

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 07/12/2019.



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Sâmara Cruz Tfaile Corbi

Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina na doença periodontal induzida em ratos

Araraquara

2017



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Sâmara Cruz Tfaile Corbi

Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina na doença periodontal induzida em ratos

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientadora:

Profª. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Araraquara

2017

Corbi, Sâmara Cruz Tfaile

Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tetracarboxi-
N-metilglucamina na doença periodontal induzida em ratos /
Sâmara Cruz Tfaile Corbi.-- Araraquara: [s.n.], 2017

84 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici
Marcantonio

1. Doenças periodontais 2. Fotoquimioterapia
3. Microtomografia por raio-X I. Título

Sâmara Cruz Tfaile Corbi

Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina na doença periodontal induzida em ratos

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Periodontia

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

3º Examinador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga

4º Examinador: Prof. Dr. Michel Reis Messoria

5º Examinador: Profa. Dra. Chaine Pavone

Araraquara, 07 de Dezembro de 2017

DADOS CURRICULARES

Sâmara Cruz Tfaile Corbi

NASCIMENTO	10 de Outubro de 1986, Araraquara/SP
FILIAÇÃO	Sálua Cruz Tfaile Jeferson Luis Corbi
2007/2011	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2012/2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014/2017	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais Sálua e Jeferson e
à minha irmã Sâmia, pela inspiração de todo dia e a vontade de vencer na vida.

Agradeço primeiramente a **Deus**, por colocar pessoas certas e especiais na minha vida. Pela sabedoria, força e amparo.

Aos meus pais **Sálua** e **Jeferson**, que me proporcionaram uma vida digna, onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros e de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá da nossa vontade. Em especial, agradeço minha mãe por ser um exemplo de vida, guerreira e batalhadora; que me mostra sempre os melhores caminhos, que me dá os conselhos certos, que me ensina a ser sensata e que diariamente me faz perceber quão abençoada e privilegiada eu sou.

À minha irmã **Sâmia**, pelo incessante estímulo, incentivo, exemplo, experiência, enorme compreensão e companheirismo, com quem compartilhei todos os momentos e que tem sido uma constante benção em minha vida.

À amiga e minha orientadora **profa. Adriana Marcantonio**, a quem dedico admiração, gratidão e respeito; quem me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica. Pela influência, direcionamento, grande amizade, apoio e eterna paciência. E por compartilhar comigo seu tempo e conhecimento.

À minha **Tia Salma** (*in memoriam*), que em vida sempre apoiou as minhas decisões, me incentivou a fazer tudo o que eu tinha vontade, mostrou os caminhos do bem e me ensinou que bondade e caridade podem vir de pequenos gestos. Agradeço por compartilhar comigo tantos sonhos, conversas, conselhos, tempo e risadas. Sinto muito sua falta.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus avós **Aparecida** e **Geraldo** e, minha prima **Sabrina Frasnelli** e minha **Tia Samira**, por entenderem minha ausência, falta de tempo e as visitas rápidas. Pelo apoio de sempre e o incentivo de continuar meu caminho com força de vontade e fé no futuro.

À minha amiga querida **Livia Finoti**, a quem tenho grande admiração e apreço. Pessoa única, com coração imenso, a irmã mais nova que eu não tive! Sempre disposta a me ajudar com paciência e entusiasmo. Me ensinou coisas da vida e compartilhou muitos conhecimentos na pós-graduação. Me auxiliou na execução da metodologia da análise radiográfica tridimensional do estudo 2, juntamente com a amiga **Ane Polly**, que prontamente me socorreu com soluções certeiras para o desenvolvimento da avaliação.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular: **Sâmia Corbi**, **Livia Finoti**, **Suzane Pigossi**, **Rafael Nepomuceno**, **Giovana Anovazzi**, **Romerito Lins**, **Guilherme Braido**, **Fernanda Coelho**, **profa. Raquel Caminaga** e **profa. Ticiane Capote** pelos momentos de diversão, alegria, risos e descontração.

Aos meus amigos de Doutorado: **Paula Macedo, Jackeline Tsurumaki, Cássio Rocha, Fernanda Florian, Vinícius Paiva, Adriana Cabrera, Tiago Fonseca, Lauriê Garcia, Patricia Maquera, Lélis Nícoli e Elton Pichotano**, por todos os momentos de aprendizados que passamos juntos.

Aos mestres e amigos: **Rubens Spin-Neto**, pelos ensinamentos desde minha iniciação científica e a quem tenho grande admiração e **Guilherme Oliveira**, pela paciência, explicações, dicas e por sempre estar acessível e à disposição para tirar dúvidas e sugerir ideias.

Aos meus amigos do Convescote: **Marina Manduca, Alessandro Alavarce, Tainara Alves, Aline dos Santos, Aylan Meneghini, Adriano Felício, Bruna Bolsoni, Maria Angélica, Fernando Pavaneli e Paulo Zaccaro**, pelas tardes de brincadeiras, jogos, gargalhadas e muito conhecimento inútil.

Às minhas amigas do colegial: **Mariana Rozatto e Michele Valila**, pela amizade de sempre, apoio, conselhos, descobertas, cumplicidade e simplesmente por estarem na minha vida após tantos anos.

