



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

ANDREIA LA SELVA ALMEIDA

**TRATAMENTO DE HERPES SIMPLES LABIAL COM TERAPIA
FOTODINÂMICA: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CONTROLADO,
DUPLO-CEGO COM ACOMPANHAMENTO DE 12 MESES**

SÃO PAULO, SP

2022

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

ANDREIA LA SELVA ALMEIDA

Tese de doutorado apresentada à
Universidade Nove de Julho para a
obtenção do título de Doutora em
Biofotônica Aplicada às Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anna Carolina
Ratto Tempestini Horliana.

**São Paulo
2022**

FICHA CATALOGÁFICA

Almeida, Andreia La Selva.

Tratamento de herpes simples labial com terapia fotodinâmica: ensaio clínico randomizado controlado, duplo-cego com acompanhamento de 12 meses. / Andreia La Selva Almeida. 2022. 78 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Herpes labial. 3. Herpes simples. 4. Laser.

I. Horliana, Anna Carolina Ratto Tempestini II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 24 de novembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

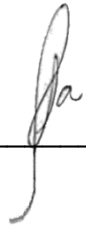
Aluno (a): Andreia La Selva Almeida

Título da Tese: “Tratamento de herpes simples labial com terapia fotodinâmica: ensaio clínico randomizado controlado duplo cego com acompanhamento de 12 meses”.

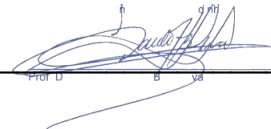
Presidente: PROF^a. DR^a. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA



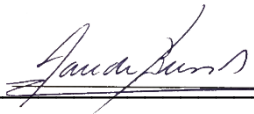
Membro: PROF^a. DR^a. LARA JANSISKI MOTTA



Membro: PROF. DR. PAULO HENRIQUE BRAZ SILVA



Membro: PROF^a. DR^a. SANDRA KALIL BUSSADORI



Membro: PROF^a. DR^a. MARCELA LETÍCIA LEAL GONÇALVES



RESUMO:

Atualmente o tratamento do herpes labial é realizado com aciclovir (ACV). Apesar de diminuir a sintomatologia, estudos mostram que não previne a recorrência das lesões. Sabe-se que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy* – aPDT) possui vantagens como diminuição do tempo de remissão e ausência de recorrência no mesmo local. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se a terapia fotodinâmica antimicrobiana foi capaz de diminuir o tempo de remissão dessas lesões e diminuir a sua recorrência. Os indivíduos que se apresentaram com herpes na fase de vesícula ou úlcera foram incluídos no estudo e divididos aleatoriamente em dois grupos: G1- Grupo ACV – Foi aplicado o creme aciclovir + simulação da aPDT para cegamento do estudo. G2- Grupo aPDT - azul de metileno a 0,005% irradiados com comprimento de onda de 660nm, potência de 100mW (Laser Duo, MMOptics), exposição radiante de 120J/cm² e energia de 3J por ponto. Foi aplicado na porção central da lesão, com 30 segundos de irradiação + creme placebo do aciclovir. A variável principal do estudo foi o tempo de resolução da lesão em dias. As variáveis secundárias foram avaliação da recorrência avaliada em meses, a dor avaliada por meio da escala visual analógica (EVA), temperatura local por meio de termômetro digital. Os vírus HSV-1 foram quantificados por meio de PCRq. Todas as avaliações foram realizadas no baseline e após 3 e 7 dias após a aplicação da aPDT ou seu placebo. O questionário Ohip-14 (*Oral Health Impact Profile*) foi utilizado para avaliar o impacto da saúde bucal após o tratamento. O acompanhamento foi realizado em 1 mês, 6 meses e um ano para o questionário Ohip-14-14 e avaliação da recorrência. **Resultados:** Não houve diferença no tempo de resolução das lesões em ambos os grupos estudados ($p=0,308$), na diminuição da dor ($p=0,862$ no primeiro e $p=0,339$ no terceiro dia) e na diminuição da temperatura ($p=0,488$ no primeiro, $p=0,528$ no segundo e $p=0,071$ no terceiro dia). **Conclusão:** não houve diferença quanto ao tempo de resolução da lesão nos dois grupos analisados nem para os outros desfechos clínicos analisados.

PALAVRAS CHAVE: terapia fotodinâmica, herpes labial, herpes simples, laser

ABSTRACT:

Herpes simplex lesions are treated with acyclovir. Despite reducing symptoms, studies show that it does not prevent recurrence of lesions. Photodynamic therapy (aPDT) has advantages such as decreased remission time and absence of recurrence in the same place. Therefore, the objective of this study was to evaluate if photodynamic therapy can decrease the healing time of these lesions and decrease their recurrence. Patients who present with herpes in the vesicle or ulcer phase and are included in the study were randomly divided into two groups: G1- Aciclovir group - aciclovir + aPDT simulation was used for blinding of the study, G2- aPDT group: 0.005% methylene blue laser group irradiated with 660nm, 100mW (Laser Duo, MMOptics), 120J / cm², 3J per point. Applied to the central part of the lesion, and 30 seconds of irradiation + aciclovir placebo. The main study variable was the lesion resolution time in days. Secondary variables were assessment of recurrence assessed in months, pain assessed by visual analog scale (VAS), local temperature by digital thermometer. The viruses were quantified by PCRq. All evaluations were performed at baseline and after 3 and 7 days after the application of aPDT or its placebo. The questionnaire to evaluate the impact of laser treatment on quality of life was applied at baseline and after 7 days for secondary variables. Long-term follow up was performed at 1 month, 6 months and one year for quality of life and recurrence assessment. Results: There was no difference resolution of the lesions in both studied groups (p=0.308), pain (p=0.862 in the first and p=0.339 in the third day) and temperature (p=0.488 first day, p=0.528 second day and p=0.071 on the third day). Conclusion: there was no difference regarding the time for lesion resolution in the analyzed groups, also for all the clinical outcomes analyzed.

KEY WORDS: photodynamic therapy, cold sores, herpes simplex, photobiomodulation, laser

SUMÁRIO

1. Contextualização	9
1.1. Herpes Simples	9
1.2. Prevalência	9
1.3. HSV-1	9
1.4. Aspectos Clínicos	12
1.5. Tratamento	12
1.6. Terapia Fotodinâmica	15
2. Justificativa	18
3. Hipótese Experimental	19
4. Objetivos	20
4.1 Objetivo Primário.....	20
4.2 Objetivos Secundários.....	20
5. Material e Método.....	21
5.1 Cálculo do Tamanho da Amostra	23
5.2 Calibração e Treinamento dos avaliadores	24
5.3 Descrição da amostra	24
5.4 Critérios de exclusão e inclusão	24
5.5 Aleatorização.....	25
5.6 Cegamento do estudo	25
5.7 Avaliações pré-tratamento	25
5.8 Anamnese.....	25
5.9 Desenho Experimental	26
5.10 Terapia Fotodinâmica	26
5.11 Tratamento com Aciclovir	29
5.12 Variáveis do estudo	30
5.12.1 Avaliação do tempo de resolução da lesão em dias	31
5.12.2 Acompanhamento das recorrências da lesão por HSL	31
5.12.3 Quantificação do HSV-1	31
5.12.4 Dor	34
5.12.5 Temperatura	34
5.12.6 Impacto da saúde bucal na percepção do paciente (Questionário <i>Oral Health Impact Profile -Ohip-14</i>)	35

6. Análise Estatística	37
7. Resultados	38
8. Discussão	46
9. Conclusão	52
10. Referências Bibliográficas.....	53
Anexos:	
Anexo 1. Anamnese	61
Anexo 2. TCLE	62
Anexo 3. Termo de Assentimento	66
Anexo 4. Questionário <i>Ohip-14</i>	68
Anexo 5. Ficha de Acompanhamento	69
Anexo 6. Parecer Consubstanciado do CEP	70
Anexo 7. Protocolo Publicado na Revista Medicine Baltimore	78
Anexo 8. Calibração	79

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: Diagrama esquemático do HSV	10
Figura 2: Fusão do capsídeo viral com a membrana celular	10
Figura 3: Ação das proteínas virais sobre as citocinas	11
Figura 4: Diagrama de Jablonski	15
Tabela 1: Parâmetros dosimétricos encontrados na literatura	16
Figura 5: Fluxograma do estudo	22
Figura 6: Perfuração das vesículas com agulha estéril	27
Figura 7: Aplicação do azul de metileno.....	27
Figura 8: Aplicação do laser perpendicular e em contato com a lesão	28
Figura 9: Utilização dos óculos de proteção: pesquisador e participante	29
Quadro 1. Parâmetros empregados na aPDT.....	29
Figura 10 – Divisão dos lábios em sextantes	31
Figura 11: Coleta de HSV com swab estéril	32
Figura 12: Material para coleta de saliva e vírus.....	32
Tabela 2: Sequência e referência do primer utilizado.....	34
Figura 13: EVA- Escala Visual Analógica de Dor	34
Figura 14: Aferição da temperatura com termômetro digital	34
Quadro 2- Questões do OHIP-14-14	34
Quadro 3 – Significado dos domínios do questionário <i>Ohip-14</i>	36
Tabela 3: Variáveis demográficas e clínicas segundo os grupos de tratamento.....	38
Tabela 4: Recorrência das lesões de herpes entre os grupos	39
Tabela 5. Variável dor entre os grupos:.....	39
Gráfico 1: Dor entre os grupos no Dia 1 e no dia 3.....	40
Tabela 6: Temperatura nos dias 1, 3 e 7	40
Gráfico 2: Temperatura entre os grupos nos dias D1, D2 e D7.....	41
Tabela 7: Proporção de qPCR HSV-1 nos grupos nos dias D1 e D3.....	41
Gráfico 3: q-PCR nas lesões nos grupos nos dias D1 e D3	42
Tabela 8: Proporção de cópias/mL entre os grupos.....	42
Gráfico 4: Cópias por mL nos grupos ACV e aPDT	43
Tabela 9: Proporção de q-PCR na saliva entre os grupos nos dias 1 e 3.....	43
Gráfico 5: q-PCR na saliva nos grupos nos dias D1, D3 e D7.....	44
Tabela 10: Resultado do Ohip-14(domínios e somatória) no D1 e após 1 ano....	44
Gráfico 6: Ohip-14 no D1 e após 1 ano.....	45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

HSV-1: Vírus Herpes Simples Tipo 1

ACV: Aciclovir

IL-6: Interleucina 6

IL-1: Interleucina 1

TNF- α : Fator Tumoral de Necrose alfa

IL-8: Interleucina 8

RNAm: Acido ribonucleico mensageiro

IL-10: Interleucina 10

ATP- Adenosina Tri fosfato

aPDT: Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

DNA: Ácido desoxirribonucleico

nm: nanometros

ROS: Espécies reativas de Oxigênio

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE: Tris-EDTA

PCR- Reação em cadeia polimerase

OHIP-14-14: Questionário *Oral health impact profile* (*Questionário do Impacto de Vida Relacionada à Saúde Oral*)

mW: mili Watts

J/cm²: Joules por centímetro quadrado

J: Joules

1.CONTEXTUALIZAÇÃO:

1.1. Herpes Simples

Herpes labial é uma doença infecciosa causada pelo vírus herpes simples. Os subtipos HSV-1 (do inglês *herpes simplex vírus* - 1) e HSV-2 acometem a pele e as membranas mucosas, porém o subtipo HSV-1 acomete mais a região orofacial. (Whitley *et al.*,2001). Os seres humanos são portadores naturais do HSV 1 e a transmissão é feita pelo contato direto com secreções orais infectadas. (Arduino *et al.*,2008). Alguns indivíduos podem apresentar infecções recorrentes e outros nunca evoluírem com um segundo episódio. (Arduino *et al.*, 2008).

1.2. Prevalência:

O HSV-1 apresenta uma taxa de soropositividade na ordem de 67% na população humana. (Singh *et al.*, 2020) A prevalência de herpes labial aumenta gradualmente durante a infância, chegando a acometer de 70 a 80% dos adultos no mundo. (Lowhagen *et al.*, 2002; Axel *et al.*, 1990 e Reichart *et al.*, 2000). Em 2016, cerca de 3.752 milhões de pessoas, entre 0 e 49 anos de idade, apresentaram soro prevalência por HSV tipo 1 (James *et al.*, 2020). Nos Estados Unidos, o herpes labial recorrente atinge cerca de um terço da população e esses indivíduos apresentam de 1 a 6 episódios ao ano. (Cernik *et al.* 2008). Essas lesões podem apresentar recorrência, em 20 a 40 % da população mundial. (Arduino *et al.*,2008).

1.3. HSV-1:

A família do vírus herpes é diversificada, e cada tipo de vírus tem um genoma com DNA de cadeia dupla que codifica de 100 a 200 genes. (Arduino *et al.*, 2008). O DNA do HSV apresenta aproximadamente 150 mil pares de base (Fatahzadeh e Schwartz,2007), densamente enrolado. (Grünwald *et al.*, 2003)

O vírus herpes apresenta três elementos estruturais: um nucleocapsídeo icosaédrico, que contém o genoma, o envelope composto de uma camada bilipídica com glicoproteínas embutidas e uma região proteica entre o capsídeo e o envelope chamado de tegumento. Figura 1. (Grünwald *et al.*, 2003).

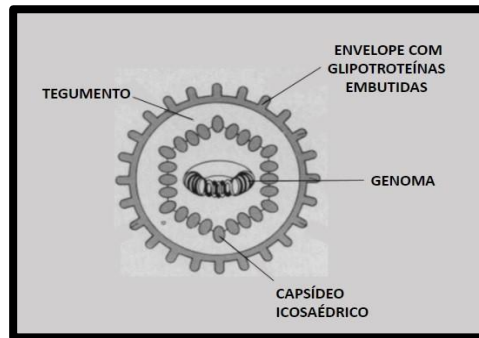


Figura 1: Diagrama esquemático do HSV
(adaptado de Corey e Spear, 1986)

O HSV-1 é um vírus neurotrópico com alto ciclo de replicação no hospedeiro. (Arduino *et al.*, 2008). Acredita-se que o contato inicial do HSV-1 seja por meio das cadeias de glicosaminoglicanos e dos proteoglicanos da superfície celular onde ocorre a fusão das membranas viral e celular, permitindo o fornecimento do nucleotídeo viral para o citoplasma. (Spear *et al.*, 2004) (Figura 2)

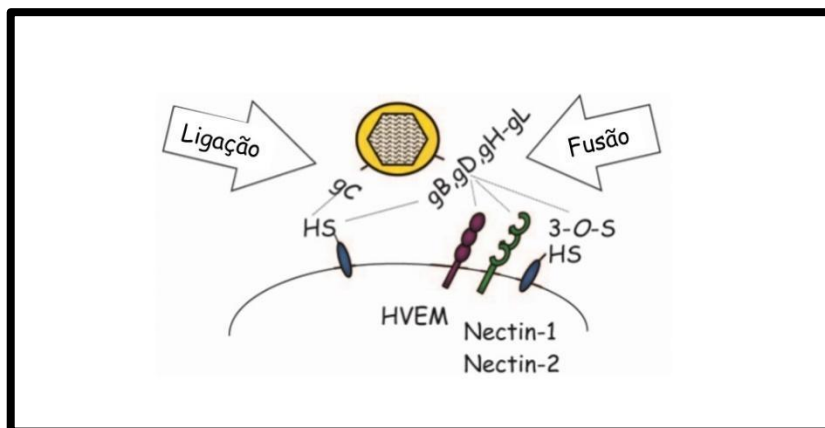


Figura 2: Fusão do capsídeo viral com a membrana celular (adaptado de
Spear *et al.*, 2004)

Fonte: a autora

Durante a exposição inicial, HSV-1 usa células epiteliais da mucosa, como a principal porta de entrada e se multiplica no epitélio, infectando terminais axônicos dos nervos sensoriais que inervam a derme. (Arduíno *et al.*, 2008). Os vírus transitam por transporte axonal retrógrado para o corpo celular neuronal abandonando o processo replicativo, estabelecendo um ciclo lítico. (Donnarumma *et al.*, 2010) O gânglio do nervo trigêmeo é o principal local de latência, que permite a manutenção do genoma viral em forma não patogênica, servindo como um reservatório para posterior reativação viral. (Arduino *et al.*, 2008). Os títulos virais são maiores quando a infecção está ativamente

produzindo vesículas e, acredita-se que o risco de infecção seja maior nessa fase. (Bello-Silva *et al.*,2010). Já a fase de latência do HSV é um estado caracterizado por repressão viral. (Singh *et al.*,2020).

A eliminação eficiente de uma infecção viral requer uma resposta inflamatória do hospedeiro com ativação de macrófagos, células natural killer, linfócitos T e produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. (Morgensen *et al.*,2004)

As células epiteliais são capazes de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-1 β ou α , TNF- α e a quimiocina IL-8, que mediam a resposta inflamatória na fase aguda, promovem quimiotaxia e ativam células apresentadoras de antígenos. O HSV-1 modula negativamente a produção dessas citocinas através do acúmulo de duas proteínas virais (ICP4 e ICP27), cuja transcrição é induzida por uma proteína chamada YPI6 do tegumento (Donnarumma *et al.*,2010). Essa modulação negativa acaba mediando a instabilidade de mRNA de citocina pró-inflamatória. Com isso, ocorre o atraso na produção de citocinas, permitindo a replicação do vírus e, além disso, as proteínas de transativação viral (ICP-O e VP-16), induzem a expressão de IL-10, que é uma citocina regulatória, sendo considerada parte da estratégia viral para evitar mecanismos locais de defesa imunológica na pele e promover o estabelecimento da infecção. (Donnarumma *et al.*,2010). (Figura 3)

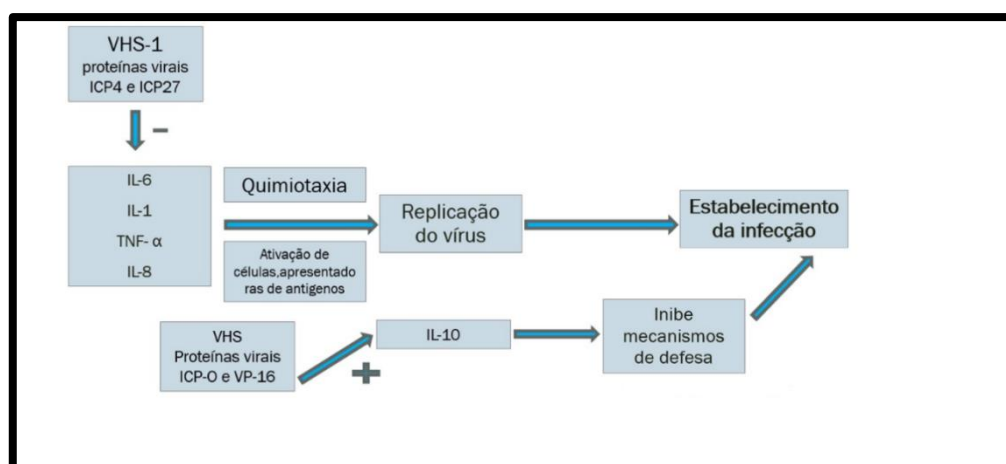


Figura 3: Ação das proteínas virais sobre as citocinas (adaptado de Donnarumma *et al.*,2010)

Fonte: a autora

A infecção sintomática herpética pode ser primária ou recorrente (Woo *et al.*,2007). As causas das recorrências são incertas, porém sabe-se que há estímulos potenciais para o seu aparecimento como: fatores imunossupressivos,

exposição aos raios ultravioleta, trauma, entre outros. (Crumpacker *et al.*, 2004). Os vírus ao serem reativados, deixam seu estado de latência e são transportados novamente para os terminais axonais, espalhando-se entre as células epiteliais, infectando-as e levando a uma lesão herpética recorrente (Arduino *et al.*, 2008; Donnarumma *et al.*, 2010).

