

Original de Pesquisa

Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares

Effect of photodynamic therapy on the disinfection of root canals

Dionatan Gomes¹
Kallyane Navarrete Gonçalves de Andrade¹
Larissa Nunes Rosa¹
Carlla Sloane Alberton¹
Flávia Sens Fagundes Tomazinho¹

Autora correspondente:

Flávia Sens Fagundes Tomazinho
Rua Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300 – Campo Comprido
CEP 81280-330 – Curitiba – PR – Brasil
E-mail: flavia.tomazinho@gmail.com

¹ Universidade Positivo, Escola de Ciência da Saúde – Curitiba – PR – Brasil.

Data de recebimento: 2 ago. 2019. Data de aceite: 3 set. 2020.

Palavras-chave:

canal radicular;
desinfecção; laser;
terapia fotodinâmica.

Resumo

Introdução: A desinfecção dos canais radiculares é fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico. **Objetivo:** Avaliar a eficácia antibacteriana da terapia fotodinâmica utilizando diferentes protocolos em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. **Material e métodos:** Utilizaram-se 32 dentes humanos. Os canais foram contaminados com *E. faecalis* por 72 horas. Após esse período, eles foram preenchidos com uma solução de azul de metileno a 25 µg/mL até a sua embocadura, ativados com laser diodo de baixa potência e então divididos em quatro grupos experimentais (n = 8) de acordo com o protocolo de uso do laser: grupo I) ativado por 3 minutos em um comprimento de onda de 660 nm com 40 mW de potência total; grupo II) ativado por 5 minutos em um comprimento de onda de 660 nm com 40 mW de potência total; grupo III) 3 minutos em um comprimento de onda de 780 nm com 40 mW de potência total; grupo IV) 5 minutos em um comprimento de onda de 780 nm com 40 mW de potência total. As amostras bacteriológicas foram coletadas antes (A1) e depois (A2) do procedimento específico de cada grupo. O número de unidades

formadoras de colônias foi contado. **Resultados:** Foi observada redução significativa no número de unidades formadoras de colônia. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, e o protocolo do grupo II foi o que obteve maior diminuição do número de células viáveis após o uso da terapia fotodinâmica. **Conclusão:** Viu-se, com a metodologia empregada, que a terapia fotodinâmica leva à redução da contaminação intracanal, mas não foi capaz de erradicar completamente as bactérias contaminantes.

Abstract

Keywords:

root canal;
disinfection; laser;
photodynamic therapy.

Introduction: Root canal disinfection is critical for successful endodontic treatment. **Objective:** To evaluate the antibacterial efficacy of photodynamic therapy using different protocols in root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Material and methods:** Thirty-two human teeth were used. The canals were contaminated with *E. faecalis* for 72 hours. After this period, the root canals were filled with a 25- μ g/mL methylene blue solution and activated with a low power diode laser and then divided into four experimental groups (n = 8) according to the protocol of the use of the laser: group I) activated for 3 minutes at a wavelength of 660 nm with 40 mW total power; group II) activated for 5 minutes at a wavelength of 660 nm with 40 mW total power; group III) 3 minutes at a wavelength of 780 nm at 40 mW total power; group IV) 5 minutes at a wavelength of 780 nm with 40 mW total power. Bacteriological samples were collected before (A1) and after (A2) the specific procedure of each group. The number of colonies forming units was counted. **Results:** A significant reduction in the number of colonies forming units was observed. There was a statistically significant difference between the groups, and the protocol of group II obtained the greatest reduction in the number of viable cells after the use of photodynamic therapy. **Conclusion:** It was seen, with the methodology employed, that the use of photodynamic therapy leads to the reduction of intracanal contamination, but it was not able to completely eradicate the contaminating bacteria.

Introdução

O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado com a descontaminação do sistema de canais radiculares, que é conseguida, sobretudo, durante o seu preparo. A anatomia complexa do sistema de canais radiculares, com a presença de istmos e canais acessórios, além de contaminação no interior dos túbulos dentinários e do preparo inadequado, é o principal fator que permite a sobrevivência dos microrganismos mesmo após o preparo químico-mecânico do canal radicular.

As técnicas atuais para a desinfecção do sistema de canais radiculares incluem a instrumentação, a irrigação com agentes antimicrobianos e a medicação intracanal, no entanto novos procedimentos para aprimorar a desinfecção do sistema de canais

radiculares vêm sendo desenvolvidos, entre os quais o uso do *laser* de baixa potência [7, 9, 10, 19].

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método adjunto para a inativação de bactérias [20] que envolve três componentes: luz, fotossensibilizador e oxigênio. Na presença de oxigênio, ocorre uma reação entre a luz e o fotossensibilizador. Este atua na membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas e na parede celular de bactérias gram-negativas [13]. A reação entre a luz e o fotossensibilizador gera espécies reativas de oxigênio e causa dano oxidativo às respectivas células [21]. A TFD tem a vantagem de atingir especificamente os microrganismos sem afetar o hospedeiro [20].