Aos amigos e funcionários que me ajudaram na realização deste trabalho: **Mikail**, no trabalho no biotério; **Luana**, no escaneamento das imagens do micro-CT; **Claudinha** e **Leandro**, pela enorme paciência nos procedimentos laboratoriais; **Isa** e **Suleima** na organização e funcionamento das clínicas de Periodontia. E também a **Thelma** e **Toninho**.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de sua Diretora, **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, e do Vice-Diretor, **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

À **profa. Janice Rodrigues Perussi**, ao **prof. Anderson Orzari Ribeiro** e **Cláudia Bernal**, que sintetizaram e cederam o fotossensibilizador ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina utilizado neste trabalho.

Ao Coordenador atual do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** e ao anterior **Prof. Dr. Carlos Rossa Jr.** e a todos os docentes da disciplina de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **José Alexandre e Cristiano**,
pela gentileza, paciência e por sempre solucionarem dúvidas!

Aos funcionários da Biblioteca, **Ceres, Marley, Eliane, Maria Inês, Ana
Cristina, Denise, Laudicélia e Maria Aparecida** pela atenção e correção
desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**,
por conceder bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
de São Paulo – **FAPESP**, pelo auxílio pesquisa e pela utilização do equipamento
de micrótomo grafo computadorizado nesta faculdade, processo:

2009/54080-0.

MUITO OBRIGADA!

“Passarinho quando aprende a voar, sabe mais sobre coragem, que de vôo!”

(Autor Desconhecido)

Corbi SCT. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina na doença periodontal induzida em ratos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (Antimicrobial Photodynamic Therapy – aPDT), tem sido utilizada como um tratamento complementar na doença periodontal (DP). Ela combina um fotossensibilizador (FS) com uma fonte de luz que induz a produção de espécies reativas de oxigênio que elimina células microbianas. O objetivo deste trabalho foi avaliar, in vivo, os efeitos da aPDT (com o FS ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina – 10µg/mL e luz LED vermelho – 655nm, 0,45W de potência), coadjuvante a Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) e como monoterapia, além de verificar as respostas e alterações teciduais da DP induzida em ratos, pelas avaliações: microtomográfica, histométrica, estereométrica e histológica. Ligaduras foram inseridas nos sulcos dos segundos molares superiores para indução da DP. No Estudo 1, as ligaduras permaneceram por 15 dias e foram removidas para aplicar os tratamentos e no Estudo 2, as ligaduras foram colocadas por 7 dias e continuaram em posição por todo o experimento. 40 animais foram utilizados no Estudo 1 e distribuídos em 4 grupos: DP (Somente indução da doença, sem tratamento); RAR (Indução e tratamento básico periodontal); aPDT (Indução e aplicação da aPDT – FS ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina e luz LED vermelho); RAR+aPDT (Indução, tratamento básico periodontal e aplicação da aPDT). 42 animais foram utilizados no Estudo 2 e divididos também em 4 grupos: FS (Tratamento somente com a ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina); Luz (Tratamento somente com irradiação de luz LED vermelha); aPDT (Tratamento com a terapia fotodinâmica – FS+Luz) E DP (Indução da doença, sem tratamento). No Estudo 1, um dia após a remoção das ligaduras, foi aplicado os tratamentos e os animais foram eutanasiados nos períodos de 7 e 30 dias. No estudo 2, os animais receberam a aplicação das terapias e foram eutanasiados nos períodos de 7 e 15 dias. Para ambos os estudos, foi aplicado o teste paramétrico ANOVA one way, seguida do pós-teste de Tukey. No Estudo 1: na histometria, não foram encontradas diferenças estatísticas; a análise microtomográfica mostrou diferenças significantes nos dois períodos entre o grupo DP e RAR+aPDT e em 7 dias para DP e aPDT na região de furca. Nas proximais não houve diferenças significantes e na histologia, mostrou que não houve danos aos tecidos. No Estudo 2, na

análise histométrica e radiográfica tridimensional, os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes na região de furca e nas regiões interproximais, o perfil inflamatório demonstrou uma tendência a apresentar menor quantidade de células inflamatórias no grupo aPDT em 7 dias e na análise histológica não houve diferenças entre os grupos, indicando também que as terapias não causaram danos aos tecidos. Pode-se concluir que a aPDT com ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina foi efetiva no controle de perda óssea em DP induzida em ratos e que a aplicação da aPDT (com os componentes como monoterapias) e com a preservação da ligadura, favoreceu a permanência das bactérias no local e inibiu a ação dos tratamentos.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Fotoquimioterapia. Microtomografia por raio-X.