1.4. Aspectos Clínicos:

A forma sintomática se manifesta na forma de gengivo-estomatite, mas na maioria dos casos não há sintomatologia sendo uma doença mucocutânea oral, com lesões mais frequentes em face, lábios e intraorais, podendo apresentar manifestação ocular. (Woo *et al.*, 2007). É mais prevalente em crianças, sendo caracterizada por vesículas oro-labiais dolorosas que se coalescem e se rompem formando úlceras, com duração entre 10 a 14 dias, acompanhadas de febre, mal-estar, fadiga, dores musculares e desidratação. (Raborn *et al.*, 2003; Amir *et al.*, 2001; Arduino *et al.*, 2008; Cernik *et al.*, 2008). As infecções herpéticas sintomáticas primárias geralmente são mais graves do que as recorrentes já que representam a primeira exposição do indivíduo ao vírus. Costumam ser mais intensas nas crianças, pois além do exposto, as mesmas ainda apresentam um sistema imune imaturo (Cernik *et al.*, 2008).

Na recorrência das lesões, observam-se os seguintes estágios clínicos: prodrômico, vermelhidão, pápula, vesícula, úlcera, crosta, descamação seca e remissão da lesão e muitos desses estágios podem ser curtos ou imperceptíveis. (Spruance *et al.*, 1977; Harmenberg *et al.*, 2010; Cernik *et al.*, 2008). Os sintomas prodrômicos como parestesia, dor, queimação e coceira ocorrem entre 40 a 60% dos indivíduos por aproximadamente 6 horas antes de aparecer o primeiro sinal. (Esmann *et al.*, 2001). Aproximadamente 25% das recorrências faciais não apresentam a fase papular, comumente apresentam máculas vermelhas que rapidamente se transformam em vesículas em que o estágio é altamente infectante, depois formando úlceras, e a remissão ocorre por volta de 10-15 dias após os sintomas iniciais. (Esmann *et al.*, 2001). Em indivíduos imunodeprimidos, as lesões recorrentes são mais agressivas e demoram mais para cicatrizar (Gleeny *et al.*, 2009; De Paula Eduardo *et al.*, 2013).

1.5. Tratamento:

O tratamento convencional das lesões de herpes recorrente é realizado com a utilização de agente antivirais chamados de análogos de nucleosídeos e

nucleotídeos e incluem o aciclovir, valaciclovir e famciclovir, que se diferem em sua estrutura química, dosagem e custo. (Arduíno *et al.*, 2008). Estes análogos têm um mecanismo de ação semelhante contra o HVS. O aciclovir (ACV) é fosforilado seletivamente pela timidina quinase (TK) codificada pelo vírus em células infectadas em um derivado de monofosfato. As cinases celulares convertem o derivado monofostato de ACV em derivados ativos de difosfato e trifosfato (TP). (Jiang, *et al.*, 2016). Estes metabólitos ativos derivados de nucleosídeos interferem na síntese do DNA viral ao inibir a DNA polimerase viral (Wald, 2021 UptoDate) e desta forma bloqueiam a replicação viral, porém não removem completamente o vírus e não previnem a sua recorrência. (Arduíno *et al.*, 2008, Osiecka *et al.*, 2017; De Paula Eduardo *et al.*, 2014).

O manejo da infecção por HSV-1 no hospedeiro imunocompetente depende de várias considerações, tais como: presença de infecção primária por HSV-1 ou reativação, a gravidade dos sintomas, o local da infecção (doença localizada em pele ou mucosa versus doença disseminada) e por último a frequência das recorrências. A infecção por HSV oral pode ser tratada com aciclovir tópico, oral ou intravenoso, porém a terapia tópica é muito menos eficaz do que o tratamento oral ou intravenoso. (Whitley e Roizman, 2001,). O aciclovir apresenta eficácia em reduzir a duração e os sintomas da infecção, sendo mais efetivos quando o paciente trata ainda na fase prodrômica (Miller *et al.*, 2005). Vários protocolos são utilizados, porém não há consenso entre os autores. (Marotti *et al.*, 2009; Lotuffo *et al.*, 2019).

O aciclovir tópico é utilizado na formulação em creme na concentração de 5%, aplicado a cada 4 ou 5 horas durante 5 a 10 dias. (Arduino *et al.*, 2008; Jautová *et al.*, 2019). A eficácia dos agentes tópicos é determinada por sua penetrabilidade através do epitélio até as terminações nervosas, onde ocorre a replicação. (Fatahzadeh e Schwartz, 2007 *et al.*, 2017). O ACV demonstrou penetrar na pele humana de forma mais eficaz na formulação em creme do que em pomada. (Van Vloten *et al.*, 1983)

Dois ensaios clínicos multicêntricos (Spruance, 2002), independentes, idênticos, paralelos, randomizados, duplo-cego e controlado por veículo foram conduzidos para avaliar a eficácia do aciclovir tópico no tratamento do HVS oral. Adultos sem comorbidades com história de herpes labial frequente foram recrutados da população em geral, triados para elegibilidade e randomizados

igualmente para creme de aciclovir a 5% ou controle de veículo. Os participantes foram instruídos a auto iniciar o tratamento cinco vezes ao dia por 4 dias, começando dentro de 1 hora do início da recorrência dos sintomas. O estudo concluiu que houve uma redução na duração média dos episódios nos pacientes tratados com aciclovir, assim como uma redução estatisticamente significativa na duração da dor da lesão em ambos os estudos. Foi observado uma melhor eficácia quando a terapia era iniciada na fase prodrômica ou de pápula/vesículas. O Creme de aciclovir não preveniu o desenvolvimento de lesões clássicas (progressão para vesículas, úlceras e / ou crostas) e os eventos adversos foram leve e infrequente.

No entanto, o tratamento de longo prazo com ACV e seus derivados pode levar à resistência do HSV a estes medicamentos (Jiang, 2016), cujo mecanismo é atribuído em 95% dos casos a mutações no gene UL23 que codifica a timidina quinase e em 5% dos casos a mutações no gene UL30 que codifica a DNA polimerase viral. (Arduino *et al.*, 2008, Monjo *et al.*, 2018, Miller *et al.*, 2005, Frobert *et al.*, 2014).

Um estudo francês (Frobert, 2014), com uma casuística de 10 anos, avaliou a resistência do HSV ao aciclovir e observou que em pacientes imunocompetentes, a prevalência de resistência não excedeu 0,5% durante o período de estudo, enquanto em pacientes imunocomprometidos, foi evidenciado um aumento significativo, passando de 3,8% entre 2002 e 2006 (7/182 pacientes) para 15,7% entre 2007 e 2011 (28/178) ($p = 0,0001$). Isto decorre devido a infecção por HSV em pacientes imunocompetentes necessitar de um tempo de terapia mais curto e a resistência aos medicamentos não ocorre facilmente. Em contraste, os pacientes imunodeprimidos geralmente requerem terapia anti-HSV de longo prazo (por apresentarem doença clínica mais grave, com maior replicação viral) e são mais propensos a desenvolver resistência aos medicamentos. (Jiang *et al.*, 2016).

Portanto, em vista da alta prevalência desta infecção na população, com recorrência clínica frequente nos infectados (5 a 10% das pessoas contaminadas tem no mínimo 6 recorrências ao ano) (Fatahzadeh e Schwartz, 2013; Spruance *et al.*, 1977) e aparente impacto sócio-emocional devido causar dor, gerar desconforto, restrição social e comprometimento estético, associado ao fato de que o tratamento convencional não previne recorrências e o seu uso contínuo

pode induzir resistência viral, principalmente em pacientes imunocomprometidos, algumas alternativas de tratamento têm sido estudadas, entre estas, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT -do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*), que apresenta uma boa atividade antiviral, sem indução de resistência e efeitos adversos (leves) mínimos. (Marotti *et al.*, 2010).

1.6. Terapia Fotodinâmica:

A aPDT é um método de tratamento que combina fotossensibilizadores, como o azul de metileno, luz visível em um comprimento de onda ressonante e oxigênio que induzem a morte celular. (Marotti *et al.*, 2009). O corante azul de metileno se liga ao DNA viral e, na presença da luz, é absorvido gerando espécies reativas de oxigênio e oxidação da guanina no genoma viral. (Wagner *et al.*, 2002). Este corante é classificado como uma fenotiazida, que é um fotossensibilizador heterocíclico formado por dois anéis de benzeno ligados por um átomo de nitrogênio e um de enxofre, apresentando uma intensa absorção no comprimento de onda de 600 a 660nm, que é a região de espectro útil denominada de janela terapêutica. (Bacellar *et al.*, 2015; Wainwright *et al.*, 2015). Os mecanismos fotoquímicos da aPDT podem ser descritos pelo diagrama de Jablonski (Figura 4).

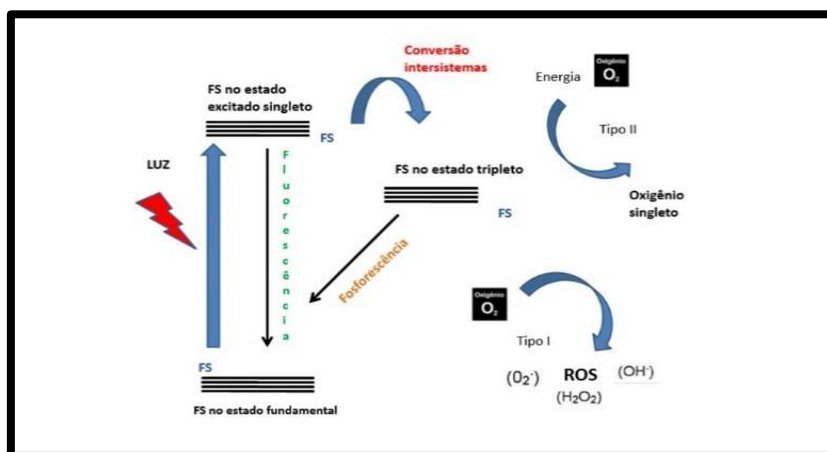


Figura 4: Diagrama de Jablonski

Legenda: ROS – espécies reativas de oxigênio, fonte: o autor

Fonte: a autora

Quando o fotossensibilizador passa do estado fundamental para o estado excitado, pode perder energia por meio de processos não radiativos, radiativos (fosforescência) ou gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) por dois

mecanismos: ou por transferência de elétrons, formando ROS (reações do tipo I), ou por transferência de energia ao oxigênio molecular formando o oxigênio singleto (reações do tipo II). A eficácia antiviral da aPDT está diretamente relacionada à geração de oxigênio singleto no ambiente celular (Fernandes *et al.*, 2017).

A otimização dos parâmetros da aPDT é um passo importante para uma aplicação clínica específica desta tecnologia *in vivo*. A literatura demonstra que a aPDT deve ser realizada após a perfuração das vesículas e em fase de úlcera que são as fases de maior carga viral e contaminação da doença (Bello-Silva *et al.*, 2010), apesar de Ramalho *et al.*, 2015 em um dos casos relatados, realizar a aPDT em fase de mácula (vermelhidão) inibindo o curso da lesão após a terapia. Não existe um consenso na literatura em relação aos parâmetros dosimétricos utilizados no tratamento do HSV labial, como demonstrado na tabela abaixo: (Quadro 1)

Tabela 1: Parâmetros dosimétricos encontrados na literatura

AUTOR	FOTOSENSIBILIZADOR	λ (nm)	DENS. DE ENERGIA (J/cm ²)	P (mW)	TEMPO	SPOT	Nº SESSÕES
Ramalho et al., 2015	Azul de metileno 0,005%	660	120	100	2 min/ponto	sem espec	1
Marotti et al., 2009	Azul de metileno 0,01%	660	120	100	2 min	0,4cm ²	1 aPDT + 3 LLLT*
Marotti et al., 2010	Azul de metileno 0,01%	660	120	100	28 seg	0,28cm ²	1 aPDT + 4 LLLT**

*1 sessão de aPDT + 3 sessões de laser de baixa intensidade após 24h, 72h e 1 semana com densidade de energia de 3,8Jcm²; potência de 15mW, com total de 0,6 J de energia. ** 1 sessão de aPDT + 4 sessões de laser de baixa intensidade após 24h, 72h e 7 dias após a aPDT.

A terapia fotodinâmica (aPDT) possui inúmeras vantagens sobre o tratamento antiviral tradicional de infecção mucocutânea por HVS, dentre elas: diminuição do tempo de remissão da lesão (Marotti et al. 2009; Marotti et al., 2010), eficácia tanto na fase de máculas, vesículas e úlceras, apresenta efeitos colaterais mínimos (quando existente) (Ramalho et al., 2015), diminuição de recorrência das lesões (Lotuffo *et al.*, 2019), baixo custo, fácil aplicação e sem danos aos tecidos adjacentes. (Shen *et al.*, 2020). Porém, a maioria desses achados foram evidenciados na literatura por relatos de casos (Marotti *et al.*, 2010; Ramalho *et al.*, 2015; Lotuffo *et al.*, 2019).

Recentemente foi publicado um ensaio clínico aleatorizado (Ramalho et al., 2020) dividindo os participantes em 3 grupos: controle (aciclovir), aPDT e

aPDT associado ao aciclovir, mostrando que a aPDT possui efeitos positivos em relação à diminuição do tamanho da lesão, edema e formigamento em um período de 24 horas após a terapia. Outro ensaio clínico (Ajmal,2021) também publicado recentemente demonstrou que houve diminuição significativa no grupo aPDT associado ao aciclovir em relação à dor, quantificação do HSV, e diminuição da IL-6 e TNF- α em pacientes adolescentes.

Uma revisão sistemática (Lotufo *et al*, 2019) sobre a eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento do herpes labial concluiu que a aPDT é um tratamento potencialmente eficaz e seguro para herpes labial recorrente. No entanto, devido a existência de poucos relatos de casos e a heterogeneidade entre os protocolos, foi recomendada a realização de ensaios clínicos randomizados bem delineados para comprovar a eficácia desta terapia no tratamento e prevenção do herpes labial recorrente. Tendo em vista a escassez de estudo clínicos sobre esse tema, objetivamos avaliar se a terapia fotodinâmica antimicrobiana é capaz diminuir o tempo de remissão das lesões herpéticas labiais e a sua recorrência, quando comparada ao tratamento convencional com aciclovir.

2. JUSTIFICATIVA

A herpes simples labial (HSL) é uma doença com alta recorrência, dolorosa e que causa desconforto estético, sendo necessário um tratamento que diminua o curso da doença assim como a sua recorrência. O uso contínuo do aciclovir não é livre de eventos adversos (Raborn *et al.*, 2003; Arduino *et al.*, 2008) e muitas vezes causa ressecamento ao redor da lesão. Além disso pacientes reclamam de desconforto no uso dessas pomadas por causa do aspecto e do gosto ruim. A aPDT tem mostrado bons resultados no tratamento destas lesões, encurtando o tempo de doença e prevenindo recorrências da HSL, sem induzir resistência viral (Marotti *et al.*, 2010; Chi *et al.*, 2015; Ramalho *et al.*, 2015; Lotufo *et al.*, 2019). Porém, até o momento, a maioria dos trabalhos que apontam essas evidências são relatos de caso (Marotti *et al.*, 2009; Marotti *et al.*, 2010; Osiecka *et al.*, 2017; Ramalho *et al.*, 2015). Portanto se faz necessário um estudo comparativo de tratamentos que possuam um delineamento mais robusto, como um ensaio clínico randomizado controlado, para avaliar a eficácia da aPDT no tratamento de infecções mucocutâneas herpética (HSL), em relação ao tratamento convencional.

3. HIPÓTESE EXPERIMENTAL:

- A aPDT reduz o tempo de remissão da lesão de herpes simples comparado ao grupo controle (ACV) em participantes sem comorbidades.

4. OBJETIVOS:

4.1 Objetivo Primário:

- Avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana quanto ao tempo de resolução da lesão de herpes simples comparado ao grupo Aciclovir em participantes sem comorbidades.