Muitos estudos relatam que a TFD reduziu de maneira efetiva a contagem de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares infectados em comparação com os protocolos tradicionais de instrumentação

endodôntica/irrigação [1, 8, 14, 16, 21, 22], no entanto resultados controversos também foram apontados [12, 15, 18].

A divergência nos resultados encontrados na literatura quanto à efetividade da TFD na descontaminação dos canais radiculares pode ser em razão das diferenças no protocolo utilizado, uma vez que não existe um padrão dos parâmetros (comprimento de onda, potência, tipo de luz, fotossensibilizador e tempo de aplicação do *laser*) entre os estudos. Com isso, justifica-se a pesquisa variando alguns desses parâmetros para propor um protocolo de uso da TFD na endodontia a fim de auxiliar na descontaminação dos canais radiculares.

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi avaliar a eficácia antibacteriana da TFD utilizando diferentes protocolos do *laser* diodo com o azul de metileno em canais radiculares infectados com *E. faecalis*.

Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (parecer n.º 2.077.488).

Seleção e preparo dos dentes

Para este estudo, utilizaram-se 32 dentes humanos unirradiculares e com canal único. Eles foram radiografados no sentido proximal para confirmar a presença de um único canal. Os dentes selecionados não deveriam apresentar sinal de reabsorção interna nem externa, e a patência foraminais foi verificada com uma lima tipo K #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). As coroas foram removidas, e as raízes, padronizadas em 14 mm. Determinou-se o comprimento de trabalho em 13 mm. Os canais radiculares foram instrumentados usando instrumentos WaveOne Gold Medium (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) acoplados ao motor elétrico X-Smart Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) seguindo as instruções do fabricante.

Durante o preparo, os dentes foram irrigados com 2 mL de hipoclorito de sódio 2,5% a cada avanço de 3 mm do instrumento no interior do canal radicular. Após a conclusão da instrumentação, os canais foram irrigados com 5 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 17% seguido de 5 mL de solução salina 0,9%. O forame apical foi então selado com ionômero de vidro (GC Co., Tóquio, Japão), a fim de prevenir o extravasamento da cultura bacteriana durante a contaminação dos espécimes. Os dentes foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Inoculação bacteriana dos canais radiculares

O microrganismo *E. faecalis* (American Type Culture Collection 29212) foi cultivado em 5 mL de caldo de infusão coração-coração (BHI) (33 g / 1 L, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubado a 37°C por 24 horas. Suspensões dos microrganismos crescidos foram ajustados à turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland (3×10^6 células/mL).

Em seguida, uma quantidade suficiente de suspensão microbiana foi utilizada para preencher os canais radiculares. Depois, os espécimes foram então incubados a 37°C por 72 horas, e, a cada 24 horas, a suspensão microbiana (BHI contendo *E. faecalis*) foi aspirada do canal e substituída por meio BHI estéril fresco sob condições estéreis.

Procedimentos experimentais

Após o período de contaminação, a suspensão microbiana foi aspirada e os canais preenchidos com solução de azul de metileno a 25 µg/mL até a sua embocadura utilizando-se uma seringa plástica de 5 mL com a ponta NaviTip estéril acoplada. Foram aguardados 3 minutos e então se utilizou a luz vermelha do Twin *laser* (MMOptics, São Paulo, SP, Brasil), um *laser* diodo de baixa potência. A fibra óptica (MMOptics, São Paulo, SP, Brasil) foi inserida no interior do canal radicular até alcançar o comprimento de trabalho (CT), sendo realizados então movimentos espiralados da porção apical para a cervical, a fim de assegurar uma difusão uniforme de luz dentro do canal [10].

Os espécimes foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 8) de acordo com o protocolo de utilização do *laser*:

- Grupo I: 3 minutos em um comprimento de onda de 660 nm com 40 mW de potência total;
- Grupo II: 5 minutos em um comprimento de onda de 660 nm com 40 mW de potência total;
- Grupo III: 3 minutos em um comprimento de onda de 780 nm com 40 mW de potência total;
- Grupo IV: 5 minutos em um comprimento de onda de 780 nm com 40 mW de potência total.

Coleta das amostras bacteriológicas

As amostras bacteriológicas foram coletadas em dois tempos, antes (A1) e depois (A2) do procedimento específico de cada grupo. Os canais foram preenchidos com solução salina estéril a 0,9%, e cada amostra foi coletada com o consecutivo uso de dois cones de papel absorvente estéreis #25 (Endopoints, Manacapuru, AM, Brasil), introduzidos até o CT, mantidos ali por 60 segundos e então

transferidos para um tubo estéril contendo 4,5 mL de solução de BHI e agitado em vórtex por 20 segundos. As amostras A1 foram diluídas até 10^{-3} , e as amostras A2, até 10^{-1} .