Corbi SCT. Photodynamic therapy with zinc tetracarboxy-N-methylglucamine phthalocyanine in induced periodontal disease in rats [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Antimicrobial Photodynamic Therapy (PDT) is a minimally invasive method consisting in the application of a photosensitive dye, which is subsequently stimulated by a light source and reacts with oxygen, producing reactive species. The aim of this study was to evaluate *in vivo*, the aPDT effects (with the PS zinc tetracarboxy-N-methylglucamine phthalocyanine 10µg/mL, and red LED light with 655nm), as adjuvant treatment to Scaling Root and Planing (SRP) and as monotherapy and verify the responses and tissue changes after aPDT application in PD-induced rats by microtomographic, histometric, stereometric and histological evaluations. Ligatures were placed around the second maxillary molars for PD induction. In Study 1, the ligatures were placed for 15 days and then they were removed. On the following day the treatments were performed. In Study 2, the ligatures were placed for 7 days and remained in position throughout the periods. Forty animals were used in Study 1 and they were divided into 4 groups: PD (disease induction only, without treatment); SRP (induction and basic periodontal treatment); PDT (Induction and application of photodynamic therapy); SRP+PDT (induction, application of photodynamic therapy and basic periodontal treatment). Forty-two animals were used in Study 2 and they divided into 4 groups: PS (Treatment with zinc tetracarboxy-N-methylglucamine phthalocyanine only); Light (Treatment with red LED light irradiation only); aPDT (Treatment with photodynamic therapy – PS + Light) and PD (Periodontal disease induction, without treatment). In Study 1, the animals were euthanized after 7 and 30 days of treatment. In Study 2, the therapies were applied at zero period and the animals were euthanized at 7 and 15 days. For both studies, one-way ANOVA parametric test was applied, followed by Tukey's post-test. In Study 1, concerning histometry data, no statistical differences were observed between groups. The microtomographic analysis indicated significant differences in the two periods for the PD and SRP+PDT groups and, at 7 days, for the PD and PDT groups in the furcation area. No significant differences the interproximal regions were observed. Regarding the histological analyses, no tissue damage was observed. In Study 2, the three-dimensional radiographic and histometric analyses revealed no statistically

different results for the furcation and interproximal regions. The inflammatory profile presented a trend of lower amounts of inflammatory cells in the aPDT group at 7 days, while the histological analysis indicated no significant differences between the groups, indicating that the therapies did not cause tissue damage. Thus, these data indicate that PDT using zinc tetracarboxy-N-methylglucamine phthalocyanine was effective in maintaining bone loss in PD-induced in rats, although further studies are required to further elucidate PDT effects and the application of aPDT and its components as monotherapies in PD-induced in rats with the preservation of the ligatures, favored *in situ* bacteria permanence and inhibited treatment action.

Keywords: Periodontal disease. Photochemotherapy. Computadorized microtomography.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	PROPOSIÇÃO.....	24
3	PUBLICAÇÕES.....	25
3.1	Publicação 1.....	25
3.2	Publicação 2.....	42
4	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICE.....	72
	Apêndice A – Material e Método.....	72
	ANEXO.....	83
	Anexo A – Certificado do Comitê de Ética.....	83
	Anexo B – Documentos Comprobatórios.....	84

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma doença multifatorial, de caráter inflamatório, que acomete os tecidos de suporte do dente e caracteriza-se por inflamação gengival, perda do nível de inserção e reabsorção do osso alveolar (American et al.², 2001; Armitage⁴, 2004). O fator etiológico primário da DP é a presença de microrganismos organizados em biofilmes que colonizam a superfície dos dentes. O biofilme é uma estrutura complexa composta por microcolônias de bactérias impregnadas em uma matrix extracelular que promove proteção celular e facilita a aderência aos dentes (Socransky, Haffajee⁶⁴, 2002; Socransky, Haffajee⁶⁵, 1991).

O padrão ouro no tratamento em Periodontia é a Raspagem e Alisamento Radicular (RAR), também conhecido como tratamento básico periodontal, onde a remoção mecânica do biofilme e do cálculo é realizada por um profissional em conjunto com o controle de placa feito pelo paciente (Tagge et al.⁷², 1975). No entanto, em alguns casos, o debridamento mecânico pode ser falho ao remover alguns organismos patogênicos, seja por sua localização no tecido subgengival ou locais de difícil acesso, como regiões de furca, bolsas periodontais profundas e anatomias dentárias incomuns (Slots⁶¹, 2002; Slots, Ting⁶², 2002). Bonito et al.⁷ (2005), mostraram que o tratamento básico periodontal pode não remover completamente as bactérias patogênicas. Além disso, a RAR isolada, reduz temporariamente a infecção bacteriana e pode resultar a um retorno aos níveis de pré-tratamento em menos de duas semanas (Adriaens et al.¹, 1988; Giuliana et al.²³, 1997).

Alguns pacientes continuam apresentando destruição do tecido periodontal após a realização da RAR. Estes pacientes, frequentemente, têm fatores de risco associados, tal como fumo, diabetes, condições hereditárias e doenças sistêmicas, que são acompanhadas por infecção persistente de uma ou mais bactérias periodontais patogênicas (Galler¹⁹, 2000; Grossi et al.²⁶, 1994; Kuo et al.³³, 2008).