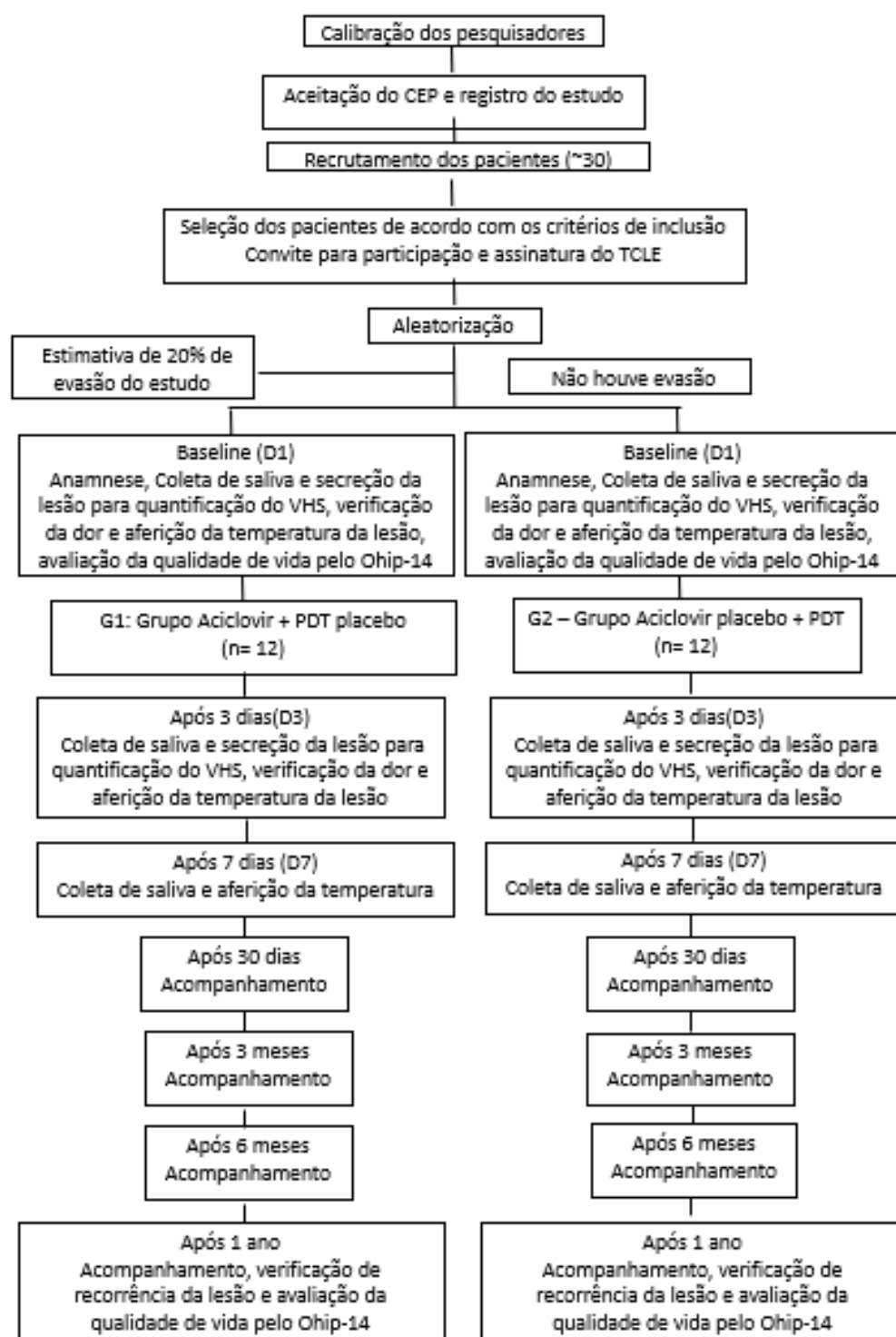
4.2 Objetivos secundários:

- Comparar os tratamentos em relação à dor por meio de uma escala visual analógica (EVA)
- Comparar os tratamentos em relação à temperatura no local da lesão por HSL
- Acompanhamento das recorrências no período de 1 ano com aPDT
- Quantificar HSV-1 após tratamento com aPDT por meio de qPCR nas lesões e na saliva
- Avaliar a percepção de qualidade de vida dos portadores de HSL

5. MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um ensaio clínico único-centro randomizado, duplo-cego controlado e prospectivo com acompanhamento de 12 meses está de acordo com os critérios para delineamento de um estudo clínico CONSORT *Statement*. O projeto foi registrado no *clinicaltrials.gov*, NCT 04037475 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (CAEE 18447819.7.0000.5511 e número do processo 3.566.238). Após explicação verbal e por escrito do estudo, os participantes que aceitaram participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Assentimento (TA) para menores de 12-18 anos. Os indivíduos foram convidados após aprovação do projeto no Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho a comparecer na Clínica Odontológica da Universidade Nove de Julho – UNINOVE da cidade de São Paulo, Brasil, e no consultório particular da pesquisadora Andreia La Selva, também situado na cidade de São Paulo, Brasil, no período de agosto de 2019 a setembro de 2021 para tratamento com aPDT e avaliações. O desenho experimental consistiu em 2 grupos. A amostra foi composta por indivíduos sem comorbidades que estavam com lesão de herpes na fase de vesícula ou de crosta recente. Foi avaliado o tempo total para remissão da lesão, quantificação do vírus no local da lesão e na saliva. Foi avaliada a dor (nos dias 1 (D1), 3 (D3)), temperatura (nos dias 1 (D1), 3 (D3) e 7 (D7)) e recorrência da lesão em um follow-up de 1 ano. Também foi aplicado questionário *Ohip-14* para avaliar o impacto na qualidade de vida relacionada à saúde oral. Os indivíduos tiveram retornos agendados em 3 dias (D3) e 7 dias (D7). Foi realizado o acompanhamento através de contato telefônico e via WhatsApp após 30 dias, 6 meses, e 1 ano para reavaliação. Todas as vezes que houve recorrência da lesão, os mesmos notificaram e foi anotado no diagrama labial por sextante (recorrência no mesmo local- foi anotado no diagrama labial por sextante (Figura 6) (ANEXO 5).

Figura 5: Fluxograma do estudo



5.1 Cálculo do tamanho da amostra:

A amostra foi calculada usando erro padrão tipo 1 de 0.2 e nível de confiança de 95% conforme indicado na literatura (NIHR; Lancaster *et al.*, 2004; Browne *et al.*, 1995; Sim *et al.*, 2012; Julious *et al.*, 2005). O cálculo é consistente com testes de equivalência em modelos não paramétricos de sobrevivência (Kaplan e Meier, 1958). A função de sobrevivência, num dado instante t , pode ser estimada a partir de tempos de sobrevida observados, em relação à proporção de indivíduos que sobreviveram para além do instante t . No nosso caso, o tempo t é definido como a data do tratamento, e a sobrevivência é estimada em dias até a recuperação do paciente. Com base na metodologia de análise de sobrevivência, calculou-se amostra de 24 participantes ($n=12$ por grupo). A estimação de diferenças entre grupos será feita com base no estimador de Kaplan-Meier ou estimador de produto limite.

5.2 Calibração e treinamento dos avaliadores

Para calibração houve apenas um examinador que realizou 5 avaliações de dor com a escala analógica visual, os quais não fizeram parte do estudo. Foram feitas 2 avaliações por participante (com intervalo de 30 min entre elas) para verificar a concordância intra-examinador. O coeficiente de correlação intraclassa (ICC) foi calculado em 0,90 em relação a medida de avaliação da dor (ANEXO). A avaliação foi realizada com régua milimetrada de 0-10 cm e esse pesquisador não estava envolvido no tratamento dos indivíduos.

Esse mesmo examinador foi treinado para todas as avaliações que não permitem mensurações quantitativas e qualitativas como por exemplo: coletas de secreção e de saliva. Esses procedimentos são importantes para maximizar a reprodutibilidade das avaliações.

5.3 Descrição da amostra

A amostra foi composta por indivíduos sem comorbidades de 15 a 60 anos que estavam com lesão de herpes na fase de vesículas e úlceras.

5.4 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos indivíduos

- Com lesão de herpes na fase de vesículas ou úlceras.
- Idade de 15 a 60 anos
- De ambos os gêneros
- Sem comorbidades sistêmicas (ASA-I)

Foram excluídos indivíduos:

- Que estavam com infecção de herpes no estágio de descamação seca
- Participantes em uso contínuo de anti-inflamatório não esteroide ou terapia com corticosteroides (Gómez C *et al.*, 2018) há menos de 1 semana
- Tabagistas
- Gestantes e ou lactantes
- Participantes que estavam em uso de antivirais tópicos ou sistêmicos

5.5 Aleatorização

Para distribuir aleatoriamente os participantes nos grupos experimentais, foi realizado um sorteio com 30 números por meio do site *randomize.com*. A distribuição dos grupos foi idêntica (1:1) para os dois grupos. A distribuição foi realizada de forma blocada (5 grupos de 6 indivíduos). Envelopes opacos foram identificados com números sequenciais (1 a 30) e no seu interior havia a informação do grupo experimental correspondente conforme a ordem obtida no sorteio. Os envelopes foram selados e permaneceram lacrados em ordem numérica até o momento dos tratamentos das lesões. O sorteio e a preparação dos envelopes foram realizados por uma pessoa não envolvida no estudo.

Imediatamente antes do tratamento das lesões, o pesquisador responsável pelo tratamento abriu 1 envelope (sem alterar a sequência numérica) e realizou o procedimento indicado. Seriam incluídos 20% de indivíduos a mais em cada grupo em vista *de evasão* prevista em todo estudo clínico, mas, não houve necessidade, pois não houve evasão.

5.6 Cegamento do estudo

Apenas o pesquisador responsável pela realização dos tratamentos (que abriu os envelopes da aleatorização), soube qual tratamento atribuído a cada participante. A identificação de cada grupo foi revelada apenas após análise estatística dos dados para todos os envolvidos no estudo por este pesquisador. O participante também foi cego ao tipo de tratamento realizado, uma vez que o tratamento da lesão foi idêntico em ambos os grupos e o tratamento com a aPDT foi simulado no grupo controle. O aciclovir placebo foi utilizado no grupo experimental, portanto o participante não soube qual tratamento foi realizado.

5.7 Avaliações pré-tratamento

Os indivíduos assinaram o TCLE e o TA (ANEXOS 2 e 3), foi realizada a anamnese (ANEXO 1), e o questionário OHIP-14-14 (ANEXO 4) e a ficha de coleta de dados da pesquisa que mapeou a lesão e as perguntas referentes a lesão (ANEXO 5). Esses dados foram coletados por 1 pesquisador calibrado. Também foram realizadas coletas de saliva e secreção de HSV de todos os indivíduos para para quantificação do HSV Em seguida foi realizado o tratamento conforme a aleatorização.

5.8 Anamnese

Foi realizada a anamnese em ambos os grupos. Além das perguntas relacionadas à saúde geral do participante, foram coletados dados demográficos (idade, gênero, estado civil, ocupação, nível educacional, condições de vida, salário), dados da história médica (queixa principal, estado da doença atual,

história médica, história odontológica, medicamentos) e perguntado quando foi a primeira infecção e quantas infecções ocorreram no último ano

5.9 Desenho Experimental

Imediatamente antes do tratamento da lesão de herpes, o pesquisador responsável pelo tratamento retirou e abriu 1 envelope (sem alterar a sequência numérica dos demais envelopes) e realizou o procedimento indicado. Deste modo, os 24 indivíduos foram alocados nos grupos experimental e controle até o presente momento, da seguinte forma:

G1- Grupo Aciclovir (ACV) (n=12) – indivíduos receberam o tratamento convencional com aciclovir creme a 5% (Aciclovir Sanofi Medley® 50mg/g, bisnaga com 10g) e simulação de tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana (azul de metileno 0,995%+ simulação do uso do laser).

G2- Grupo aPDT (n=12) – indivíduos foram tratados com terapia fotodinâmica antimicrobiana e receberam um creme placebo simulando o creme aciclovir.

5.10 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Os indivíduos do Grupo 2 receberam a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – *Antimicrobial Photodynamic Therapy*), que associa um agente fotossensível a uma fonte de luz e oxigênio, com a finalidade de reduzir a carga microbiana em locais em que não há presença de vesícula.

Os procedimentos foram realizados conforme descrito:

- As lesões que estavam na fase de vesícula, foram rompidas com uma agulha estéril, previamente foi passado delicadamente um anestésico em gel (lidocaína 2%), o líquido extravasado foi limpo delicadamente com um papel absorvente tomando o cuidado para não contaminar as áreas adjacentes. Foi colocado gentilmente sobre as lesões a solução de azul de metileno na concentração de 0,005%, (Chimiolux®5, DMC, São Carlos, SP. Brasil) (Figura 6) com um tempo de pré irradiação de 1 minuto (Alvarenga, *et al.*, 2018).

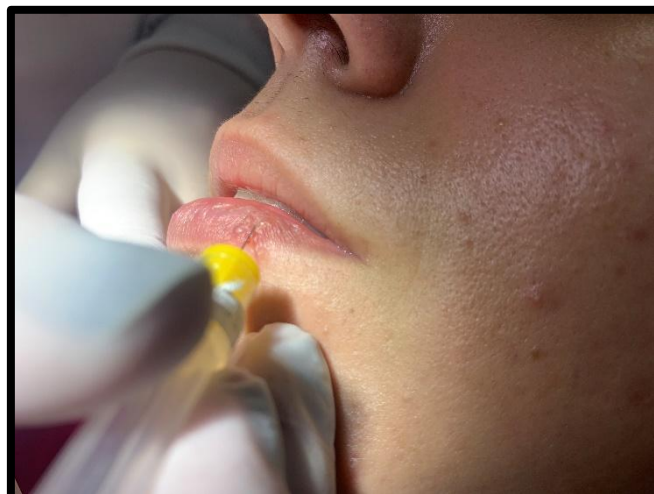


Figura 6: Perfuração das vesículas com agulha estéril

Fonte: a autora

- Aplicação de azul de metileno (0,05% - Chimiolux® 5, DMC - Água purificada e azul de metileno) embebido em algodão. (Figura 7)



Figura 7: Aplicação do azul de metileno

Fonte: a autora

- Foi realizada a irradiação com o diodo laser vermelho Laser Duo® (MMOptics, São Carlos, SP. Brazil), com comprimento de onda de 660nm, com uma potência de 100mW, densidade de energia de 300 J/cm², com energia de 3 J no centro da lesão durante 30 segundos. (Ramalho *et al.*, 2015). O cabeçote do laser foi posicionado em contato direto com a lesão de modo perpendicular. (Alvarenga *et al.*, 2018) (Figura 8)



Figura 8: Aplicação do laser perpendicular e em contato com a lesão

Fonte: A autora

- Lavou-se em abundância com solução salina (soro fisiológico) até a remoção total do fotossensibilizador.
- Durante a aplicação do laser ambos, participante e operador, utilizaram óculos de proteção. (Figura 9)
- Os indivíduos do grupo 2 utilizaram pomada placebo conforme descrito a seguir.

Os indivíduos do Grupo 1 (ACV-placebo da aPDT), receberam também o azul de metileno 0,005% sobre suas lesões, foi gravado o som do aparelho para mimetizar a aplicação do laser com o aparelho desligado.

Os procedimentos da aPDT placebo foram realizados na lesão conforme descrito:

- Aplicação do azul de metileno com algodão embebido pelo fotossensibilizador e colocado delicadamente sobre a lesão
- As irradiações foram realizadas com o mesmo aparelho posicionado da mesma forma e no mesmo tempo de aplicação, entretanto o laser foi desligado. O som do bip foi gravado e ligado durante a aplicação para cegar o tratamento para o participante.
- Foi aplicado exatamente da mesma forma descrita do Grupo 2
- Foi lavado em abundância com solução salina (soro fisiológico) até a remoção total do fotossensibilizador.

- Durante a simulação da aplicação do laser ambos, participante e operador, utilizaram óculos de proteção. (Figura 9)



Figura 9: Utilização dos óculos de proteção: pesquisador e participante

Fonte: a autora

Quadro 1. Parâmetros empregados na aPDT

Parâmetros dosimétricos	
Comprimento de onda [nm]	660
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência [mW]	100
Área do feixe [mm ²] *	3
Tempo de exposição [s]	30
Irradiância [W/cm ²]	33,3
Exposição radiante [J/cm ²] **	120
Energia radiante [J]**	3
Número de pontos irradiados	1 ponto por lesão
Locais de aplicação	1 ponto na porção central da lesão
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões e frequência	Sessão única
Fotosensibilizador	Azul de metileno (0,005%)

*<https://mmo.com.br/laser-duo/!#>

** Ramalho KM, *et al.* Treatment of herpes simplex labialis in macule and vesicle phases with photodynamic therapy. Report of two cases. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015 Jun;12(2):321-3.

5.11 Tratamento com Aciclovir

Após a simulação do tratamento com a aPDT, sendo utilizado o som do equipamento para simular o tratamento com laser, o participante (grupo ACV) recebeu uma bisnaga com aciclovir creme 5% (Aciclovir Sanofi Medley® 50mg/g,

bisnaga com 10g) e foi orientado a passar sobre as lesões quatro vezes ao dia, durante 7 dias, no qual foi o seu terceiro retorno para reavaliação. O mesmo participante foi reavaliado após 1 mês, 6 meses e um ano.

Nos indivíduos do grupo G2 (experimental) foi realizada a aPDT conforme descrito e passaram pelos mesmos procedimentos dos indivíduos do grupo G1, ou seja, receberam uma bisnaga com um creme placebo simulando o aciclovir e o mesmo foi orientado a passar o creme 4 vezes ao dia durante 7 dias. O indivíduo retornou para reavaliação após 3 e 7 dias e foi acompanhado após 1 mês, 6 meses e um ano para avaliação da recorrência.

Todo o tratamento proposto no grupo 1 (simulação de aPDT + entrega de aciclovir creme) em cada participante foi concluído em sessão única. O tratamento para o grupo 2 (aPDT + creme placebo) também foi concluído em sessão única. Todos possíveis efeitos adversos foram anotados e qualificados durante o protocolo de tratamento e período de manutenção (1 mês- 6 meses- 1 ano) por meio do questionário desenvolvido para este protocolo (ANEXO 5). Se ocorressem efeitos adversos, seriam relatados na seção de resultados do manuscrito e seriam discutidos. O Comitê de Ética em Pesquisa de Nove de Julho Universidade (UNINOVE) seria notificado de qualquer alteração.

5.12 Variáveis do estudo:

A variável de desfecho primária do estudo foi:

- Avaliação do tempo de resolução das lesões em dias (objetivo primário do estudo). Para isso foi realizado um acompanhamento de 15 dias para essa variável.

As variáveis de desfecho secundárias do estudo foram:

- Acompanhamento das recorrências da lesão por HSL nos períodos de *follow-up* em 1 mês , 6 meses , e 1 ano .
- Comparação da quantidade de HSV-1, entre os grupos, por meio de qPCR no baseline (D1), 3 (D3) e 7 (D7) nas lesões ativas.
- Verificação e comparação da presença de dor entre os grupos em portadores de HSL por meio de escala analógica visual HSL no baseline (D1), 3 (D3) e 7 (D7)
- Verificação da temperatura no local da lesão por HSL no baseline (D1), 3 (D3) e 7 (D7).