Finalmente, 100 μ L de cada diluição foram espalhados em placas de ágar de sangue (30 g/1 L de água destilada em 50 mL de sangue de ovelha) e incubados a 37°C por 24 horas. O número de unidades formadoras de colônias foi contado e transformado em contagens reais de acordo com o fator de diluição.

Resultados

Nenhum dos grupos foi capaz de promover a completa descontaminação dos canais radiculares.

O teste estatístico análise de variância (Anova) dois fatores com medidas repetidas foi utilizado para comparação entre os grupos ($p < 0,0001$), entre os tempos, antes e depois do uso do protocolo do *laser* ($p < 0,0001$) e entre os grupos e os tempos ($p < 0,0001$). Utilizou-se o teste T pareado para comparar o A1 e o A2 no mesmo grupo. Os resultados estão expressos na Tabela I.

Tabela I - Média e desvio padrão (DP) de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) entre os diferentes protocolos de descontaminação do canal radicular⁵

Grupo	A1		A2		Percentual de redução do número de células viáveis
	Média	DP	Média	DP	
I	$1,22 \times 10^5$ a,C	$5,12 \times 10^4$	$2,82 \times 10^3$ b,B,C	$3,09 \times 10^3$	97,70* [#]
II	$2,98 \times 10^6$ a,A	$5,00 \times 10^4$	$2,62 \times 10^4$ b,A	$5,34 \times 10^3$	99,12 ^w
III	$1,11 \times 10^5$ a,C	$9,51 \times 10^4$	$1,58 \times 10^3$ b,C	$9,39 \times 10^2$	98,57*
IV	$2,94 \times 10^5$ a,B	$3,38 \times 10^5$	$8,58 \times 10^3$ b,B	$1,28 \times 10^4$	97,08 [#]

⁵Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas indicam as comparações no mesmo grupo entre a análise inicial (A1) e a análise final (A2), e letras maiúsculas, as comparações entre os grupos na mesma análise. Símbolos diferentes apontam a diferença estatisticamente significativa entre os grupos na redução do número de células bacterianas viáveis

Discussão

O sucesso do tratamento endodôntico depende da eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares. Esse objetivo pode ser alcançado com a instrumentação dos canais radiculares associada com o uso de soluções irrigadoras, medicação intracanal e outras terapias coadjuvantes, como a TFD.

Neste estudo *in vitro*, após o preparo, os canais radiculares foram preenchidos com suspensão de *E. faecalis* e incubados a 37°C por 72 horas. O *E. faecalis* foi utilizado para contaminação dos canais radiculares, pois esse microrganismo apresenta resistência a procedimentos e medicamentos intracanales e já foi empregado em diversos estudos que avaliaram a eficácia da TFD [1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 17, 18, 22, 25].

Na literatura são encontrados tempos de contaminação dos canais radiculares que variam de 48 horas a 60 dias [3, 8, 9, 11], mas há evidências de que a partir de 48 horas de contaminação já se tem penetração do microrganismo no interior dos túbulos dentinários [9]. Assim como em Tennert

et al. [Na literatura, encontra-se a utilização de várias concentrações do fotossensibilizador azul de metileno, variando de 6,25 a 25 μ g/mL [11, 22, 23]. Nesta pesquisa, o fotossensibilizador foi utilizado na concentração de 25 μ g/mL para os quatro grupos, objetivando padronizar o experimento e não ser esta uma variável do estudo.

A fonte de radiação empregada aqui foi o Twin *laser* (MMOptics, São Paulo, SP, Brasil), um *laser* diodo de baixa potência que emite luz em dois intervalos espectrais: o visível, com 660 nm, e o infravermelho, com 780 nm de comprimento de onda. Neste estudo os dois comprimentos de onda foram avaliados com dois diferentes tempos de aplicação.

Avaliaram-se quatro diferentes protocolos de uso do *laser* de diodo para a descontaminação de canais radiculares contaminados com *E. faecalis*. Foram utilizados dois comprimentos de onda, 660 e 780 nm, e dois tempos de aplicação, 3 e 5 minutos. Os resultados mostraram que houve diferença entre os protocolos. Houve redução significativa do número de bactérias entre a coleta inicial e após a utilização do *laser*. Esses resultados corroboram

com os estudos encontrados na literatura [1, 3, 4, 7, 9, 10, 22, 25]. O protocolo que teve maior redução do número de células bacterianas viáveis foi o do grupo II, 660 nm, por 5 min.