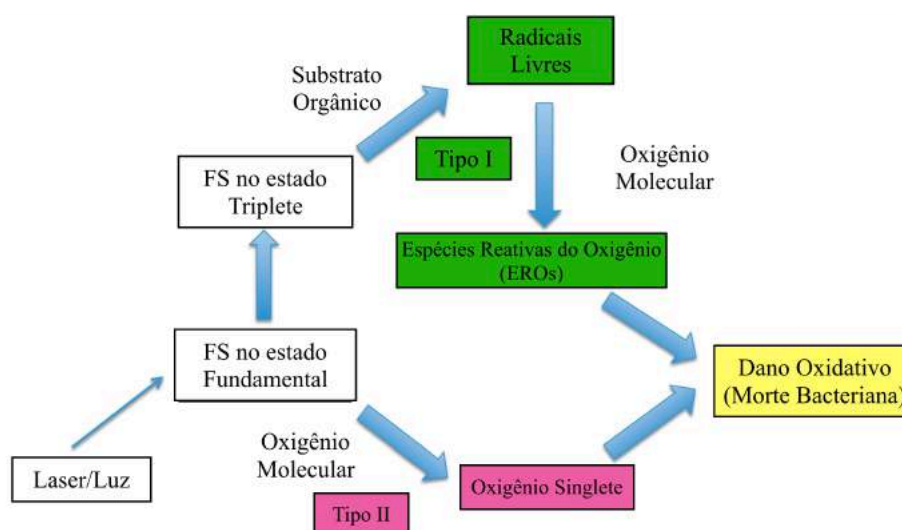
Assim, para contornar esta temática, o uso de antibióticos sistêmicos tem sido indicado. No entanto, a antibioticoterapia tem diminuído ao longo dos anos por causar efeitos colaterais, como problemas gastro-intestinais e o aumento de resistência bacteriana a estes medicamentos, já que em alguns casos, os pacientes abandonam o tratamento antes do término, facilitando assim, a seleção bacteriana (Slots⁶¹, 2002; Walker⁷⁶, 1996).

Na última década, as limitações da terapia periodontal convencional e a

problemática da administração de antibióticos, resultaram nas tentativas de introduzir a Terapia Fotodinâmica ou Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy – aPDT*), como um tratamento adjunto à periodontite crônica (Braun et al.⁹, 2008; de Almeida et al.¹³, 2008; de Almeida et al.¹⁵, 2007; Meisel, Kocher⁴¹, 2005). Além disso, a aPDT tem sido confirmada como sendo uma terapia antimicrobiana não antibiótica (Hamblin, Hasan²⁷, 2004; Wilson⁷⁷, 1993).

A aPDT combina luz visível de baixa intensidade (LASER/LED) e um fotossensibilizador (FS), corante não tóxico e fotossensível, que na presença de oxigênio, produz Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) citotóxicas, tal como oxigênio singlete (Hamblin, Hasan²⁷, 2004; Huang et al.²⁹, 2012), sendo tóxico para bactérias. Assim resumidamente, a aPDT utiliza oxigênio singlete e radicais livres produzidos pelo FS ativado por luz, para eliminar bactérias. O processo fotoquímico é iniciado por uma fonte de luz de baixa intensidade com um comprimento de onda adequado e, desse modo, o FS no estado fundamental absorve luz e resulta em um estado singlete que pode perder energia por fluorescência para um estado triplete com longevidade. Este último estágio leva à uma reação fotoquímica, que induz oxigênio singlete, radicais livres e superóxidos, que são citotóxicos, a causar a morte bacteriana (Kharkwal et al.³⁰, 2011), como ilustra a Figura 1. Curiosamente, enquanto a aPDT pode eliminar bactérias resistente à antibióticos (Maisch³⁷, 2009), não há informações sobre microrganismos desenvolvendo resistência a aPDT (Giuliani et al.²⁴, 2010).

Figura 1 – Mecanismo fotoquímico da Terapia Fotodinâmica.



Fonte: Elaboração própria. Adaptado de Kikuchi et al.³¹(2015) para o português.

Vários estudos tem mostrado que bactérias periodontopatogênicas são susceptíveis à aPDT em culturas planctônicas (Bhatti et al.⁵, 2002; Bhatti et al.⁶, 1997; Chan, Lai¹¹, 2003; Klepac-Ceraj et al.³², 2011; Matevski et al.³⁹, 2003; Nagahara et al.⁴⁵, 2013; Soukos et al.⁷⁰, 1998; Topaloglu et al.⁷⁴, 2013; Voos et al.⁷⁵, 2014; Wilson et al.⁸¹, 1993) e biofilms (Klepac-Ceraj et al.³², 2011; Voos et al.⁷⁵, 2014; Wilson et al.⁸⁰, 1992; Wood et al.⁸³, 1999) utilizando como FS azul de metileno (Chan, Lai¹¹, 2003; Dobson, Wilson¹⁸, 1992; Wilson et al.⁸¹, 1993), azul de metileno com nanopartículas (Klepac-Ceraj et al.³², 2011), azul de toluidina O (Bhatti et al.⁵, 2002; Bhatti et al.⁶, 1997; Dobson, Wilson¹⁸, 1992; Matevski et al.³⁹, 2003; Wilson et al.⁸¹, 1993), ftalocianina (Dobson, Wilson¹⁸, 1992; Wood et al.⁸³, 1999), hematoporfirina HCl (Dobson, Wilson¹⁸, 1992), hematoporfirina ester (Dobson, Wilson¹⁸, 1992), conjugado de poli-L-lisina com o FS clorina (e6) (Soukos et al.⁷⁰, 1998), indocianina verde (Topaloglu et al.⁷⁴, 2013), indocianina com nanoesferas (Nagahara et al.⁴⁵, 2013) e safranina O (Voos et al.⁷⁵, 2014). Porém, outros estudos tem demonstrado destruição incompleta de patógenos orais (Muller et al.⁴⁴, 2007; O'Neill et al.⁴⁷, 2002; Qin et al.⁵², 2008; Soukos et al.⁶⁶, 2003; Soukos et al.⁶⁷, 2000).