- Percepção de qualidade de vida dos portadores de HSL relacionada a saúde bucal (QVRS) que foi avaliada por meio do questionário *Ohip-14* no baseline (D1) e após um ano do tratamento.

5.12.1 Avaliação do tempo de resolução das lesões em dias

Os participantes foram acompanhados em 3 e 7 dias e a resolução da lesão foi acompanhada até a sua finalização. A finalização foi acompanhada por fotos e por contato via , e qualquer alteração foi anotada na ficha de acompanhamento (ANEXO 5).

5.12.2 Acompanhamento das recorrências da lesão por HSL

Os Indivíduos foram acompanhados nos períodos de baseline (D1), e 1 mês, 6 meses , e 1 ano . A finalização foi acompanhada por contato telefônico e via WhatsApp® (Facebook, Inc.) (Statista Portal,2018) e anotado em ficha clínica específica (ANEXO 1), para isso foi realizado um acompanhamento de 1 ano para essa variável. Foi registrada em todos os indivíduos a localização das lesões através de sextantes nos lábios (sextantes 1, 2 e 3 para superior da esquerda para direita e sextantes 4,5 e 6 da direita para esquerda, sendo o sextante 2 na região de filtro labial e sextante 5 o seu antagonista do lábio inferior. (Figura 10) (ANEXO 5) Após o período de 1 ano, foi respondido o questionário *Ohip-14*, para avaliar o impacto da saúde oral na perspectiva do paciente. (ANEXO 4)

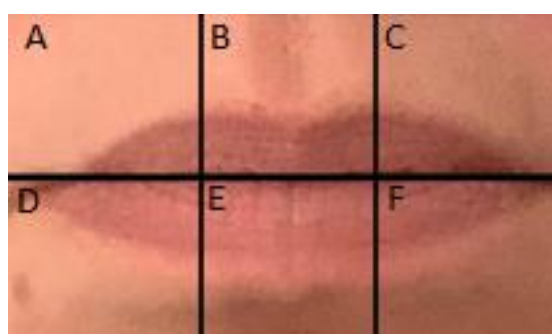


Figura 10 – Divisão dos lábios em sextantes

Fonte: a autora

5.12.3 Quantificação do HSV-1

Coleta da secreção das lesões de HSV - As amostras de secreção das lesões de HSV foram coletadas com em 1 sítio único na porção central da lesão

encostando delicadamente um swab estéril após tratamento de todas as vesículas, ou seja, após o rompimento das vesículas com uma agulha estéril e a região limpa delicadamente para não contaminar a região. Foram armazenadas em tubos estéreis de 1,5ml para microcentrifuga. Durante o período de coleta (na clínica) as amostras foram armazenadas em gelo. Essas amostras foram devidamente identificadas e foram armazenadas a -80°C (freezer do laboratório de Biofotônica da UNINOVE) até posterior análise. (Figura 11)



Figura 11: Coleta de HSV com swab estéril

Fonte: a autora

Coleta de saliva - As amostras de saliva não estimulada (2 ml) foram coletadas em tubos de 50 ml (Tubo Falcon), e os pacientes orientados a não encostar os lábios na boca do tubo. (Figura 12)

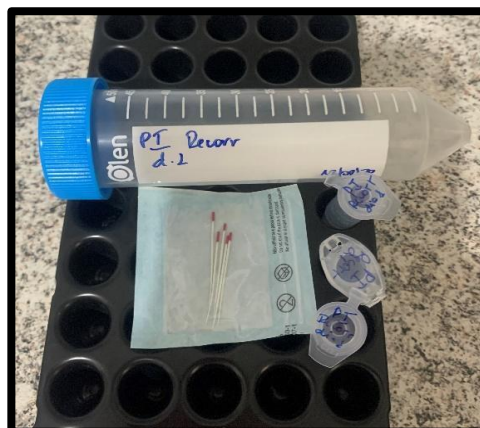


Figura 12: Material para coleta de saliva e vírus

Fonte: a autora

Extração de DNA- A extração de DNA foi realizada com Meta-G-Nome™ DNA Isolation - MGN0910 (Epicentre Technologies Corp, Chicago, IL, USA), conforme as instruções do fabricante. Para amostras de saliva e secreção de HVS foram transferidos 100 µl de amostra, previamente vortexada a 12857g (10.000 RPM), 4°C, durante 10 minutos para novos microtubos de centrifugação. O sobrenadante foi descartado, deixando 25 µl, junto ao precipitado. As amostras serão vortexadas para ressuspensão do *pellet*. Para cada amostra foi adicionada uma mistura de 2µl de proteinase K e 300 µl de TCL (*tissue and cells lysis*), colocadas em banho maria por 15 minutos e a cada 5 minutos serão vortexadas. Após o banho maria, as amostras foram colocadas no gelo durante 5 minutos. Foram adicionados 150 µl de MPC (*protein precipitation reagent*) e vortexados durante 5 segundos. Foi centrifugada por 10 minutos, 4°C a 12857g (10.000 RPM). O sobrenadante foi descartado, deixando somente o *pellet*. Foi adicionado 500 µl de isopropanol e as amostras serão vertidas 40 vezes. Então as amostras foram centrifugadas novamente durante 10 minutos, a 4°C a 2057g (4000 RPM), vertendo-se as amostras, removendo o isopropanol, deixando somente o *pellet*. Foi adicionado 200 µl de etanol a 70% e centrifugado por 2 minutos, 4°C e 2057g (4000 RPM). O etanol foi retirado e a última etapa repetida. Os tubos ficaram abertos, invertidos até secar, por volta de 30 minutos. Após a secagem, o *pellet* resultante foi eluído em TE. Após as extrações de DNA as amostras foram armazenadas em freezer -20°C e quantificadas por espectrofotômetro. (*Nanodrop ND1000 - Thermo Fisher Scientific Inc.*)

Antes da amplificação com PCR foi utilizado um conjunto de primers para HSVP1 / P2 que corresponde a um DNA sequenciando o herpes vírus de oito humanos descrito por Johnson et al, 2000 (Tabela 1). O primer HSVP1 / P2 amplifica os subtipos HSV-1, HSV-2, EBV, CMV. (Monjo *et al.*, 2018; Palmieri *et al.*, 2018)

PRIMER

HSV1	5'- GTGGTGGACTTTGCAGCCTGACCC-3'	JOHNSON,2000
	5'-ACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA3'	

Tabela 2: Sequência e referência do primer utilizado

5.12.4. Dor:

Foi avaliada por meio da aplicação da escala visual analógica (EVA) com uma linha de 100 mm, com os dois extremos fechados. Um dos extremos apresenta a indicação “0” e o outro “100” que significa respectivamente sem dor e dor insuportável. (Figura 13) As instruções sobre a marcação foram dadas ao participante sempre pelo mesmo operador. Cada participante foi orientado a marcar com um traço vertical o ponto que melhor corresponder à intensidade de dor no momento da avaliação. (Bottega *et al.*, 2010, Schalch *et al.*, 2019)

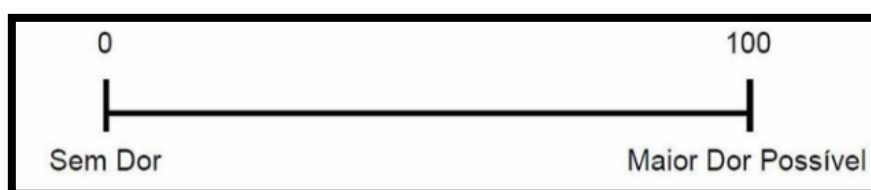


Figura 13: EVA- Escala Visual Analógica de Dor

Fonte: a autora

5.12.5 Temperatura:

A temperatura foi mensurada no local da lesão (em seu ponto central). A medida local foi aferida utilizando termômetro digital da marca Safety 1st®, (Safety 1st®, “No Touch Forehead”, Columbus, USA) (Sampaio-Filho, 2018) (Figura 14)



Figura 14: Aferição da temperatura com termômetro digital

Fonte: a autora

5.12.6 Impacto da saúde bucal na percepção do paciente (Questionário Oral health impact profile - Ohip-14-14):

Este questionário é uma forma simplificada do questionário original Ohip-14-49, o Ohip-14-14 foi utilizado para a avaliação do impacto da saúde bucal na percepção dos participantes da pesquisa. O Ohip-14-14 é utilizado para mensurar necessidades percebidas. Ele mensura o impacto das alterações bucais na percepção de sua saúde bucal. O participante responde a 14 perguntas atribuindo às suas respostas os valores 0 (nunca), 1 (quase nunca), 2 (às vezes), 3 (na maioria das vezes) e 4 (sempre) (Quadro 2).

Quadro 2- Questões do OHIP-14-14

OHIP-14-14 - Avaliação da qualidade de vida relacionada a saúde bucal	
1.	Você teve problemas para falar alguma palavra?
2.	Você sentiu que o sabor dos alimentos tem piorado?
3.	Você sentiu dores em sua boca ou nos seus dentes?
4.	Você se sentiu incomodado (a) ao comer algum alimento?
5.	Você ficou preocupado (a)?
6.	Você se sentiu estressado (a)?
7.	Sua alimentação ficou prejudicada?
8.	Você teve que parar suas refeições?
9.	Você encontrou dificuldade para relaxar?
10.	Você se sentiu envergonhado?
11.	Você ficou irritado com outras pessoas?
12.	Você teve dificuldade para realizar suas atividades diárias?
13.	Você sentiu que a vida, em geral, ficou pior?
14.	Você ficou totalmente incapaz de fazer suas atividades diárias?

Pode ser analisado sob duas óticas:

- Método aditivo - Os pontos são somados (0-56), sendo 56 o maior impacto na qualidade de vida.
- Avaliação por domínios – O Ohip-14 possui um total de 7 domínios, que também podem ser pontuados de 0-4, sendo 4 o maior impacto. Para chegar no resultado, somam-se as duas questões de cada domínio e se divide por dois. O domínio 1 refere-se à limitação funcional, domínio 2 refere-se à dor

física, domínio 3 refere-se à limitação física, domínio 4 refere-se à desconforto psicológico, domínio 5 refere-se à incapacidade psicológica, domínio 6 refere-se à desconforto social, domínio 7 refere-se à incapacidade geral (Quadro 2).

Quadro 3 – Significado dos domínios do questionário Ohip-14-14.

Domínios	Significado
Domínio 1	limitação funcional
Domínio 2	dor física
Domínio 3	limitação física
Domínio 4	desconforto psicológico
Domínio 5	incapacidade psicológica
Domínio 6	desconforto social
Domínio 7	Incapacidade geral

Foi avaliado no primeiro atendimento, e após um ano. No método aditivo, quando o valor for maior que 1 poderá ser considerado a presença de impacto negativo na vida do indivíduo.

Todo acompanhamento do paciente até um ano foi realizado por meio de contato via WhatsApp ® (Facebook, Inc.) (Statista Portal,2018).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram apresentadas em tabelas contendo frequências absolutas e relativas. A associação com o grupo foi avaliada com o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher ou teste da razão de verossimilhança.

O teste de Shapiro-Wilks foi utilizado para avaliar se a distribuição das variáveis quantitativas era normal. As variáveis foram apresentadas com média e desvio padrão e comparadas com o teste t-Student. Variáveis sem distribuição normal foram apresentadas com mediana e intervalo interquartilico e comparadas com o teste de Mann-Whitney.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7. RESULTADOS

A idade média total foi de 36 ± 12 anos e as médias foram homogêneas entre os grupos ($p=0,634$)

A maioria dos pacientes era do sexo feminino 20 (83,3%), de etnia leucoderma 21 (87,5%), solteiros 15 (62,5%), renda familiar acima de 4 salários mínimos 13 (54,2%) e nível de escolaridade superior 20 (83,3%).

Não se observou associação entre sexo ($p=0,590$), etnia ($p=0,101$), estado civil ($p=1,000$), renda familiar ($p=0,619$), escolaridade ($p=0,382$) entre os grupos.

A idade no aparecimento da primeira lesão ocorreu em mediana e intervalo interquartilico (IIQ) de [9 (5 - 15) vs. 13 (5 - 15) anos, $p=0,588$], respectivamente nos grupos aPDT e ACV. O tempo entre recorrências, anterior ao tratamento atual era de mediana [4 (2 - 6) vs. 6 (3 - 12) meses, $p=0,145$], respectivamente nos grupos tratamento e controle.

Tabela 3. Variáveis demográficas e da lesão segundo os grupos avaliados

Variável	Grupo		P
	aPDT n=12	ACV n=12	
Idade	35 \pm 13	37 \pm 11	0,634 ^a
Cor da pele			0,101 ^b
Leucoderma	9 (75%)	12 (100%)	
Melanoderma	2 (17%)	0 (0%)	
Xantoderma	1 (8%)	0 (0%)	
Estado civil			1.000 ^c
Solteiro	8 (67%)	7 (58%)	
Casado	4 (33%)	5 (42%)	
Renda			0,640 ^c
Até 3 salários mínimos	4 (33%)	2 (17%)	
Mais de 3 salários mínimos	8 (67%)	10 (83%)	
Escolaridade			0,590 ^c
<9 anos	3 (25%)	1 (8%)	
>9 anos	9 (75%)	11 (92%)	
1ª aparecimento da lesão			1,000 ^c
Antes dos 18 anos	9 (75%)	9 (75%)	
Depois dos 18 anos	3 (25%)	3 (25%)	
frequência de recorrência no baseline (antes de randomizar)			0,102 ^d

Menor que 6 meses	8 (67%)	4 (33%)	0,032 ^b
Maior que 6 meses	4 (33%)	8 (67%)	
Fase da lesão			
Prodrômica	0 (0%)	1 (8%)	
Vesícula	9 (75%)	3 (25%)	
Úlcera	3 (25%)	8 (67%)	

a: teste t-Student; b: teste da razão de verossimilhança; c: teste exato de Fisher; d: teste qui-quadrado.

Não há diferença entre os grupos em relação às variáveis basais, exceto pela distribuição de fase de lesão, o grupo ACV apresenta percentual maior de úlcera (P=0,032).

A proporção de recorrência 1 ano após tratamento é semelhante nos dois grupos (P=0,317) bem como o tempo para remissão (P=0,718).

Tabela 4. Recorrência das lesões de herpes entre os grupos

Variável	Grupo		P
	aPDT	ACV	
	n=12	n=12	
Recorrência (1 ano após randomizar)			0,317 ^c
Não teve recorrência	8 (67%)	11 (92%)	
Teve recorrência	4 (33%)	1 (8%)	
Remissão em dias	9 (9 - 10)	9 (8 - 11)	0,718 ^e

c: teste exato de Fisher; e: teste de Mann-Whitney.

Os valores de dor são maiores no grupo aPDT em relação ao grupo ACV no momento D1 (P=0,039). Não se observou diferença de dor no momento D3 (P=0,195) bem como entre os momentos D1 e D3, como observado na tabela 5 e no gráfico 1.

Tabela 5. Variável dor entre os grupos:

Variável	Grupo		P
	aPDT	ACV	
	n=12	n=12	
Dor			
D1	18 (10 - 56)	7 (0 - 17)	0,039 ^e
D3	3 (0 - 35)	0 (0 - 10)	0,195 ^e
P (D1xD3) ^f	0,248	0,373	

DOR		0,518 ^b
Diminuiu	8 (67%)	7 (58%)
Aumentou	3 (25%)	2 (17%)
Não alterou	1 (8%)	3 (25%)

b: teste da razão de verossimilhança; e: teste de Mann-Whitney; f: teste dos sinais de Wilcoxon.

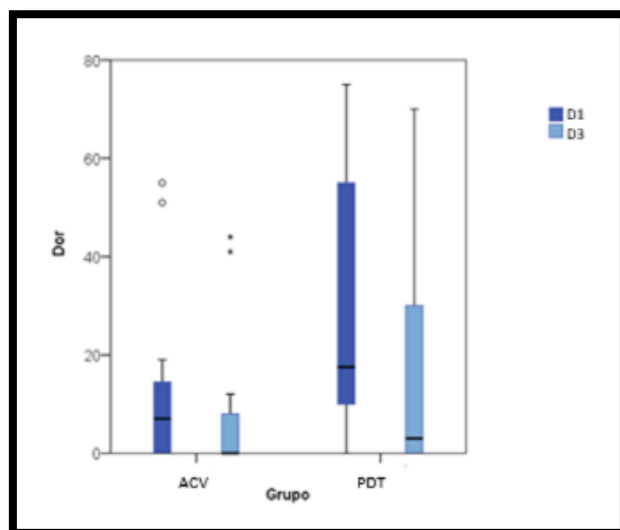


Gráfico 1: Dor entre os grupos no Dia 1 e no dia 3

Não houve diferença entre os grupos em relação à temperatura (tabela 6 e Gráfico 2)

Tabela 6: Temperatura nos dias 1, 3 e 7:

Variável	Grupo		P
	aPDT	ACV	
	n=12	n=12	
Temperatura ≥ 37,5°C			
D1	4 (33%)	3 (25%)	1.000 ^c
D3	3 (25%)	0 (0%)	0.217 ^c
D7	0 (0%)	0 (0%)	-
Temperatura do dia D0 para o dia D3			0.640 ^c
Diminuiu	8 (67%)	10 (83%)	
Aumentou	4 (33%)	2 (17%)	
Temperatura(°C)			
D1	37 (37 - 38)	37 (37 - 38)	0.954 ^e
D3	37 (37 - 37)	37 (37 - 37)	0.450 ^e
D7	37 (37 - 37)	37 (36 - 37)	0.953 ^e

P (D1xD7) ^f	0,051	0,060
c: teste exato de Fisher; e: teste de Mann-Whitney; f: teste dos sinais de Wilcoxon		

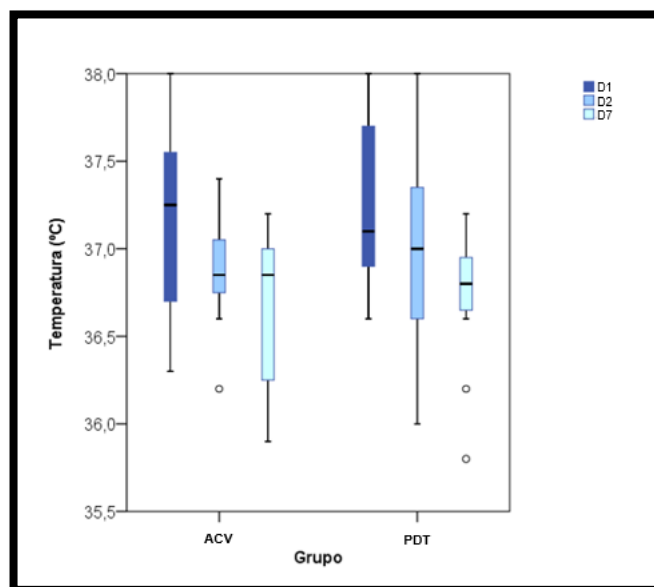


Gráfico 2: Temperatura entre os grupos nos dias D1, D2 e D7

A proporção de qPCR HSV-1>0 é semelhante nos dois grupos em D1 (P=1,000) e em D3 (P=1,000). Valores de qPCR HSV-1 são maiores no grupo ACV em D1 (P=0,001) e em D3 (P=0,036) em relação ao grupo aPDT. Valores de qPCR HSV-1 aumentam em D3 para ambos os grupos (P=0,018 e 0,017, respectivamente para os grupos aPDT e ACV) (Tabela 7 e Gráfico 3)

Tabela 7: Proporção de qPCR HSV-1 nas lesões nos grupos nos dias D1 e D3:

Variável	Grupo		P
	aPDT n=12	ACV n=12	
qPCR HSV-1>0			
D1	9 (75%)	10 (83%)	1,000 ^c
D3	8 (67%)	8 (67%)	1,000 ^c
qPCR HSV-1			
D1	17 (15 - 18)	21 (20 - 28)	0,001 ^e
D3	22 (20 - 29)	30 (27 - 32)	0,036 ^e
P (D1xD7) ^f	0,018	0,017	

c: teste exato de Fisher; e: teste de Mann-Whitney; f: teste dos sinais de Wilcoxon.

