão divulgados sem a identificação do voluntário.

9. Local da Pesquisa: A pesquisa será desenvolvida na clínica de Odontologia da UNINOVE .

11. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS

nº 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos.

Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 12º andar - Liberdade – São Paulo – SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9010

comitedeetica@uninove.br

Horários de atendimento do Comitê de Ética: segunda-feira a sexta-feira – Das 11h30 às 13h00 e Das 15h30 às 19h00

12. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores: Prof. Dr. Renato Araujo Prates - (011) 98383-4169 – pratesra@uni9.pro.br

13. Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

14. Consentimento Pós-Infirmação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos somente neste estudo no meio científico.

15. Eu, Prof. Dr. Renato Araujo Prates (Pesquisador do responsável desta pesquisa), certifico que:

- a) Considerando que a ética em pesquisa implica o respeito pela dignidade humana e a proteção devida aos participantes das pesquisas científicas envolvendo seres humanos;
- b) Este estudo tem mérito científico e a equipe de profissionais devidamente citados neste termo é treinada, capacitada e competente para executar os procedimentos descritos neste termo;
- c) A resolução CNS nº 466/12 dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais, cujo procedimentos metodológicos envolvam a utilização de dados diretamente obtidos com os participantes.

São Paulo, de de 201____.

Assinatura do Participante

Renato Araujo Prates - Pesquisador Responsável