Assim como em outros estudos, a fibra óptica foi utilizada acoplada ao bico da caneta do *laser*, para que a luz irradiasse no interior do canal radicular chegando próximo ao comprimento de trabalho [7, 10, 23], seguindo o protocolo de Garcez *et al.* [10], assegurando uma difusão uniforme de luz dentro do canal radicular.

Os resultados do presente estudo comprovam a efetividade da TFD na descontaminação dos canais radiculares infectados com *E. faecalis*, entretanto estudos futuros devem investigar o uso clínico do protocolo proposto, sendo a TFD uma terapia auxiliar na descontaminação dos canais radiculares.

Conclusão

Pode-se concluir, com a metodologia empregada, que o uso da TFD leva à redução da contaminação intracanal, mas não foi capaz de erradicar completamente as bactérias contaminantes.

Referências

1. Afkhami F, Akbari S, Chiniforush N. Enterococcus faecalis Elimination in root canals using silver nanoparticles, photodynamic therapy, diode laser, or laser-activated nanoparticles: an in vitro study. *J Endod.* 2017;43(2):279-82.
2. Arneiro RA, Nakano RD, Antunes LA, Ferreira GB, Fontes K, Antunes LS. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for root canals infected with Enterococcus faecalis. *J Oral Sci.* 2014;56(4):277-85.
3. Asnaashari M, Mojahedi SM, Asadi Z, Azari-Marhabi S, Maleki A. A comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810 nm and LED lamp 630 nm) against Enterococcus faecalis in extracted human anterior teeth. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:233-7.
4. Beltes C, Economides N, Sakkas H, Papadopoulou C, Lambrianidis T. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and near-infrared diode laser against enterococcus faecalis in infected human root canals. *Photomed Laser Surg.* 2017;35(5):264-9.
5. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J.* 2008;41(3):227-39.
6. Bitter K, Vlassakidis A, Niepel M, Hoedke D, Schulze J, Neumann K, et al. Effects of diode laser, gaseous ozone, and medical dressings on enterococcus faecalis biofilms in the root canal ex vivo. *Biomed Res Int.* 2017;2017:6321850.
7. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J.* 2006;200(6):337-41, discussion 29.
8. da Frota MF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Bagnato VS, Espir CG, Berbert FL. Photodynamic therapy in root canals contaminated with Enterococcus faecalis using curcumin as photosensitizer. *Lasers Med Sci.* 2015;30(7):1867-72.
9. Fonseca MB, Junior PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin OV, Rapoport A, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with Enterococcus faecalis. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(3):209-13.
10. Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod.* 2008;34(2):138-42.
11. Ghinzelli GC, Souza MA, Cecchin D, Farina AP, de Figueiredo JA. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with Enterococcus faecalis--an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11(4):472-8.
12. Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S, Mader T, Schmalz G. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. *Int Endod J.* 2013;46(5):449-57.
13. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86(8):694-707.
14. Masuda Y, Sakagami H, Horiike M, Kadokura H, Yamasaki T, Klokkevold PR, et al. Photodynamic therapy with pyoktanin blue and diode laser for elimination of Enterococcus faecalis. *In Vivo.* 2018;32(4):707-12.
15. Muhammad OH, Chevalier M, Rocca JP, Brulat-Bouchard N, Medioni E. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11(2):171-81.

16. Neelakantan P, Cheng CQ, Ravichandran V, Mao T, Sriraman P, Sridharan S, et al. Photoactivation of curcumin and sodium hypochlorite to enhance antibiofilm efficacy in root canal dentin. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(1):108-14.
17. Prazmo EJ, Godlewska RA, Mielczarek AB. Effectiveness of repeated photodynamic therapy in the elimination of intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2017;32(3):655-61.
18. Samiei M, Shahi S, Abdollahi AA, Eskandarinezhad M, Negahdari R, Pakseresht Z. The antibacterial efficacy of photo-activated disinfection, chlorhexidine and sodium hypochlorite in infected root canals: an in vitro study. *Iran Endod J.* 2016;11(3):179-83.
19. Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J.* 2002;35(3):268-74.
20. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod.* 2010;36(6):1030-5.
21. Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(4):632-43.
22. Silva EJ, Coutinho-Filho WP, Andrade AO, Herrera DR, Coutinho-Filho TS, Krebs RL. Evaluation of photodynamic therapy using a diode laser and different photosensitizers against *enterococcus faecalis*. *Acta Odontol Latinoam.* 2014;27(2):63-5.
23. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006;32(10):979-84.
24. Tennert C, Drews AM, Walther V, Altenburger MJ, Karygianni L, Wrbas KT, et al. Ultrasonic activation and chemical modification of photosensitizers enhances the effects of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* root-canal isolates. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(2):244-51.
25. Tennert C, Feldmann K, Haamann E, Al-Ahmad A, Follo M, Wrbas KT, et al. Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. *BMC Oral Health.* 2014;14:132.