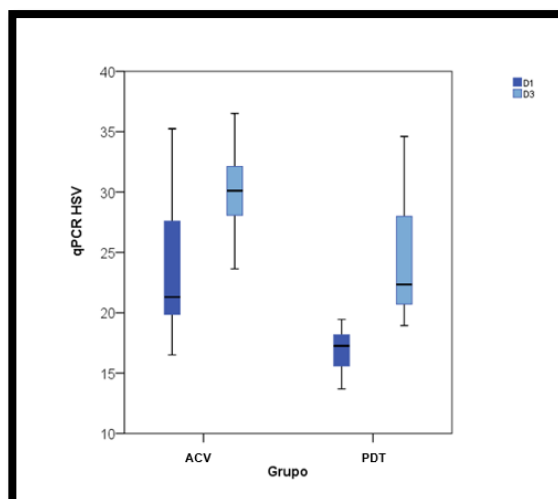


Gráfico 3: q-PCR nas lesões nos grupos nos dias D1 e D3

A proporção de Cp/mL >0 é semelhante nos dois grupos em D1 ($P=1,000$) e em D3 ($P=1,000$). Valores de Cp/mL são menores no grupo controle em D1 ($P=0,001$) e em D3 ($P=1,000$) em relação ao grupo tratamento. Valores de qPCR HSV-1 diminuem em D3 para ambos os grupos ($P=0,018$ e $0,036$, respectivamente para os grupos aPDT e ACV), conforme tabela 8 e gráfico 4.

Tabela 8: Proporção de cópias/ml entre os grupos:

Variável	Grupo		P
	aPDT n=12	ACV n=12	
Cp/mL>0			
D1	9 (75%)	10 (83%)	1,000 ^c
D3	8 (67%)	8 (67%)	1,000 ^c
Cp/mL			
D1	3344576125 (1680548475 - 20875322639)	271685864 (1622179 - 717743815)	0,001 ^e
D3	109584834 (2139265 – semelhantes 343368677)	369804 (71801 - 3313656)	1,000 ^e
P (D1xD3) ^f	0,018	0,036	

c: teste exato de Fisher; e: teste de Mann-Whitney; f: teste dos sinais de Wilcoxon.

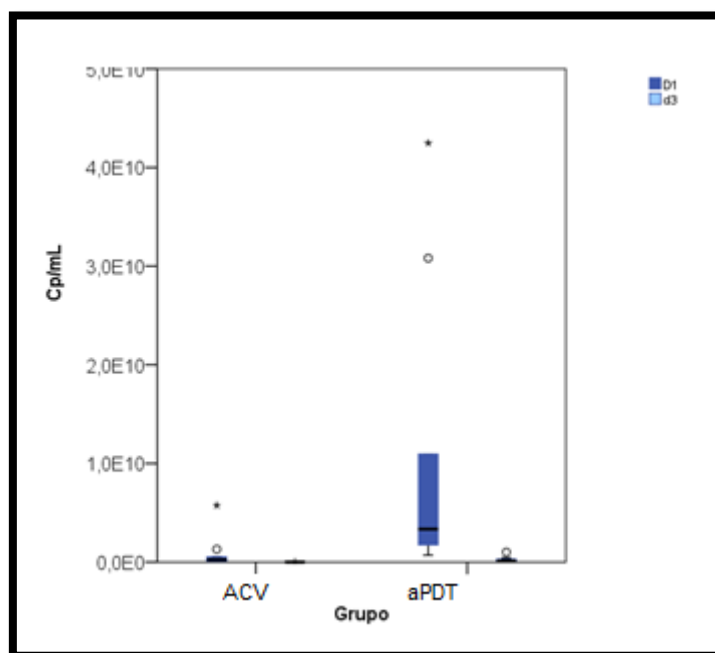


Gráfico 4: Cópias por mL nos grupos ACV e aPDT

A proporção de qPCR HSV-1 (SALIVA 1)>0 é semelhante nos dois grupos em D1 ($P=0,217$) e em D3 ($P=1,000$). Valores de qPCR HSV-1 (SALIVA 1) são semelhantes em D1 ($P=0,065$). O grupo ACV apresenta valores maiores de qPCR HSV-1 (SALIVA 1) em D3 ($P=0,043$) em relação ao grupo aPDT. Valores de qPCR HSV-1 (SALIVA 1) aumentam em D3 para o grupo ACV ($P=0,018$), conforme tabela 9 e gráfico 5.

Tabela 9: Proporção de q-PCR na saliva entre os grupos nos dias 1 e 3:

Variável	Grupo		P
	aPDT	ACV	
	n=12	n=12	
qPCR HSV-1 (SALIVA 1)>0			
D1	12 (100%)	9 (75%)	0,217 ^c
D3	9 (75%)	8 (67%)	1,000 ^c
qPCR HSV-1 (SALIVA)			
D1	30 (24 - 33)	23 (22 - 28)	0,065 ^e
D3	27 (24 - 32)	32 (31 - 33)	0,043 ^e
P (D1xD3) ^f	0,859	0,018	

c: teste exato de Fisher; e: teste de Mann-Whitney; f: teste dos sinais de Wilcoxon.

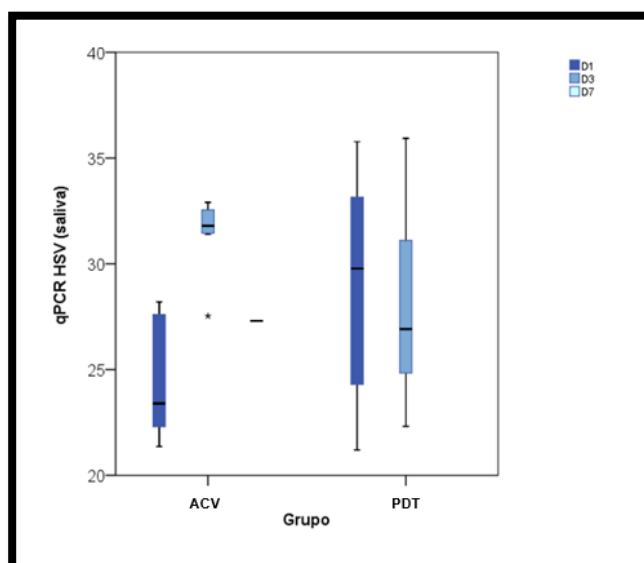


Gráfico 5: q-PCR na saliva nos grupos nos dias D1, D3 e D7

Os valores de *Ohip-14* são semelhantes nos grupos tratamento e controle tanto nos domínios como na somatória. Em D1 e em 1 ano, conforme tabela 10 e gráfico 6.

Tabela 10: Resultado do Ohip-14 (domínios e somatória) no D1 e após 1 ano:

Variável	Grupo		P
	aPDT n=12	ACV n=12	
DOM1			
D1	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,654
1 ano	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0,389
DOM2			
D1	1 (0 - 2)	1 (0 - 1)	0,535
1 ano	1 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0,397
DOM3			
D1	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0,951
1 ano	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0,665
DOM4			
D1	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,514
1 ano	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,952
DOM5			
D1	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0,567
1 ano	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0,476
DOM6			
D1	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0,820
1 ano	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,148

DOM7

D1	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,909
----	-----------	-----------	-------

1 ano	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,952
-------	-----------	-----------	-------

OHIP-14 SOMATORIA

D1	4 (1 - 11)	3 (0 - 10)	0,641
----	------------	------------	-------

1 ano	3 (0 - 9)	4 (0 - 5)	0,634
-------	-----------	-----------	-------

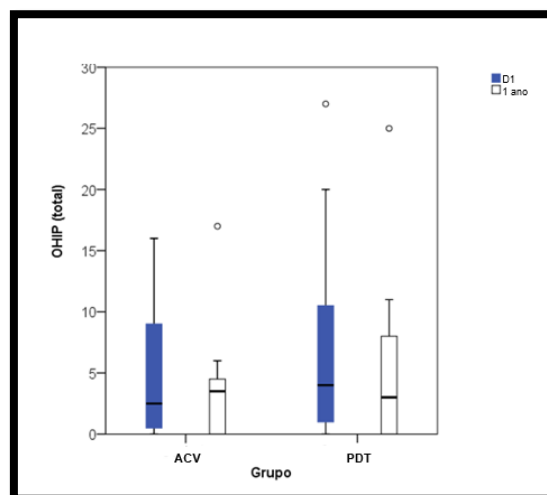


Gráfico 6: Ohip-14 no D1 e após 1 ano

8. DISCUSSÃO

Com a realização deste trabalho pudemos verificar que o tratamento com a aPDT não tem diferença em relação ao tempo de remissão da lesão quando comparado ao grupo aciclovir. Quanto aos outros desfechos analisados (dor, temperatura, recorrências das lesões, impacto da saúde oral na qualidade de vida e quantificação do HSV nas lesões não houve diferença entre os grupos analisados. Porém na saliva do grupo ACV houve um aumento da quantidade de vírus no terceiro dia após o tratamento, já no grupo aPDT houve redução, mostrando diferença entre os grupos. Ainda são necessários mais ensaios clínicos com outros parâmetros para se estabelecer um protocolo efetivo e eficaz.

A herpes simples labial recorrente é uma doença infecto contagiosa, causada pelo vírus do herpes simples tipo 1, caracterizada por lesões que se iniciam com prurido, vermelhidão (características da fase prodrômica), seguindo para vesículas que se coalescem e se rompem formando úlceras, geralmente dolorosas, causando desconforto e comprometimento estético (Spruance *et al*, 1977; Harmenberg, *et al*, 2010; Cernik *et al*, 2008). Geralmente são recorrentes tendo como fator etiológico exposição ao sol, ciclo menstrual, episódios de estresse, baixa imunidade e trauma (Smetana *et al*, 1997; Crumpacker *et al*, 2004; Fatahzadeh e Schwartz, 2007). O tratamento padrão ouro para essas lesões é o ACV, porém existem estudos que indicam que essa medicação pode causar resistência e não previne a recorrência. (Arduíno *et al*, 2008; Raborn *et al*, 2003; Spruance *et al*, 1992) A aPDT é uma alternativa para o tratamento dessas lesões, já que é seletiva, não causa efeitos colaterais e interações medicamentosas. (Marotti *et al*, 2010)

Al Maweri *et al*, 2018 e Chayavichitsilp *et al*, 2009 afirmam que a herpes simples labial apresenta uma alta prevalência em indivíduos de menor renda, porém, no presente estudo, foi observado que a maioria dos participantes possuía ensino superior completo. A amostra recrutada, foi proveniente de cartazes no *Instagram* e *Facebook* e da demanda de 1 consultório particular, o que talvez explique esses resultados. Chayavichitsilp *et al*, 2009, afirmou que o HSV-1 acomete mais o sexo feminino, corroborando com o presente estudo.

Os parâmetros dosimétricos utilizados neste estudo foram: comprimento de onda 660nm, com densidade de energia de 120J/cm², potência de 100mW, energia de 3 J, área do feixe 3mm², baseados nos relatos de Marotti *et al.*,2010, a técnica de aplicação foi em contato no centro da lesão e realizado tratamento em única sessão. Lago *et al.*,2016 também utilizou os mesmos parâmetros dosimétricos, mas entregou uma energia total de 12J divididas em 4 pontos diferentes da lesão. Marotti *et al.*,2009 utilizou como parâmetros o mesmo comprimento de onda com densidade de energia de 120J/cm², potência de 40mW, e energia de 0,56J, entregue em 4 pontos diferentes. De Araujo *et al.*,2020 também usou o mesmo comprimento de onda, potência de 100mW com entrega de energia de 4 J por ponto, um central e outros 3 ao redor da lesão. Todos os estudos, exceto o presente, utilizaram terapia de fotobiomodulação após a realização da aPDT com o intuito de acelerar o processo de reparação tecidual. Em nosso estudo, procuramos fazer um protocolo com poucas visitas ao consultório, que vem de encontro ao período de pandemia em que o estudo foi realizado

Em nosso estudo, foi utilizado azul de metileno a 0,005% como fotossensibilizador, um minuto de pré-irradiação conforme Alvarenga *et al.*,2015. Ramalho *et al.*,2015 utilizou o mesmo fotossensibilizador, com 5 minutos de pré-irradiação, assim como no seu ensaio clínico (Ramalho *et al.*,2020). Ajmal,2021 usou também na mesma concentração, porém não mencionou o tempo de pré-irradiação. Foi utilizado o azul de metileno na concentração de 0,01% com uma pré-irradiação de 5 minutos nos estudos de Marotti *et al.*,2009 e Marotti *et al.*,2010. Lago *et al.*,2016 usou essa mesma concentração, com 3 minutos de pré-irradiação. De Araujo *et al.*,2020 utilizou o azul de metileno a 0,01% com pré-irradiação de 5 minutos, sendo reaplicada a solução a cada 30 segundos. Outros fotossensibilizadores utilizados em outros estudos, como por exemplo o ALA (ácido 5-aminolevulinico) utilizado por Osiecka *et al.*,2017, que utilizou na concentração de 20% com 2% dimetilsulfóxido. Smetana *et al.*,1997 utilizou este mesmo fotossensibilizador associado a 2% de EDTA. A eleição do azul de metileno para a realização da aPDT na maioria dos estudos se deu pela facilidade de manuseio desse fotossensibilizador, já que o ALA necessita de um tempo de pré-irradiação maior (de 4 a 5 horas), além da ferida necessitar ficar ocluída durante esse tempo. (Osiecka *et al.*,2017)

Alguns pacientes procuraram o tratamento com sintomatologia prodrômica. Esses sintomas podem ocorrer aproximadamente 6 horas antes de aparecer o primeiro sinal (Esmann *et al.*, 2001), e quando o paciente chegava para o atendimento, já apresentava a lesão na fase de vesículas. Estas foram rompidas com uma agulha estéril, assim como em todos os estudos, o líquido era removido delicadamente com uma gaze estéril, assim como no presente estudo.

Da mesma forma, a aPDT permite interromper a replicação do vírus aumentando a atividade da resposta imune do hospedeiro segundo Donnarumma *et al.*, 2010. Além disso, os níveis diminuídos da proteína VP-16 após o uso de aPDT sugerem que essa terapia possa ser uma fonte potente para diminuir a infectividade viral. (Donnarumma *et al.*, 2010) Para coleta de vírus na lesão para quantificação por meio de RT-qPCR, foi utilizado um swab estéril acondicionado em um microtubo de centrifugação de 1,5 ml estéril, estocado a -80°C para posterior análise. Ajmal, 2021 também utilizou a mesma metodologia, porém o swab foi acondicionado em 500 µl de Tris-EDTA no microtubo e estocado a -80°C para posterior análise. Em nosso estudo não houve diferença para essa variável. Entretanto no estudo de Ajmal, 2021 houve diferença no grupo tratado com ACV associado à aPDT.

Em nosso estudo, não houve diferença para a variável de desfecho dor. Para mensuração da dor, foi utilizada uma escala visual analógica de dor (EVA). Ajmal, 2021 também utilizou a EVA como no presente estudo, encontrando diferença no grupo tratado com ACV associado à aPDT. Este mesmo autor, realizou um questionário relacionado à dor (*McGill Pain Questionnaire*) em que os indivíduos participantes foram solicitados a rotular sua dor seguindo a escala de cinco pontos do MPQ, que variava de "leve" a "pior dor possível". Ramalho *et al.*, 2020 utilizou uma escala de dor subjetiva, com parâmetros de cura, como formigamento e edema, que foram relatados pelos pacientes diariamente, considerando uma escala de 0 (nenhum), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (grave) e também não encontrou diferença em relação a essa variável nos grupos tratados.

Em nenhum estudo foi avaliada a temperatura entre os tempos de acompanhamento até a remissão da lesão. No presente estudo, o intuito de estudar esse desfecho foi verificar se a inativação viral poderia estar associada

à sua diminuição (Donnarumma *et al.*,2010). Além disso, temos o efeito fotobiomodulador da luz, que já é sabido, diminui o edema e a dor. (De Carvalho *et al.*,2009) Entretanto no presente estudo, não houve diferença para essa variável.

Na hipótese testada neste estudo esperávamos que os pacientes tratados com a aPDT teriam um menor tempo de resolução de suas lesões (9 dias) comparado ao padrão ouro, que apresenta um tratamento mais longo (a utilização do fármaco 4 vezes ao dia durante 7 dias), se comparado à aPDT. Alguns autores (Lago *et al.*,2016 e De Araujo *et al.*,2020) obtiveram tempo de resolução de 10 dias em seus relatos clínicos. Ramalho *et al.*,2020 também não observou diferença entre os grupos em relação ao tempo de remissão da lesão, somente no dia 1 após o tratamento. Também observou que as lesões haviam diminuído significativamente de tamanho no grupo tratado com ACV+aPDT, assim como edema e formigamento.