A utilização de FS em aPDT, como porfirinas, ftalocianinas e fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina O) podem afetar tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas por carregarem uma carga positiva (Merchat et al.⁴², 1996; Merchat et al.⁴³, 1996; Wilson et al.⁷⁸, 1995), sugerindo que a aPDT pode ser útil para aplicações orais, especialmente para o tratamento periodontal (Passanezi et al.⁵⁰, 2015; Sgolastra et al.⁵⁷, 2013; Smiley et al.⁶³, 2015).

Bactérias Gram-negativas são amplamente resistentes à muitos FS utilizados na aPDT (Malik et al.³⁸, 1992), no entanto, algumas espécies, tal como bactérias pigmentadas com cor preta, contém FS naturais e são muito susceptíveis a aPDT. Foi demonstrado que o comprimento de onda variando de 380 a 520nm induz uma redução tripla de crescimento de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, e *Prevotella melaninogenica* em amostras de biofilme dental obtidas de pacientes com periodontite crônica (Soukos et al.⁶⁸, 2005).

Além de estudos em bactérias, os efeitos da aPDT têm sido avaliados também por vários modelos de ligadura em ratos, com indução de periondontite experimental (Carvalho et al.¹⁰, 2011; de Almeida et al.¹⁵, 2007; Prates et al.⁵¹, 2011). A ligadura leva ao acúmulo de biofilme, resultando em perda de inserção e e reabsorção de osso alveolar em 7 dias (Graves et al.²⁵, 2008). Resultados favoráveis com aPDT como uma

terapia adjuvante à RAR têm sido relatados em periodontite experimental em ratos (de Almeida et al.¹³, 2008; de Almeida et al.¹⁴, 2008; de Almeida et al.¹⁵, 2007; Garcia et al.²², 2014). A progressão da periodontite experimental foi substancialmente reduzida por aPDT em análises radiográfica e histológica (de Almeida et al.¹⁵, 2007). Resultados positivos semelhantes também foram obtidos em áreas de furca (de Almeida et al.¹⁴, 2008; Garcia et al.²¹, 2013). Os ratos tratados com aPDT exibiram um número reduzido de células positivas ao ácido fosfatase resistente a tartarato, fraca imunoreatividade ao receptor-ativador do fator nuclear- κ B, e forte imunoreatividade da osteoprotegerina (Garcia et al.²⁰, 2013; Garcia et al.²², 2014). A eficácia da aPDT também foi confirmada na infecção periodontal em um modelo de cão da raça Beagle (de Oliveira et al.¹⁷, 2011; Sigusch et al.⁵⁹, 2005). A melhora na cicatrização periodontal, associada à organização do colágeno, infiltração de células inflamatórias e perda óssea, com a adição da aPDT também tem sido relatada (Prates et al.⁵¹, 2011).

Um receio para a aplicação clínica da aPDT é a potencial fotocitotoxicidade para as células hospedeiras. Contudo, foi demonstrado que as doses de luz necessárias para eliminar as bactérias na aPDT são muito mais baixas do que aquelas que são tóxicas para queratinócitos e fibroblastos (Soukos et al.⁶⁹, 1996). De fato, alguns efeitos benéficos da PDT foram relatados em células do ligamento periodontal, como inibição de mediadores inflamatórios, favorecendo a quimiotaxia celular e a promoção da vasodilatação local e a angiogênese (Hourelid, Abrahamse²⁸, 2007). Em termos de modulação da imunidade inata, a PDT atua sobre neutrófilos e promove migração (Tanaka et al.⁷³, 2012). A PDT também inativa citocinas derivadas do hospedeiro, como o fator de necrose tumoral- α e a interleucina-1 β , para inibir a ativação da E-selectina em células endoteliais (Braham et al.⁸, 2009). A PDT afeta as células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células de Langerhans, reduzindo sua capacidade de ativar os linfócitos T e enfraquecendo a resposta inflamatória (Seguier et al.⁵⁶, 2010).

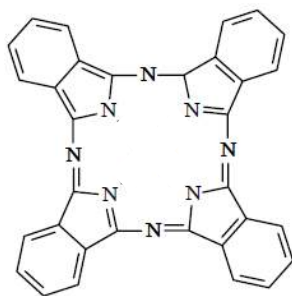
Duas vantagens principais são frequentemente citadas para a aPDT em comparação à outros tratamentos periodontais: Primeiro: na aPDT, um FS é colocado diretamente na bolsa periodontal e pode ser ativado através de uma fibra óptica colocada no mesmo local, o que ajuda a evitar danos aos tecidos circundantes (Qin et al.⁵³, 2008). Segundo: os efeitos da aPDT são iniciados pela exposição à uma fonte de luz e deste modo, as bactérias podem ser erradicadas em um curto período de tempo. Assim o desenvolvimento de resistência bacteriana é improvável (Maisch³⁶, 2007). Importante ressaltar que a erradicação de biofilmes e a inativação de citocinas