Em nosso estudo, o acompanhamento do paciente foi realizado até um ano a partir do tratamento, sendo o paciente contactado após 30 dias, 3 meses, 6 meses e um ano. Por meio do aplicativo WhatsApp® (Facebook, Inc.) (Statista Portal,2018), não foram necessárias visitas ao consultório. Com a adesão cada vez maior da telemedicina, a comunicação do paciente foi facilitada. Tnato para os desfechos de recorrência quanto do questionário Ohip-14 após os 12 meses. Antes mesmo da pandemia foram realizados alguns estudos utilizando esse aplicativo (Sartori *et al.*,2020, Tang *et al.*, 2018). Sartori *et al.*,2020, realizou um ensaio clínico randomizado e concluiu que os aplicativos podem ajudar o paciente na adesão ao tratamento. São úteis para monitoramento e coleta de informações do paciente, segundo Tang *et al.*, 2018. Tivemos 4 recorrências no grupo aPDT e uma no grupo ACV no período de um ano. Os relatos na literatura mostram que os pacientes não possuem recorrência em períodos de 6 meses (Marotti *et al.*,2009; Ajmal,2021) e 8 meses (De Araujo *et al.*,2020).

Era esperado que a dor nos tempos baseline (D1) e dia 3 (D3) tivesse diminuído, principalmente no dia 3(D3) no grupo em que foi realizada a aPDT, como resultado do tratamento da fototerapia. (Carvalho *et al.*,2009) Não houve diferença para esse desfecho no presente estudo, assim como no ensaio clínico de Ramalho *et al.*,2020. Os resultados em relação à dor de Marotti *et al.*,2009 e Marotti *et al.*,2010 são positivos para aPDT, porém são relatos de casos isolados,

relatando o caso de apenas um paciente. Ajmar,2021 apresentou em seu ensaio clínico diferença da dor no grupo ACV + aPDT. No presente estudo, não se cogitou em usar o ACV associado à aPDT devido à resistência viral que este fármaco apresenta. (Arduino *et al.*, 2008, Monjo *et al.*,2018, Miller *et al.*, 2005, Frobert *et al.*, 2014). Nossa intenção foi verificar se apenas aPDT isoladamente poderia ter resultados promissores.

Assim como a dor, era esperado que a temperatura (que são sintomas e sinais ligados no processo inflamatório) das lesões nos tempos baseline (D1), dia 3 (D3) e dia 7 (D7) tivesse diferença em relação à diminuição da mesma no grupo que foi realizada a aPDT, como resultado do tratamento da fototerapia (Carvalho *et al.*,2009), porém não obtivemos diferença para essa variável.

Em relação à diminuição da quantidade de vírus na saliva e nas lesões dos pacientes nos tempos baseline (D1), dia 3 (D3) esperava-se diminuição no grupo dos pacientes que foram tratados com a aPDT. Ajmar,2021 em seu ensaio clínico teve diminuição do vírus na saliva no grupo ACV+aPDT. Em nosso estudo não houve diminuição na quantificação dos vírus na saliva, mas um aumento no tempo D3 no grupo ACV. Este resultado foi muito interessante, já que a saliva é um dos meios de transmissão do vírus. (Arduino *et al.*,2008)

Em relação ao impacto na qualidade de vida relacionada à saúde oral, no qual aplicamos em nosso estudo por meio do questionário *Ohip-14*, não houve diferença entre os grupos. Esse questionário foi aplicado para mensurarmos o impacto da saúde bucal na qualidade de vida do indivíduo. Storrer *et al.*,2021 o aplicou e constatou que bruxismo e respiração oral foram fatores associados à recorrência de lesões herpéticas em atletas brasileiros. Ramalho *et al.*,2020 aplicou um questionário com medidas subjetivas para variáveis como dor, formigamento e edema, em uma escala de 0 a 3, sendo 0 nenhum, 1 leve, 2 moderado e 3 severo, sem encontrar diferença. Esperávamos que, com a utilização do *Ohip-14*, encontraríamos algum impacto, na expectativa da ação da fotobiomodulação no alívio dos sintomas das lesões herpéticas. Lorette *et al.*,2006 utilizou SF-36 para avaliar a prevalência de herpes em participantes franceses, encontrando impacto na qualidade de vida em participantes com 6 ou mais episódios de herpes por ano. Provavelmente não tenha havido diferença após os tratamentos aplicados em nosso estudo pois a maioria dos pacientes

não tinha mais de 6 episódios por ano. Já no baseline, esse problema de saúde já não impactava na qualidade de vida dos pacientes.

Apesar de termos calculado a amostra para um estudo de superioridade, não obtivemos resultados significantes para o desfecho primário do estudo. Talvez estudos futuros possam ser desenhados para não inferioridade com outros centros envolvidos. Algumas dificuldades como pacientes chegarem com as vesículas já irrompidas em um pequeno intervalo de tempo, a utilização de máscaras nesse período de pandemia, a rapidez em que uma lesão prodrômica se transforma em vesícula/úlceras devem ser consideradas.

Como limitações, temos que considerar a utilização de anestésico em gel (lidocaína 2%) previamente ao rompimento das vesículas, como solicitado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Acreditamos que pode ter atrapalhado o efeito dos tratamentos. Outra limitação importante foi não ter realizado FBM na fase de crosta da lesão. Talvez tivesse ajudado a diminuir o tempo de remissão das lesões. Uma grande dificuldade encontrada durante o estudo, foi a resistência em comparecer ao tratamento nos locais indicados (universidade e consultório), alegando não se sentirem seguros em sair durante o período de pandemia.

Recentemente foi publicada uma revisão sistemática por Khalil *et* Hamadah, 2022, que concluíram que a aPDT na fase vesicular associada a fotobiomodulação na fase de crosta apresenta uma solução promissora para o tratamento do herpes simples labial, necessitando de mais ensaios clínicos para estabelecer um protocolo eficaz. Próximos estudos deveriam aumentar a exposição radiante aplicada, testar outras concentrações de fotossensibilizador, e utilizar maior tempo de pré irradiação.

9.CONCLUSÃO:

- Conclui-se que o tratamento com a aPDT não tem diferença em relação ao tempo de remissão da lesão.
- Em relação à dor e temperatura, concluímos que a aPDT não apresenta diferença em relação ao tratamento convencional.
- Conclui-se que na aPDT não ocorre inativação viral no local tratado, visto que houve recorrências das lesões em ambos os grupos.
- Concluímos também que não há diferença sobre o impacto da saúde oral na qualidade de vida entre os grupos.
- Conclui-se que não há diferença na quantificação do HSV nas lesões, porém na saliva do grupo ACV houve um aumento da quantidade de vírus no terceiro dia após o tratamento.
- Ainda são necessários mais ensaios clínicos com outros parâmetros para se estabelecer um protocolo efetivo e eficaz.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Alvarenga LH, Ribeiro MS, Kato IT, Núñez SC, Prates RA. Evaluation of red light scattering in gingival tissue - in vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Sep;23:32-34. doi: 10.1016/j.pdaPDT.2018.05.016. Epub 2018 May 26. PMID: 29807147.
2. Amir J. Clinical aspects and antiviral therapy in primary herpetic gingivostomatitis. *Paediatr Drugs.* 2001;3(8):593-7. doi: 10.2165/00128072-200103080-00004. PMID: 11577924.
3. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008 Feb;37(2):107-21. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00586.x. PMID: 18197856.
4. Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2015 Aug 31;16(9):20523-59. doi: 10.3390/ijms160920523. PMID: 26334268; PMCID: PMC4613217.
5. Bello-Silva MS, de Freitas PM, Aranha AC, Lage-Marques JL, Simões A, de Paula Eduardo C. Low- and high-intensity lasers in the treatment of herpes simplex virus 1 infection. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):135-9. doi: 10.1089/pho.2008.2458. PMID: 19712025.
6. Bottega NA, Silversides CK, Oechslin EN, Dissanayake K, Harrison JL, Provost Y, Harris L. Stenosis of the superior limb of the systemic venous baffle following a Mustard procedure: an under-recognized problem. *Int J Cardiol.* 2012 Jan 12;154(1):32-7. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.08.064. Epub 2010 Oct 8. PMID: 20934761.
7. Browne RH. On the use of a pilot sample for sample size determination. *Stat Med.* 1995 Sep 15;14(17):1933-40. doi: 10.1002/sim.4780141709. PMID: 8532986.
8. Cernik C, Gallina K, Brodell RT. The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. *Arch Intern Med.* 2008 Jun 9;168(11):1137-44. doi: 10.1001/archinte.168.11.1137. PMID: 18541820.

9. Chi CC, Wang SH, Delamere FM, Wojnarowska F, Peters MC, Kanjirath PP. Interventions for prevention of herpes simplex labialis (cold sores on the lips). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Aug 7;2015(8):CD010095. doi: 10.1002/14651858.CD010095.pub2. PMID: 26252373; PMCID: PMC6461191.
10. Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (1). *N Engl J Med*. 1986 Mar 13;314(11):686-91. doi: 10.1056/NEJM198603133141105. PMID: 3005858.
11. Crumacker CS. Use of antiviral drugs to prevent herpesvirus transmission. *N Engl J Med*. 2004 Jan 1;350(1):67-8. doi: 10.1056/NEJMe038189. PMID: 14702430.
12. de Paula Eduardo C, Aranha AC, Simões A, Bello-Silva MS, Ramalho KM, Esteves-Oliveira M, de Freitas PM, Marotti J, Tunér J. Laser treatment of recurrent herpes labialis: a literature review. *Lasers Med Sci*. 2014 Jul;29(4):1517-29. doi: 10.1007/s10103-013-1311-8. Epub 2013 Apr 13. PMID: 23584730.
13. de Paula Eduardo C, Aranha AC, Simões A, Bello-Silva MS, Ramalho KM, Esteves-Oliveira M, de Freitas PM, Marotti J, Tunér J. Laser treatment of recurrent herpes labialis: a literature review. *Lasers Med Sci*. 2014 Jul;29(4):1517-29. doi: 10.1007/s10103-013-1311-8. Epub 2013 Apr 13. PMID: 23584730.
14. Donnarumma G, De Gregorio V, Fusco A, Farina E, Baroni A, Esposito V, Contaldo M, Petruzzi M, Pannone G, Serpico R. Inhibition of HSV-1 replication by laser diode-irradiation: possible mechanism of action. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010 Oct-Dec;23(4):1167-76. doi: 10.1177/039463201002300420. PMID: 21244765.
15. Esmann J. The many challenges of facial herpes simplex virus infection. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Feb;47 Suppl D3:17-27. doi: 10.1093/jac/47.suppl_1.17. PMID: 11160032.
16. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2007 Nov;57(5):737-63; quiz 764-6. doi: 10.1016/j.jaad.2007.06.027. PMID: 17939933.

17. Fernandes KPS; Ferrari RAM; França CM. Biofotônica: Conceitos e Aplicações. São Paulo, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, 2017
18. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno JS, Nave V, Boutolleau D, Michallet M, Lina B, Morfin F. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res.* 2014 Nov;111:36-41. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.08.013. Epub 2014 Sep 8. PMID: 25218782.
19. Glenny AM, Fernandez Mauleffinch LM, Pavitt S, Walsh T. Interventions for the prevention and treatment of herpes simplex virus in patients being treated for cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Jan 21;(1):CD006706. doi: 10.1002/14651858.CD006706.pub2. PMID: 19160295.
20. Gómez C, Abellán R, Palma JC. Efficacy of photodynamic therapy vs ultrasonic scaler for preventing gingival inflammation and white spot lesions during orthodontic treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Dec;24:377-383. doi: 10.1016/j.pdaPDT.2018.11.001. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30399455.
21. Grünewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W, Steven AC. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science.* 2003 Nov 21;302(5649):1396-8. doi: 10.1126/science.1090284. PMID: 14631040.
22. Harmenberg J, Oberg B, Spruance S. Prevention of ulcerative lesions by episodic treatment of recurrent herpes labialis: A literature review. *Acta Derm Venereol.* 2010 Mar;90(2):122-30. doi: 10.2340/00015555-0806. PMID: 20169294.
23. James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KM, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, Looker KJ. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.* 2020 May 1;98(5):315-329. doi: 10.2471/BLT.19.237149. Epub 2020 Mar 25. PMID: 32514197; PMCID: PMC7265941.
24. Jautová J, Zelenková H, Drotarová K, Nejdková A, Grünwaldová B, Hladíková M. Lip creams with propolis special extract GH 2002 0.5% versus ACV 5.0% for herpes labialis (vesicular stage) : Randomized, controlled double-blind study. *Wien Med Wochenschr.* 2019 May;169(7-

- 8):193-201. doi: 10.1007/s10354-018-0667-6. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30406509; PMCID: PMC6497618.
25. Jiang YC, Feng H, Lin YC, Guo XR. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int J Oral Sci.* 2016 Mar 30;8(1):1-6. doi: 10.1038/ijos.2016.3. PMID: 27025259; PMCID: PMC4822185.
 26. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep;38(9):3274-9. doi: 10.1128/JCM.38.9.3274-3279.2000. PMID: 10970370; PMCID: PMC87373.
 27. Julious SA. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods by Robert G. Newcombe, *Statistics in Medicine* 1998; 17:857-872. *Stat Med.* 2005 Nov 15;24(21):3383-4. doi: 10.1002/sim.2164. PMID: 16206245.
 28. Khalil M, Hamadah O. Association of Photodynamic Therapy and Photobiomodulation As a Promising Treatment of Herpes Labialis: A Systematic Review. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2022 May;40(5):299-307. doi: 10.1089/photob.2021.0186. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35483089.
 29. Lancaster GA, Dodd S, Williamson PR. Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *J Eval Clin Pract.* 2004 May;10(2):307-12. doi: 10.1111/j. 2002.384.doc.x. PMID: 15189396.
 30. Lotufo MA, Tempestini Horliana ACR, Santana T, de Queiroz AC, Gomes AO, Motta LJ, Ferrari RAM, Dos Santos Fernandes KP, Bussadori SK. "Efficacy of photodynamic therapy on the treatment of herpes labialis: A systematic review". *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Mar; 29:101536. doi: 10.1016/j.pdaPDT.2019.08.018. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31648056.
 31. Lorette G, Crochard A, Mimaud V, Wolkenstein P, Stalder JF, El Hasnaoui A. A survey on the prevalence of orofacial herpes in France: the INSTANT Study. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Aug;55(2):225-32. doi: 10.1016/j.jaad.2005.10.014. Epub 2006 Jun 13. PMID: 16844503.
 32. Löwhagen GB, Bonde E, Eriksson B, Nordin P, Tunbäck P, Krantz I. Self-reported herpes labialis in a Swedish population. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(9):664-7. doi: 10.1080/00365540210147732. PMID: 12374357.

- Marotti J, Aranha AC, Eduardo Cde P, Ribeiro MS. Photodynamic therapy can be effective as a treatment for herpes simplex labialis. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):357-63. doi: 10.1089/pho.2008.2268. PMID: 19382840.
33. Marotti J, Sperandio FF, Fregnani ER, Aranha AC, de Freitas PM, Eduardo Cde P. High-intensity laser and photodynamic therapy as a treatment for recurrent herpes labialis. *Photomed Laser Surg.* 2010 Jun;28(3):439-44. doi: 10.1089/pho.2009.2522. PMID: 19821702.
34. Marques Filho JS, Gobara J Jr, da Silva Salomao GV, Sumita LM, Shibli JA, Viana RG, Schwartz Filho HO, Pannuti CS, Braz-Silva PH, Pallos D. Cytokine Levels and Human Herpesviruses in Saliva from Clinical Periodontal Healthy Subjects with Peri-Implantitis: A Case-Control Study. *Mediators Inflamm.* 2018 Aug 6;2018:6020625. doi: 10.1155/2018/6020625. PMID: 30158834; PMCID: PMC6109554.
35. Miller CS, Avdiushko SA, Kryscio RJ, Danaher RJ, Jacob RJ. Effect of prophylactic valacyclovir on the presence of human herpesvirus DNA in saliva of healthy individuals after dental treatment. *J Clin Microbiol.* 2005 May;43(5):2173-80. doi: 10.1128/JCM.43.5.2173-2180.2005. PMID: 15872238; PMCID: PMC1153765.
36. Monjo AL, Pringle ES, Thornbury M, Duguay BA, Monro SMA, Hetu M, Knight D, Cameron CG, McFarland SA, McCormick C. Photodynamic Inactivation of Herpes Simplex Viruses. *Viruses.* 2018 Sep 29;10(10):532. doi: 10.3390/v10100532. PMID: 30274257; PMCID: PMC6213367.
37. Mogensen TH, Melchjorsen J, Malmgaard L, Casola A, Paludan SR. Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2004 Jun;78(11):5883-90. doi: 10.1128/JVI.78.11.5883-5890.2004. PMID: 15140986; PMCID: PMC415838.
38. NIHR. Feasibility and pilot studies, in NIHR NETSCC glossary. www.netscc.ac.uk/glossary/#glos6 de acordo com o que a estatística mandou
39. NIHR. Research for Patient Benefit (RfPB) programme: guidance information for applicants (competition number 22).

<http://www.ccf.nihr.ac.uk/RfPB/Documents/RfPB%20-%20Guidance%20for%20Applicants%20Competition%2022.pdf>

40. Osiecka BJ, Nockowski P, Kwiatkowski S, Szepietowski JC. Photodynamic Therapy with Red Light and 5-Aminolaevulinic Acid for Herpes Simplex Recurrence: Preliminary Results. *Acta Derm Venereol*. 2017 Nov 15;97(10):1239-1240. doi: 10.2340/00015555-2744. PMID: 28681068.
41. Palmieri M, Ornaghi M, Martins VAO, Correa L, Brandao TB, Ribeiro ACDP, Sumita LM, Tozetto-Mendoza TR, Pannuti CS, Braz-Silva PH. Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy for head and neck squamous cell carcinoma is not affected by xerostomia. *J Oral Microbiol*. 2018 May 28;10(1):1476643. doi: 10.1080/20002297.2018.1476643. Erratum in: *J Oral Microbiol*. 2021 Mar 29;12(1):1890442. PMID: 29868164; PMCID: PMC5974707.
42. Raborn GW, Grace MG. Recurrent herpes simplex labialis: selected therapeutic options. *J Can Dent Assoc*. 2003 Sep;69(8):498-503. PMID: 12954137.
43. Ramalho KM, Rocha RG, Correa-Aranha AC, Cunha SR, Simões A, Campos L, Eduardo Cde P. Treatment of herpes simplex labialis in macule and vesicle phases with photodynamic therapy. Report of two cases. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Jun;12(2):321-3. doi: 10.1016/j.pdaPDT.2015.02.005. Epub 2015 Mar 10. PMID: 25770054.
44. Ramalho KM, Cunha SR, Gonçalves F, Escudeiro GS, Steiner-Oliveira C, Horliana ACRT, Eduardo CP. Photodynamic therapy and Acyclovir in the treatment of recurrent herpes labialis: A controlled randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Mar;33:102093. doi: 10.1016/j.pdaPDT.2020.102093. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33212267.
45. Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000 Oct;28(5):390-8. doi: 10.1034/j.1600-0528.2000.028005390.x. PMID: 11014516.
46. Sartori AC, Rodrigues Lucena TF, Lopes CT, Picinin Bernuci M, Yamaguchi MU. Educational Intervention Using *WhatsApp* on

- Medication Adherence in Hypertension and Diabetes Patients: A Randomized Clinical Trial. *Telemed J E Health*. 2020 Dec;26(12):1526-1532. doi: 10.1089/tmj.2019.0305. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32155382.
47. Schalch TO, Palmieri M, Longo PL, Braz-Silva PH, Tortamano IP, Michel-Crosato E, Mayer MPA, Jorge WA, Bussadori SK, Pavani C, Negreiros RM, Horliana ACRT. Evaluation of photodynamic therapy in pericoronitis: Protocol of randomized, controlled, double-blind study. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Apr;98(17):e15312. doi: 10.1097/MD.00000000000015312. PMID: 31027098; PMCID: PMC6831272.
 48. Shen X, Dong L, He X, Zhao C, Zhang W, Li X, Lu Y. Treatment of infected wounds with methylene blue photodynamic therapy: An effective and safe treatment method. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Dec; 32:102051. doi: 10.1016/j.pdaPDT.2020.102051. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33059110.
 49. Singh N, Tscharke DC. Herpes Simplex Virus Latency Is Noisier the Closer We Look. *J Virol*. 2020 Jan 31;94(4):e01701-19. doi: 10.1128/JVI.01701-19. PMID: 31776275; PMCID: PMC6997768.
 50. Smetana Z, Malik Z, Orenstein A, Mendelson E, Ben-Hur E. Treatment of viral infections with 5-aminolevulinic acid and light. *Lasers Surg Med*. 1997;21(4):351-8. doi: 10.1002/(sici)1096-9101(1997)21:4<351::aid-lsm6>3.0.co;2-p. PMID: 9328982.
 51. Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol*. 2004 May;6(5):401-10. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x. PMID: 15056211.
 52. Spruance SL, Overall JC Jr, Kern ER, Krueger GG, Pliam V, Miller W. The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. *N Engl J Med*. 1977 Jul 14;297(2):69-75. doi: 10.1056/NEJM197707142970201. PMID: 194157.
 53. Statista Portal. WhatsApp—Statistics & facts | statista. WhatsApp Stat Facts 2018; 1
 54. Storrer CLM, Costa EE, Scariot R, Pivetta Petinati MF, Winckler C, Deliberador TM, Küchler EC, Brancher JA. Bruxism and type of breathing as factors associated with oral herpes lesion in Brazilian para-

- athletes. *Spec Care Dentist*. 2021 Nov;41(6):700-706. doi: 10.1111/scd.12616. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34131935.
55. Tang YH, Chong MC, Chua YP, Chui PL, Tang LY, Rahmat N. The effect of mobile messaging apps on cardiac patient knowledge of coronary artery disease risk factors and adherence to a healthy lifestyle. *J Clin Nurs*. 2018 Dec;27(23-24):4311-4320. doi: 10.1111/jocn.14538. Epub 2018 Jul 30. PMID: 29777560.
 56. Van Vloten WA, Swart RN, Pot F. Topical acyclovir therapy in patients with recurrent orofacial herpes simplex infections. *J Antimicrob Chemother*. 1983 Sep;12 Suppl B:89-93. doi: 10.1093/jac/12.suppl_b.89. PMID: 6355055.
 57. Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Transfus Med Rev*. 2002 Jan;16(1):61-6. doi: 10.1053/tmrv.2002.29405. PMID: 11788930.
 58. Wainwright M, Antczak J, Baca M, Loughran C, Meegan K. Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains. *J Photochem Photobiol B*. 2015 Sep; 150:38-43. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.12.017. Epub 2014 Dec 27. PMID: 25596655.
 59. Wald A., Johnston C. (2021) Treatment and prevention of herpes simplex virus type 1 in immunocompromised adolescents and adults. In oct 2021 from site <https://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prevention-of-herpes-simplex-virus-type-1-in-immunocompetent-adolescents-and-adults>
 60. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 2001 May 12;357(9267):1513-8. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04638-9. PMID: 11377626.
 61. Woo SB, Challacombe SJ. Management of recurrent oral herpes simplex infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Mar;103 Suppl:S12.e1-18. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.11.004. PMID: 17379150.

Anexo 1. Anamnese



ID:

Tratamento de herpes simples labial com terapia fotodinâmica: estudo controlado, prospectivo, aleatorizado e duplo-cego

ANAMNESE:

Nome: _____ RG _____
Data de nascimento ____/____/____ Natural _____
Profissão/ocupação: _____ Etnia: () Leucod. () Melan. () outros: Gênero: () M () F Estado Civil: () Casado () Solt () Outros: _____
Renda familiar em salário(s) mínimo(s): () 1-2 () 3-4 () 5 ou mais
Nível de escolaridade: Fundamental () Médio () Superior () Completo () incompleto ()
Condições de vida: casa própria () alugada () outros () _____ quantidade de quartos () Carro particular () transporte público ()
Endereço: _____
Bairro: _____ Cidade: _____ Telefone: _____
Queixa principal: _____
História da doença atual: _____
Faz uso de algum medicamento: Qual (ou quais)? _____

História médica:

Possui alguma doença? _____
Toma algum medicamento? Qual? _____
Teve doenças da infância? Quais _____
Tem ou teve algum tipo de alergia? Qual? _____
Quando teve a primeira lesão: _____
Passou por stress ou alguma situação que acha importante relatar: _____
Frequência das lesões: _____
HÁBITOS/ HABITOS NOCIVOS:
TABAGISMO: Sim () qt/dia ____ Não () Parou há quanto tempo?
Alimentação _____

Eu _____ RG _____,
declaro para todos os fins legais, que as informações sobre o meu estado de saúde são verdadeiras e que nada omiti no questionário realizado. Concordo também em participar do projeto de pesquisa "**Tratamento de herpes simples labial com terapia fotodinâmica: estudo controlado, prospectivo, aleatorizado e duplo-cego**", sabendo que farei apenas o tratamento das lesões de herpes labial e, se necessário, serei encaminhado para outros tratamentos odontológicos, como por exemplo, tratamentos de prótese e/ou canal.

Assinatura _____ Data ____/____/____

Anexo 2. TCLE



ID:

TCLE - Termo de Consentimento livre e esclarecido para Participação em Pesquisa

Clínica:

Nome do participante: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____

E-mail: _____

1. Título do Trabalho Experimental: Tratamento de herpes labial por meio de um tratamento que utiliza um corante junto com o laser: estudo com acompanhamento, que tem avaliação periódica durante um tempo, dividido em dois grupos: onde em um será feito o tratamento comum com pomada e uma imitação(placebo) do laser e outro com a imitação da pomada(placebo) e o laser, onde o participante não sabe qual grupo ele faz parte e nem o pesquisador que irá fazer os exames laboratoriais. (“ **Tratamento de herpes simples labial através da terapia fotodinâmica: estudo controlado, prospectivo, aleatorizado e duplo cego**”)

2. Objetivo: O objetivo do nosso trabalho é saber se o uso do corante junto com o laser é melhor do que o uso da pomada de ACV (Zovirax), que é o tratamento padrão do herpes, se a dor diminui com o tratamento com o laser e se a ferida diminui em um menor tempo

3. Justificativa: Realizar um tratamento alternativo, de baixo custo, sem a utilização do uso da pomada, já que esse medicamento que é usado (ACV) pode apresentar resistência do vírus do herpes e espera-se que esse tratamento diminua a frequência do aparecimento das bolhinhas e feridas, que diminua a dor e que essas feridas se fechem em menos dias.

4. Procedimentos da Fase Experimental: Você está sendo convidado a participar de nossa pesquisa que consiste na realização de um exame onde você cuspirá em um pote sem encostar seus lábios uma quantidade de saliva de cerca de duas colheres das de sopa e será encostado delicadamente uma haste com ponta de algodão na ferida do herpes, sendo dessa forma

coletado o fluído da sua lesão para análise. Se ainda estiver na fase de pequenas bolhas, será passado um anestésico ao redor da lesão e elas serão furadas para liberar o líquido dentro delas antes de encostar a haste com ponta de algodão. Pode haver um pequeno sangramento e esse será controlado colocando uma gaze estéril cuidadosamente, porém se você quiser parar com o procedimento, pararemos imediatamente. Será aferida a temperatura da sua ferida com um termômetro à distância, sem encostar. Mostraremos a você uma escala de dor e você dará uma espécie de nota de 0 a 10 para a dor que você sente na ferida, sendo 0 nenhuma dor e 10 uma dor bem forte. Será colocado um corante azul, que ficará por cinco minutos, que é o líquido que interage com a luz laser para a ação da terapia. A luz laser será aplicada durante 1 minuto e meio e você deverá retornar após 3 dias e depois de uma semana do primeiro atendimento para a repetição desses exames. Depois você retornará após 1 mês, 3 meses, 6 meses e um ano para registrarmos se sua lesão de herpes apareceu novamente ou entrar em contato telefônico comigo.

5.Desconforto ou Riscos Esperados: O único desconforto que você possa ter é um pouco de dor durante a manipulação da área da lesão. Não há nenhum risco no tratamento, a não ser que você possa ter alergia ao corante, que é raro. Você também pode se sentir constrangido ao responder o questionário Ohip-14, mas será feita de forma reservada e seus dados preservados.

6. Medidas protetivas aos riscos: Você será atendido em um box, somente com a equipe que faz parte do estudo. Questionários são realizados também reservadamente. Se sua lesão estiver na fase de bolhinhas, será passado um anestésico ao redor da lesão, previamente à perfuração das bolhas para evitar desconforto durante a manipulação da lesão.

7. Benefícios da Pesquisa: Os benefícios dessa pesquisa está relacionado na utilização de uma terapia sem a utilização de remédios, que apresentam certa resistência ao vírus e estudos tem apontado que a utilização do laser como tratamento das lesões de herpes faz com que demore mais seu reaparecimento, bem como as feridas fecham em menos dias .

8. Métodos Alternativos Existentes: Utilização do creme ACV (nome comercial Zovirax) e, em casos mais severos, a associação dos comprimidos de ACV por via oral.

9. Retirada do Consentimento: Se você não tem interesse em participar na pesquisa ou decida desistir, você pode parar imediatamente o seu tratamento, deixando de fazer parte do estudo, sem nenhum prejuízo.

10. Garantia do Sigilo: Todos os dados coletados serão armazenados nos prontuários de cada participante, podendo ser conferidos a qualquer momento. Todos os resultados e dados decorrentes dessa pesquisa são exclusivamente para fins científicos e os pesquisadores manterão sigilo absoluto sobre todos os seus dados de pesquisa.

11. Local da Pesquisa: A pesquisa ocorrerá na Clínica de Odontologia da Escola de Odontologia da Universidade Nove de Julho, que se situa na Rua Vergueiro, 235/249 - Liberdade, São Paulo - SP, CEP 01504-001

14. O 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 e Res. CNS 510/2016). 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

14. Nome Completo e telefones do Pesquisador) para Contato: Dra Andreia La Selva - (011) 985858178 .

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

São Paulo, de de .

16. Consentimento Pós-Informação:

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.

Assinatura do Participante

(Todas as folhas devem ser rubricadas pelo participante da pesquisa)

17. Eu, Prof. Msc. Andreia La Selva Almeida (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;

Assinatura do Pesquisador Responsável

Anexo 3: Termo de Assentimento



ID:

TERMO DE ASSENTIMENTO

Gostaríamos de saber se você quer participar da pesquisa **“Tratamento de herpes simples labial com terapia fotodinâmica: estudo controlado, prospectivo, aleatorizado e duplo-cego”**

O adulto responsável por você notou que apareceram essas bolhinhas que se tornaram em uma ferida em seus lábios, então ele permitiu que você participe dessa pesquisa para diminuir o tempo que a ferida fique aí no seu lábio e que a dor também diminua. Gostaríamos de tratar esse problema para você. Nós iremos encostar delicadamente uma haste de algodão (estilo “cotonete”) sobre sua ferida e pedir para que você cuspa em um potinho uma quantidade equivalente a duas colheres das de sopa, sem encostar os lábios no pote. Aí iremos colocar um corante azul bem devagar sobre sua ferida, sem encostar, esperar um minuto e colocaremos uma luz laser vermelha sobre sua ferida. Isso não dói. Todo esse material que estamos explicando será mostrado a você antes de começarmos. Você pode sentir um desconforto enquanto passarmos a haste de algodão. Você vai responder um questionário quando acabarmos, você pode sentir um pouco de vergonha, mas as perguntas serão feitas em um local onde esteja somente eu e você e ninguém além de mim verá suas respostas. Será entregue também uma pomada para você e eu vou explicar como deverá ser usada.

Os adultos que são responsáveis por você deixaram você participar, mas se não quiser não tem problema, ninguém irá ficar bravo com você.

Talvez possa acontecer de você ficar com vergonha ou medo, ou ainda não gostar, mas não tem problema, é só falar que não quer mais participar.

Vamos nos encontrar algumas vezes: hoje, daqui 3 dias, daqui 7 dias, daqui 30 dias, daqui 3 meses, 6 meses e 1 ano, ou se aparecerem novamente as bolhinhas ou a ferida. Daqui 3 dias, será passada novamente a haste de algodão e você terá que cuspir no potinho novamente. Daqui 7 dias iremos ver se a sua ferida sumiu completamente e você cuspirá novamente no potinho. Nos demais dias, iremos acompanhar você. Daqui um ano iremos novamente pedir para você responder um questionário onde só eu saberei as respostas. Vamos usar as informações sobre você para um trabalho, para mostrarmos que isso pode ocorrer com frequência com outras pessoas, mas ninguém vai saber que essas informações são suas.

Vamos fazer algumas fotos para comparar o resultado do tratamento, mas estas fotos vão apenas ser vistas no trabalho, não vamos divulgar seu nome e seu rosto, apenas sua boca.

Todas as fotos ficarão guardadas comigo e o meu computador tem senha, apenas eu abrirei as fotos para ver a sua ferida. A foto será apenas da sua boca, não do seu rosto.

Abaixo um exemplo de como serão as suas fotos e como são as bolhas e feridas parecidas com as que você tem:

Lábio com ferida



Se tiver alguma dúvida ou pergunta, pode pedir para seus responsáveis ligar nesse número:

NOME DO PESQUISADOR: Dra. Andreia La Selva Almeida fone (11) 985858178 (também WhatsApp)

E-MAIL: dralaselva@gmail.com

() **SIM**, aceito participar, ouvi tudo o que o responsável leu e explicou, e sei que quando não quiser mais participar é só falar não, em qualquer momento. E recebi uma cópia deste papel.

() **NÃO**, não quero participar.

Assinatura do responsável legal

Anexo 4: Questionário OHIP-14-14

Responda as seguintes perguntas assinalando o quadrado que melhor se adequa com a sua situação:

Perguntas	Nunca	Quase nunca	Às vezes	Muitas vezes	Sempre
1. Você tem dificuldade para pronunciar algumas palavras ou falar devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
2. Você sente que seu paladar (sentido do gosto) piorou devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
3. Você tem sofrido dores na sua boca ou dentes?					
4. Você sente dificuldade para comer algum alimento devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
5. Você se sente inibido por causa de seus dentes, boca ou prótese dentária?					
6. Você tem se sentido tenso por causa de problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
7. Sua dieta tem sido insatisfatória devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
8. Você tem interrompido suas refeições devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
9. Você sente dificuldade em relaxar devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
10. Você tem se sentido embaraçado devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
11. Você tem se sentido irritado com outras pessoas devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
12. Você tem tido dificuldade de realizar seus trabalhos diários devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
13. Você tem sentido a vida menos satisfatória devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					
14. Você tem se sentido totalmente incapaz de suas obrigações devido a problemas com seus dentes, boca ou prótese dentária?					

Anexo 5: Ficha de acompanhamento

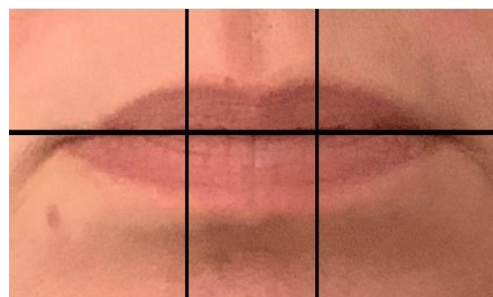


ID:

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DA LESÃO

Nome: _____

Localização da lesão: sextante(s) _____



	DATA	PROCEDIMENTO	observações
DIA 1		ANAMNESE +TCLE+OHIP-14	
		TEMPERATURA	
		CITOLOGIA ESFOLIATIVA	
		COLETA DE SALIVA	
		ESCALA DE DOR	
DIA 3		TEMPERATURA	
		CITOLOGIA ESFOLIATIVA	
		COLETA DE SALIVA	
		ESCALA DE DOR	
DIA 7		COLETA DE SALIVA	
		TEMPERATURA	
3 MESES			
6 MESES			
1 ANO		OHIP-14	

Anexo 6: Parecer Consubstanciado do CEP



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa:

Tratamento de herpes simples labial através da

Pesquisador: ALMEIDA

ANDREIA LA SELVA

Área Temática:

Versão: 18447819.7.00

CAAE: 00.5511

3

Instituição Proponente: NOVE DE JULHO

ASSOCIACAO EDUCACIONAL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

terapia fotodinâmica: estudo controlado, prospectivo,
aleatorizado e duplo cego

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.566.238

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do projeto, Objetivo da pesquisa, Avaliação dos riscos e benefícios foram retiradas do documento PB_informações_basicasdoprojeto_1362471.pdf de 02/09/2019.