inflamatórias por aPDT provou ser eficaz e segura (Kikuchi et al.³¹, 2015).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos compostos considerados como a segunda geração de corantes, com propósitos diagnóstico e terapêutico. Dentre eles, está as ftalocianinas, que são corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azaporfirinas (Spikes⁷¹, 1986) e tem sido estudadas e avaliadas (Longo et al.³⁵, 2012; Nunes et al.⁴⁶, 2004; Ribeiro et al.⁵⁴, 2013). Estes compostos têm uma banda de absorção no espectro electromagnético que varia de 650 a 680nm, o que permite uma maior penetração da luz nos tecidos (Nunes et al.⁴⁶, 2004) e as suas propriedades fotofísicas dependem da composição, particularmente do íon metálico central. Entre as ftalocianinas, a ftalocianina de cloro-alumínio tem sido sugerida por possuir propriedades fotofísicas favoráveis para uso em aPDT, uma vez que produz altas quantidades de oxigênio singlete (Nunes et al.⁴⁶, 2004). A eficácia deste fotossensibilizador associado à luz LED foi comprovada em um estudo in vitro que avaliou o potencial fotodinâmico da ftalocianina de cloro-alumínio diluída em nanoemulsão catiônica para inativar as culturas planctônicas e de biofilmes formados por *Candida albicans* (Ribeiro et al.⁵⁴, 2013). Este FS foi também eficaz para a inativação de bactérias em pacientes com lesões cariosas (Longo et al.³⁵, 2012). Outros estudos (Dobson, Wilson¹⁸, 1992; Oliveira et al.⁴⁹, 2006; Sibata et al.⁵⁸, 2004; Wilson, Dobson⁷⁹, 1993; Wilson et al.⁸¹, 1993; Wilson, Pratten⁸², 1995) têm corroborado a eficiência das ftalocianinas como agentes fotossensíveis na eliminação de microrganismos periodontopatogênicos com uso em aPDT. E também, as ftalocianinas de zinco (FcZn) estão entre os sensibilizadores promissores deste grupo (Anholt, Moan³, 1992; Rosenthal⁵⁵, 1991; Spikes⁷¹, 1986).

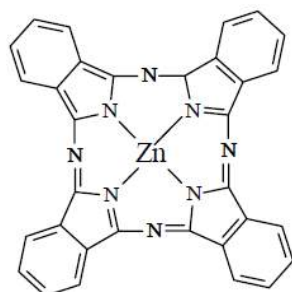
A ftalocianina (Figura 2) é um macrociclo simétrico composto por quatro unidades iminoisindol com uma cavidade central de tamanho suficiente para acomodar vários íons metálicos e, este metal central possui influência considerável em sua propriedade fotossensibilizadora (Figura 3) (Anholt, Moan³, 1992; Rosenthal⁵⁵, 1991; Spikes⁷¹, 1986). O nome ftalocianina vem de uma combinação do prefixo phthal, originalmente do grego naphtha (óleo de rocha), para enfatizar a associação com seus vários precursores derivados do ácido ftálico, e o grego cyanine (azul) (Mckeown⁴⁰, 1998).

Figura 2 – Estrutura química da ftalocianina.



Fonte: Adaptado de de Melo¹⁶ (2014).

Figura 3 – Estrutura química da ftalocianina acomodando o íon metálico zinco.



Fonte: de Melo¹⁶ (2014).

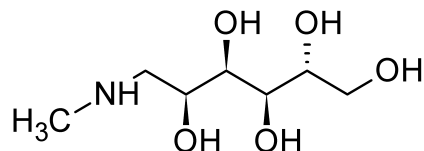
Um fato importante é quanto à hidrofobicidade que alguns fotossensibilizadores apresentam, pois essa propriedade em meio aquoso leva à auto-agregação e em muitos casos a uma subsequente precipitação, o que reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete (Simplicio et al.⁶⁰, 2002). Desse modo é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solúvel em meio aquoso para possível aplicação clínica.

Uma estratégia interessante para aumentar a solubilidade em meio aquoso de alguns FS envolve a formação de espécies supramoleculares hidrofílicas. Uma supramolécula é definida como uma espécie química constituída por duas ou mais moléculas unidas por interações intermoleculares. Nesse sentido a química supramolecular utiliza uma abordagem centrada na associação de moléculas, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade (de Melo¹⁶, 2014).

A meglumina, conhecida também como N-metilglucamina (Figura 4) é um aminocarboidrato derivado da glicose capaz de formar espécies supramoleculares

binárias hidrofílicas com compostos que possuam em sua estrutura átomos de hidrogênio ácidos (de Melo¹⁶, 2014).

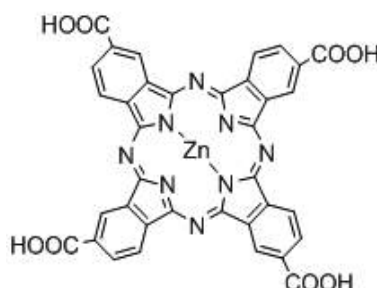
Figura 4 – Estrutura química da meglumina.



Fonte: de Melo¹⁶ (2014).