Resumo:

As lesões de herpes labial são causadas pelo vírus do herpes simples tipo 1 (VHS-1), causando dor e comprometimento estético. Se caracteriza pela formação de pequenas vesículas que coalescem e se rompem formando úlceras extremamente doloridas, que evoluem para crostas, descamações secas até sua remissão completa. Atualmente o tratamento dessas lesões é feito com aciclovir. Apesar de diminuir a sintomatologia,

causa resistência viral e não previne a recorrência das lesões. Sabe-se que a terapia fotodinâmica (PDT) possui inúmeras vantagens entre elas a diminuição do tempo de remissão além disso, não causa resistência. No entanto, ainda há pouco nível de evidência por causa de escassez de estudos clínicos bem delineados sobre esse assunto. Portanto, o objetivo deste estudo será avaliar se a terapia fotodinâmica é capaz de diminuir o tempo de cicatrização dessas lesões e diminuir a sua recorrência. Os pacientes que se apresentarem com herpes na fase de úlcera e forem incluídos no estudo serão divididos aleatoriamente em dois grupos: G1- Grupo Laser- azul de metileno a

Endereço:
LIBERDADE
Bairro: CEP: UF: SP Município: 01.504-001
SAO PAULO

Telefone:
(11)3385-9010 **E-mail:** comitedeetica@uninove.br Página 01 de 07



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 3.566.238

0,005% irradiados com 660nm, 100mW (Laser Duo, MMOptics), 120J/cm², 3J por ponto. Aplicado na parte central da lesão, e 30 segundos de irradiação + placebo do aciclovir, G2- Grupo controle – será utilizado o aciclovir + simulação da PDT para cegamento do estudo. A variável principal do estudo será o tempo de resolução da lesão em dias. As variáveis secundárias serão avaliação da recorrência avaliada em meses, a dor avaliada por meio da escala analógica visual (EVA), temperatura local por meio de termômetro digital, e citocinas IL1, IL-6, TNF-, IL-10 provenientes da secreção da lesão e analisadas por Multiplex e Quantificação do vírus VHS-1 por meio de PCRq. Todas as avaliações serão realizadas no baseline e após 3 e 7 dias após a aplicação da PDT ou seu placebo. O questionário para avaliação do impacto do tratamento a laser na qualidade de vida será aplicado no baseline e após 7 dias para as variáveis secundárias. O follow up em longo prazo será realizado em 1 mês, 6 meses e um ano para a qualidade de vida e avaliação da recorrência. Os efeitos adversos serão registrados e relatados. Os dados serão avaliados pela comparação de dois grupos: grupo tratamento (tratamento convencional + laser) e grupo controle (tratamento convencional + simulação do laser). Caso os dados sejam normais, serão submetidos ao teste t de Student. Os dados serão apresentados por suas médias \pm dp e o valor de p será definido em 0,05. Espera-se que haja remissão total da doença em um menor intervalo de tempo e sem recorrências, principalmente no mesmo local onde foi realizado o tratamento.

Hipótese:

Hipótese nula: A aPDT não reduz o tempo total de remissão da lesão de HSL em pacientes jovens saudáveis
Hipótese experimental: A aPDT reduz o tempo total de remissão da lesão de HSL em pacientes jovens saudáveis

Metodologia Proposta:

Os pacientes serão convidados a comparecer na Clínica Odontológica da Universidade Nove de Julho – UNINOVE da cidade de São Paulo, Brasil, no período de agosto de 2019 a agosto de 2021 para tratamento com PDT e avaliações. O desenho experimental consistirá em 2 grupos. A amostra será composta por pacientes saudáveis que estejam com lesão de herpes na fase de vesícula ou de crosta. Será avaliado o tempo total para remissão da lesão, verificação de células balonizantes, quantificação do vírus no local da

lesão e na saliva. Serão coletadas amostras (secreção de VHS) no local da lesão e na saliva para a quantificação das citocinas inflamatórias. Será avaliada a dor, temperatura, recorrência da lesão em um follow-up de 1 ano. Também será aplicado questionário Ohip-14 para mensurar a qualidade de vida relacionada a saúde bucal. Os pacientes terão retornos

VERGUEIRO nº
235/249

Endereço:
LIBERDADE SAO PAULO
Bairro: CEP: UF: SP Município: 01.504-001

Telefone:
(11)3385-9010 **E-mail:** comitedeetica@uninove.br Página 02 de 07



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 3.566.238

agendados em 3 dias (T1), 7 dias (T2), 30 dias (T3), 6 meses (T4), e 1 ano (T5) para reavaliação.

Todas as vezes que houver recorrência da lesão serão convidados a comparecer a clínica para coletas e verificação do local da lesão (recorrência no mesmo local- será anotado no diagrama labial por sextante).

Critério de Inclusão:

A amostra será composta por pacientes saudáveis de 15 a 60 anos que estejam com lesão de herpes na fase na fase prodrômica, vesículas, úlceras e crostas. Serão incluídos pacientes de ambos os sexos, sem predileção de raça ou condição socioeconômica, saudáveis (história médica negativa).

Critério de Exclusão:

Serão excluídos pacientes que estejam com infecção de herpes no estágio de descamação seca. Participantes em uso contínuo de anti-inflamatório não esteroide e terapia contínua com corticosteroides há menos de 1 semana. Participantes diabéticos, tabagistas que necessitem de imunossupressores, gestantes e ou lactantes. HIV positivo, hepatite B ou C.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliação do tempo de resolução das lesões em dias com o tratamento com aPDT é menor que o grupo aciclovir

Objetivo Secundário:

- Verificar se a aPDT é capaz de diminuir a quantidade de células balonizantes por meio de citologia

esfoliativa

- Avaliar se a quantidade de VHS-1 diminui após tratamento com aPDT por meio de qPCR • Avaliar se o tratamento com aPDT é capaz de diminuir a quantidade de citocinas inflamatórias IL-6, IL-1, IL-8 e anti-inflamatória IL-10 nas lesões de HSL
- Avaliar se o tratamento com aPDT é capaz de diminuir a quantidade de citocinas inflamatórias IL-6, IL-1, IL-8 e anti-inflamatória IL-10 na saliva de pacientes com HSL
- Verificar se a aPDT é capaz de diminuir a dor de pacientes portadores de HSL por meio de escala analógica visual

VERGUEIRO nº
235/249

Endereço:

LIBERDADE
Bairro: CEP: UF: SP Município: SAO PAULO
01.504-001

Telefone:

(11)3385-9010 E-mail: comitedeetica@uninove.br Página 53 de 57



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 3.566.238

- Verificar se a aPDT é capaz de diminuir a temperatura no local da lesão por HSL • Avaliação se o tratamento com aPDT melhora a percepção de qualidade de vida dos portadores de HSL • Acompanhamento das recorrências nos períodos de follow-up com aPDT para ver se há remissão das recorrências

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Desconforto ou Riscos Esperados: - O único desconforto que você possa ter é dor durante a manipulação da área da lesão.

- Não há nenhum risco no tratamento,
- É muito rara mas pode haver alguma alergia ao fotossensibilizador
- Pode haver constrangimento ao preencher o questionário. Medidas protetivas aos riscos: - A pesquisadora fará a manipulação da sua lesão de forma bem leve e suave para que você sinta o mínimo de desconforto possível na hora do exame
- Você será atendido em um box, somente com a equipe que faz parte do estudo. Questionários são realizados também reservadamente.

Benefícios da Pesquisa:

O paciente pode ter uma alternativa de tratamento sem ser com a utilização de fármacos, que apresentam resistência viral, e, espera-se a diminuição da recorrência, melhorando a qualidade de vida dos pacientes

que apresentam lesões de herpes com altos índices de recidiva

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar se a terapia fotodinâmica é capaz de diminuir o tempo de cicatrização dessas lesões e diminuir a sua recorrência. Os pacientes que se apresentarem com herpes na fase de úlcera e forem incluídos no estudo serão divididos aleatoriamente em dois grupos: G1- Grupo Laser- azul de metileno a 0,005% irradiados com 660nm, 100mW (Laser Duo, MMOptics), 120J/cm², 3J por ponto. Aplicado na parte central da lesão, e 30 segundos de irradiação + placebo do aciclovir, G2- Grupo controle – será utilizado o aciclovir + simulação da PDT para cegamento do estudo. A variável principal do estudo será o tempo de resolução da lesão em dias. As variáveis secundárias serão avaliação da recorrência avaliada em meses, a dor avaliada por meio da escala analógica visual (EVA), temperatura local por meio de termômetro digital, e

VERGUEIRO nº
235/249
Endereço: LIBERDADE SAO PAULO
Bairro: CEP: UF: SP Município: 01.504-001

Telefone:
(11)3385-9010 E-mail: comitedeetica@uninove.br Página 04 de 07



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 3.586.238

citocinas IL1, IL-6, TNF-, IL-10 provenientes da secreção da lesão e analisadas por Multiplex e Quantificação do vírus VHS-1 por meio de PCRq. Todas as avaliações serão realizadas no baseline e após 3 e 7 dias após a aplicação da PDT ou seu placebo. O questionário para avaliação do impacto do tratamento a laser na qualidade de vida será aplicado no baseline e após 7 dias para as variáveis secundárias. O follow up em longo prazo será realizado em 1 mês, 6 meses e um ano para a qualidade de vida e avaliação da recorrência. Os efeitos adversos serão registrados e relatados. Os dados serão avaliados pela comparação de dois grupos: grupo tratamento (tratamento convencional + laser) e grupo controle (tratamento convencional + simulação do laser). Caso os dados sejam normais, serão submetidos ao teste t de Student. Os dados serão apresentados por suas médias \pm dp e o valor de p será definido em 0,05. Espera-se que haja remissão total da doença em um menor intervalo de tempo e sem recorrências, principalmente no mesmo local onde foi realizado o tratamento. A pesquisa é adequada em termos éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No Parecer anterior foram apontadas pendências.

No tópico "Medidas protetivas aos riscos" do TCLE, pesquisador deve detalhar melhor quais serão as medidas protetivas em relação à dor e sangramento durante a coleta das lesões. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente devem ser encaminhados para o CEP-UNINOVE relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final utilizando-se a opção "Enviar notificação" disponível na área em que encontra o seu projeto de pesquisa aprovado no campo "lista de apreciações do projeto" mais especificamente na coluna "ações". Qualquer alteração no projeto original aprovado pode ser apresentada com "emenda" desde que não contenha modificação essencial nos objetivos e na metodologia do projeto original. De forma objetiva com justificativa para nova apreciação e os documentos alterados devem ser evidenciados para facilitar a nova análise.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá se apresentar na instituição de realização da pesquisa (que autorizou a realização do estudo) para início da coleta dos dados.

VERGUEIRO nº
235/249

Endereço:
LIBERDADE
Bairro: CEP: UF: SP Município: SAO PAULO
01.504-001

Telefone:
(11)3385-9010 E-mail: comitedeetica@uninove.br Página 05 de 07



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 3.566.238

O participante da pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 466/12 item X1. 2. f). De acordo com a Res. CNS 466/12, X.3.b), o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, Ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo,

via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

		Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSIO CAS_DO_P	ROJETO_1362471.pdf		02/09/2019 20:02:59		Aceito
		20:02:05				Aceito
Outros 2CARTA.pdf	02/09/2019	ANDREIA LA SELVA	ALMEIDA			
	de Ausência	ANDREIA LA SELVA				Aceito Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETOHERPES.pdf	ALMEIDA				
	02/09/2019 20:00:58					
Investigador		ANDREIA LA SELVA				
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa	TCLEherpes.pdf	ALMEIDA				
	02/09/2019 19:59:58					
	22:29:46					Aceito
Outros CARTA_1.pdf	16/08/2019	ANDREIA LA SELVA	ALMEIDA			
	de					
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa	Termo_de_Assentimento.p	ANDREIA LA SELVA		16/08/2019 22:28:47	ALMEIDA	Aceito
	VERGUEIRO nº 235/249					

Endereço:
LIBERDADE
Bairro: CEP: UF: SP Município: 01.504-001

Telefone:
(11)3385-9010 **E-mail:** comitedeetica@uninove.br Página 06 de 07



Termo_de_Assentimento.pdf
16/08/2019 22:28:47
Folha de Rosto folhaderosto.pdf
02/08/2019 22:05:08

**UNIVERSIDADE NOVE
DE**

JULHO - UNINOVE

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Continuação do Parecer: 3.586.238

Ausência

SAO PAULO, 11 de Setembro de
2019



Plataforma
Brasil

ANDREIA LA SELVA ALMEIDA

Endereço: LIBERDADE
Bairro: CEP: UF: SP Município: SAO PAULO
01.504-001

78

Anexo 7. Protocolo Publicado na Revista Medicine Baltimore

Study Protocol Clinical Trial

Medicine®

OPEN

Treatment of herpes labialis by photodynamic therapy

Study protocol clinical trial (SPIRIT compliant)

Andreia La Selva, MD^a, Renata Matalon Negreiros, PhD^a, Daniela Teixeira Bezerra, PhD^a, Ellen Perin Rosa, MD^a, Vanessa Christina Santos Pavesi, PhD^a, Ricardo Scarpato Navarro, PhD^b, Marina Stella Bello-Silva, PhD^{c,d}, Karen Müller Ramalho, PhD^{d,e}, Ana Cecilia Corrêa Aranha, PhD^{d,f}, Paulo Henrique Braz-Silva, PhD^{g,h}, Kristianne Porta Santos Fernandes, PhD^a, Sandra Kalil Bussadori, PhD^a, Anna Carolina Ratto Tempestini Horlana, PhD^{a,*}

Abstract

Background: Lesions of herpes labialis are caused by the herpes simplex virus type 1 and cause pain and aesthetic compromise. It is characterized by the formation of small vesicles that coalesce and rupture forming extremely painful ulcers, that evolve to crusts, dry desquamations until their complete remission. Currently the treatment of these lesions is done with acyclovir. Although it diminishes the symptomatology, it causes viral resistance and does not prevent the recurrence of the lesions. It is known that antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has numerous advantages, among them: the reduction of the time of remission, and does not cause resistance. This protocol will determine the effectiveness of PDT in lesions of herpes labialis.

Materials and methods: A total of 30 patients with herpes labialis in the prodromal stage of vesicles, ulcers, and crusts will be selected to participate in the study and randomized into 2 groups: G1 control and G2 experimental. After signing Research Ethics Committee and TA, patients in group G1 will undergo the standard gold treatment for herpes labialis with acyclovir and simulated PDT treatment. Patients in the experimental G2 group will be treated simulating the gold standard treatment of herpes labialis (placebo) and PDT. In all patients, saliva samples will be collected for analysis of cytokines, and will be performed exfoliative cytology in the lesions. The pain will be assessed through a pain scale and a questionnaire of quality of life related to oral health (OHIP-14) will be given to them. Patients will continue to be followed up after 7 days, 1 month, 3 months, and 6 months; if there is a recurrence of the lesion, they will contact the researchers.

Clinical registration: clinicaltrials.gov - NCT 04037475. Registered on July 2019.

Abbreviations: aPDT = antimicrobial photodynamic therapy, HSL = herpes simplex labialis, HSV-1 = herpes simplex virus, ICC = intraclass correlation coefficient, J = Joules, J/cm² = Joules/square centimeter, mL = milliliter, µL = microliter, mm = millimeter, mM = millimolar, mW = milliwatts, mW/cm² = milliwatts/square centimeter, nm = nanometer, OHIP-14 = oral health impact profile, PS = photosensitizer, ROS = reactive oxygen species, RT-PCRq = real-time polymerase chain reaction.

Keywords: photodynamic therapy, cold sores, herpes simplex, laser

The individual data of the patients will remain confidential. The results of this study may be presented at international conferences and published. All data will be saved on the laboratory of the Department of Biophotonics Applied to Health Sciences of Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brazil.

This protocol received approval from the Human Research Ethics Committee of Universidade Nove de Julho (process number: 3.566.238). The data will be published in a peer-reviewed periodical.

The study received grant from Brazilian National Council for Scientific and Technological Development - CNPq #165189/2019-3 (CNPq, Portuguese: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

^aPostgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, ^bPostgraduate Program in Bioengineering and Biomedical Engineering, School of Dentistry, Universidade Brasil, ^cInternational Academy of Lasers in Dentistry, ^dLaser Special Laboratory in Dentistry, LELDO, School of Dentistry, University of São Paulo, ^ePost Graduate Program of Dental Sciences, University Ibirapuera, ^fDepartment of Dentistry School of Dentistry, University of São Paulo, ^gDivision of Pathology, Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo, ^hLaboratory of Virology, Institute of Tropical Medicine of São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Correspondence: Anna Carolina Ratto Tempestini Horlana, Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, University Nove de Julho/UNINOVE R. Vergueiro, 235/249, CEP 01504-001 São Paulo, Brazil (e-mail: annacarth@gmail.com).

Copyright © 2020 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc.

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0 (CCBY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article: La Selva A, Negreiros RM, Bezerra DT, Rosa EP, Pavesi VC, Navarro RS, Bello-Silva MS, Ramalho KM, Aranha AC, Braz-Silva PH, Fernandes KP, Bussadori SK, Horlana AC. Treatment of herpes labialis by photodynamic therapy: study protocol clinical trial (SPIRIT compliant). *Medicine* 2020;99:12(e19500).

Received: 3 February 2020 / Accepted: 10 February 2020

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000019500>

Anexo 8: Calibração

Confiabilidade

Escala: ALL VARIABLES

Resumo de processamento de casos

		N	%
Casos	Válido	5	100,0
	Excluídos ^a	0	,0
	Total	5	100,0

a. Exclusão de lista com base em todas as variáveis do procedimento.

Estatísticas de confiabilidade

Alfa de Cronbach	N de itens
,998	2

Coefficiente de correlação intraclasse

	Correlação intraclasse ^b	Intervalo de Confiança 95%		Teste F com Valor True0			
		Limite inferior	Limite superior	Valor	df1	df2	Sig
Medidas únicas	,997 ^a	,969	1,000	489,300	4	4	<,001
Medidas médias	,998 ^c	,984	1,000	489,300	4	4	<,001

Modelo de efeitos mistos bidirecional em que os efeitos das pessoas são aleatórios e os das medidas são fixos.

- a. O estimador é o mesmo, esteja o efeito de interação presente ou não.
- b. Os coeficientes de correlação intraclasse tipo A que usam uma definição de concordância absoluta.
- c. Essa estimativa é calculada considerando que o efeito de interação esteja ausente, porque ele não pode ser estimado de outra forma.