A formação dos compostos de meglumina envolve como condição uma reação ácido-base em que o hidrogênio ácido é transferido ao grupo amina do aminocarboidrato. Para viabilizar a formação de espécies supramoleculares entre a meglumina e as ftalocianinas, estas primeiramente são funcionalizadas com grupos carboxílicos como a ftalocianina de zinco tetracarboxilada (FcZnTc, Figura 5) (de Melo¹⁶, 2014).

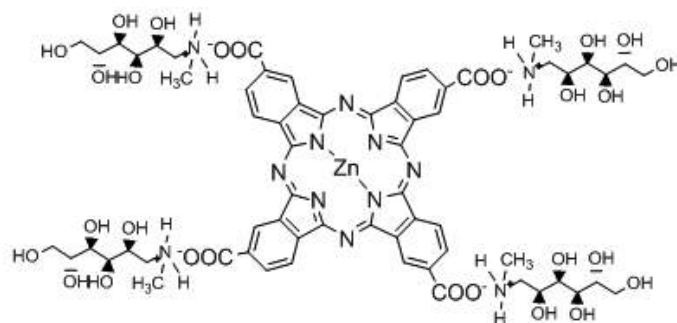
Figura 5 – Ftalocianina-Zn-tetracarboxilada.



Fonte: de Melo¹⁶ (2014).

Posteriormente à inserção dos grupos ácidos, a reação com o aminocarboidrato pode ser conduzida produzindo espécies mais solúveis em água. Esse procedimento permite a inserção de até quatro moléculas de meglumina como é observado na Figura 6 para a ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina (FcZnTcG). A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio são estabelecidas aumentando a hidrofiliicidade das ftalocianinas (de Melo¹⁶, 2014).

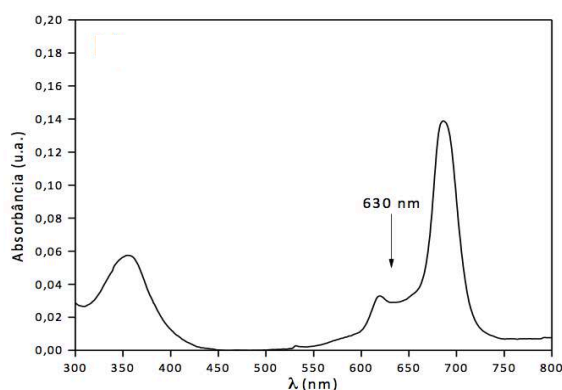
Figura 6 – Ftalocianina-Zn-tetracarboxi-N-metilglucamina.



Fonte: de Melo¹⁶ (2014).

O espectro de absorção das ftalocianinas em solução consiste de duas bandas principais centradas em torno de 350 nm e 670 nm. A Figura 7 ilustra o espectro de absorção molecular da ftalocianina de zinco tetracarboxilada.

Figura 7 – Espectro de absorção molecular da ftalocianina de zinco tetracarboxilada em DMSO.



Fonte: de Melo¹⁶ (2014).

Na literatura atual, há uma considerável quantidade de estudos em humanos e animais avaliando a aPDT com agentes fotossensibilizadores tradicionais (azul de metileno e azul de toluidina O), obtendo resultados satisfatórios utilizando diferentes metodologias. Os estudos não possuem padronização nos parâmetros de luz, dos tipos e concentrações dos fotossensibilizadores, tempos empregados, entre outros fatores que influenciam a ação da terapia. Além disso, existe uma escassez de estudos sobre corantes recém descobertos/descritos (como as ftalocianinas) e seu potencial na eliminação de microrganismos que mostra sua efetividade nas respostas e alterações teciduais da aplicação da aPDT na DP induzida em ratos.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se concluir que:

Publicação 1: A aPDT com ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina, como monoterapia ou associada a RAR, foi efetiva no controle de perda óssea em DP induzida em ratos, similarmente ao tratamento mecânico convencional.

Publicação 2: A aplicação da aPDT e de seus componentes como monoterapias na DP induzida não acarretou danos aos tecidos e não alterou o perfil inflamatório. E a permanência da ligadura durante o período experimental inibiu a ação das terapias sobre as bactérias e a resposta do hospedeiro frente ao tratamento tornou-se comprometida com a metodologia utilizada.

Assim, a ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina pode ser considerada um promissor fotossensibilizador. No entanto, mais estudo *in vitro* e *in vivo* são necessários para elucidar a ação da aPDT e o efeito deste FS como terapia adjunta no tratamento da DP.

REFERÊNCIAS*

1. Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol.* 1988; 59(8): 493-503.
2. American, Academy, Periodontology o. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis, and other clinical conditions. *J Periodontol.* 2001; 72(12): 1790-800.
3. Anholt H, Moan J. Fractionated treatment of CaD2 tumors in mice sensitized with aluminium phthlocyanine tetrasulfonate. *Cancer Lett.* 1992; 61(3): 263-7.
4. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004; 34: 9-21.
5. Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Exposure of *Porphyromonas gingivalis* to red light in the presence of the light-activated antimicrobial agent toluidine blue decreases membrane fluidity. *Curr Microbiol.* 2002; 45(2): 118-22.
6. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol.* 1997; 65(6): 1026-31.
7. Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol.* 2005; 76(8): 1227-36.
8. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009; 80(11): 1790-8.
9. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(10): 877-84.
10. Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos J, Silva-Filho VJ, Thedei G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(11): 735-40.
11. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(1): 51-5.
12. da Silva VC, Cirelli CC, Ribeiro FS, Leite FR, Benatti Neto C, Marcantonio RA, et al. Intrusion of teeth with class III furcation: a clinical, histologic and histometric study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(9): 807-16.
13. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 2008; 79(11): 2156-65.
14. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol.* 2008; 79(6): 1081-8.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das normas Vancouver. Disponível no site da biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/-biblioteca/manual>.

15. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007; 78(3): 566-75.
16. de Melo WC. Fotoativação seletiva dos microrganismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* [tese de doutorado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo; 2014.
17. de Oliveira RR, Novaes AB, Jr., Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Jr., Sato S, et al. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3): 359-67.
18. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* 1992; 37(11): 883-7.
19. Galler C. Periodontal summary score. A new and relevant periodontal assessment guide. *J Ont Dent Assoc.* 2000; 1: 21-8.
20. Garcia VG, Gualberto Junior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol.* 2013; 84(4): 556-65.
21. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC, Jr., Santinoni Cdos S, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(1): 143-50.
22. Garcia VG, Longo M, Gualberto Junior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2014; 49(5): 584-94.
23. Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(7): 478-85.
24. Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(2): 637-42.
25. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(2): 89-105.
26. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994; 65(3): 260-7.
27. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 436-50.
28. Hourelid N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(2): 78-84.

29. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(6): 490-9.
30. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(7): 755-67.
31. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment: a review of literature. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(10): 24111-26.
32. Klepac-Ceraj V, Patel N, Song X, Holewa C, Patel C, Kent R, et al. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(7): 600-6.
33. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health.* 2008; 122(4): 417-33.
34. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res.* 2006; 85(6): 510-4.
35. Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fatima Menezes Almeida-Santos M, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(3): 575-84.
36. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007; 22(2): 83-91.
37. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem.* 2009; 9(8): 974-83.
38. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B.* 1992; 14(3): 262-6.
39. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003; 38(4): 428-35.
40. Mckeown NB. Phthalocyanines materials: synthesis, structure and function. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
41. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 79(2): 159-70.
42. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 1996; 32(3): 153-7.

43. Merchat M, Spikes JD, Bertoloni G, Jori G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B*. 1996; 35(3): 149-57.
44. Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci*. 2007; 115(1): 77-80.
45. Nagahara A, Mitani A, Fukuda M, Yamamoto H, Tahara K, Morita I, et al. Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2013; 48(5): 591-9.
46. Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(2): 273-84.
47. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med*. 2002; 31(2): 86-90.
48. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1996; 27(9): 896-903.
49. Oliveira DM, Lacava ZG, Lima EC, Morais PC, Tedesco AC. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006; 6(8): 2432-7.
50. Passanezi E, Damante CA, de Rezende ML, Gregghi SL. Lasers in periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2015; 67(1): 268-91.
51. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, Franca CM, Cai S, Mayer MP, et al. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg*. 2011; 29(12): 835-44.
52. Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhou C, et al. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci*. 2008; 23(1): 49-54.
53. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2008; 43(2): 162-7.
54. Ribeiro AP, Andrade MC, da Silva Jde F, Jorge JH, Primo FL, Tedesco AC, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochem Photobiol*. 2013; 89(1): 111-9.
55. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol*. 1991; 53(6): 859-70.
56. Segulier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, et al. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photobiol B*. 2010; 101(3): 348-54.

57. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R, Monaco A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(5): 514-26.
58. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 23(2): 131-8.
59. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol.* 2005; 76(7): 1100-5.
60. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova.* 2002; 25: 801-7.
61. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res.* 2002; 37(5): 389-98.
62. Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2002; 28: 106-76.
63. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J, et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc.* 2015; 146(7): 508-24 e5.
64. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002; 28: 12-55.
65. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res.* 1991; 26(3 Pt 2): 195-212.
66. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med.* 2003; 33(3): 161-8.
67. Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharm Res.* 2000; 17(4): 405-9.
68. Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, et al. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4): 1391-6.
69. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18(3): 253-9.
70. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(10): 2595-601.
71. Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1986; 43(6): 691-9.

72. Tagge DL, O'Leary TJ, El-Kafrawy AH. The clinical and histological response of periodontal pockets to root planing and oral hygiene. *J Periodontol.* 1975; 46(9): 527-33.
73. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, et al. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis via neutrophil accumulation. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39823.
74. Topaloglu N, Gulsoy M, Yuksel S. Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31(4): 155-62.
75. Voos AC, Kranz S, Tonndorf-Martini S, Voelpel A, Sigusch H, Staudte H, et al. Photodynamic antimicrobial effect of safranin O on an ex vivo periodontal biofilm. *Lasers Surg Med.* 2014; 46(3): 235-43.
76. Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000.* 1996; 10: 79-88.
77. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol.* 1993; 75(4): 299-306.
78. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995; 78(5): 569-74.
79. Wilson M, Dobson J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 1993; 16 Suppl 4: S414-5.
80. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol.* 1992; 25(2): 77-81.
81. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8(3): 182-7.
82. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med.* 1995; 16(3): 272-6.
83. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 50(1): 1-7.