

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/03/2019.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lívia Jacovassi Tavares

**Eficácia da terapia fotodinâmica
antimicrobiana associada ao metronidazol em
biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* e
*Porphyromonas gingivalis***

ARARAQUARA

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lívia Jacovassi Tavares

**Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana
associada ao metronidazol em biofilmes de
Fusobacterium nucleatum e *Porphyromonas gingivalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Reabilitação Oral – Área de Prótese da
Faculdade de Odontologia de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista para o título de
Doutor em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

ARARAQUARA

2017

Tavares, Livia Jacovassi

Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada ao metronidazol em biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* / Livia Jacovassi Tavares.-- Araraquara: [s.n.], 2017
117f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia 2. Metronidazol 3. *Fusobacterium nucleatum*
4. *Porphyromonas gingivalis* I. Título

Lívia Jacovassi Tavares

Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada ao
metronidazol em biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* e
Porphyromonas gingivalis.

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Prof. Dr. Ana Carolina Pero Vizoto

3º Examinador: Prof. Dr. Daniela Leal Zandim-Barcelos

4º Examinador: Prof. Dr. Natalia Mayumi Inada

5º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 16 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES

Livia Jacovassi Tavares

Nascimento: 29/05/1986 – Juiz de Fora - MG

Filiação: Antônio Celso Tavares e Cleusa Aparecida Jacovassi Tavares

2006-2010 Graduação em Odontologia.

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2011-2013 Pós-graduação em Implantodontia – Nível Especialização

Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa- FAEPO

2013-2017 Pós-graduação em Reabilitação Oral– Nível Doutorado

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Agradecimentos

Aos meus pais, *Antônio Celso e Cleusa*, por serem os melhores do mundo. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por acreditar nos meus sonhos. Esta conquista também é de vocês.

Ao *Luiz Guilherme Freitas de Paula* por ser meu parceiro em todos os momentos. Obrigada por acreditar no meu potencial. A vida é muito melhor com você ao meu lado.

À *Ana Cláudia Pavarina*, pela disposição e paciência com que orientou meus passos até aqui. Muito obrigada por esta oportunidade.

À *Denise Madalena Spolidório*, por disponibilizar o uso do laboratório para a execução deste projeto e por ser sempre solícita nos momentos em que precisei.

À *Érica Dorigatti de Avila* - Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. O que aprendi com você vai muito além do laboratório. Espero um dia ser uma pequena parte desta profissional que você é. Obrigada pela amizade, pela paciência e por estar sempre presente nos momentos bons e ruins.

À *Beatriz Helena Dias Panariello* pela amizade desde a época da graduação. Obrigada pelo apoio durante esta trajetória.

À *Kahena Rodrigues Soldati* pela convivência durante todo este tempo.

Obrigada pela paciência e parceria. Que a nossa amizade seja sempre assim.

Aos *amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia* que fizeram com que dias e noites de trabalho fossem divertidos e agradáveis. Desejo muito sucesso a todos.

Aos meus amigos de coração que Araraquara me proporcionou: *Vinícius, Suelen, Cibele, Gabi, Ju, Fer, Jeff, Geisi....* sentirei saudades!

Às alunas de pós-graduação *Carol Tonon e Patty Maquera* pelo apoio na execução deste projeto. Torço muito por vocês, meninas. Sucesso!

Às professoras *Martise, Janaína, Daniela, Ana Carolina, Karin e Natália* pela contribuição neste trabalho.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)* por toda a minha formação.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pela concessão da bolsa de estudos.

Tavares LJ. Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada ao metronidazol em biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* [Tese Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada (aPDT) ao metronidazol (MTZ) em biofilmes periodontopatogênicos. Para tal finalidade, foram realizadas as seguintes etapas: (1) determinação do tempo de adesão (24 e 48 horas) e formação de biofilme mono e duo-espécie (3, 5 e 7 dias) de *Fusobacterium nucleatum* (NCTC 11326) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277); (2) aplicação da aPDT mediada por PDZ associada ao MTZ em biofilmes mono-espécie de *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. Foram avaliadas diferentes concentrações do PDZ (50, 75 e 100 mg/L) e dose de luz de 50 J/cm² (660nm). Após a aplicação da aPDT, os biofilmes foram incubados com diferentes concentrações do MTZ (MIC, 50x MIC e 100x MIC) por 24 horas. Os grupos controles positivos (L-F-) não receberam fotossensibilizador e não foram iluminados. A viabilidade dos microrganismos após os tratamentos foi avaliada por meio da contagem de UFC/ml. Os resultados demonstraram que o período de adesão de 24 horas, seguido de 5 dias de formação de biofilme foi satisfatório para a obtenção de biofilmes maduros mono-espécie. Para *F. nucleatum*, os resultados demonstraram que aPDT 75 mg/mL associado com MTZ 100x MIC e aPDT 100 mg/L associado com MTZ nas concentrações de 50x MIC e 100x MIC reduziu significativamente o número de UFC/mL, 2,99; 2,9 e 3,94 Log₁₀ respectivamente. Para *P. gingivalis*, a redução mais significativa de UFC/mL foi obtida quando a associação de aPDT 100 mg/L e MTZ 100x MIC foi realizada, resultando em 5 Log₁₀ de redução. Adicionalmente, houve redução significativa nos grupos que foram expostos apenas à luz ou à maior concentração de antibiótico, 1,71 e 3,07 Log₁₀, em comparação com o

grupo sem tratamento. O efeito do tratamento da aPDT associada à MTZ foi potenciado quando comparado aos tratamentos isolados.

Palavras chave: Fotoquimioterapia. Metronidazol. *Fusobacterium nucleatum*. *Porphyromonas gingivalis*.

Tavares LJ. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy associated with metronidazole on biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the efficacy of metronidazole (MTZ) associated antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on periodontopathogenic biofilms. For this purpose, the following steps were performed: (1) determination of adhesion period (24 and 48 hours) and single and duo species biofilm formation (3, 5 and 7 days) of *Fusobacterium nucleatum* (NCTC 11326) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277); (2) Photodithazine ® (PDZ)- mediated aPDT in association with MTZ in single-specie biofilms of *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. Different concentrations of PDZ (50, 75 e 100 mg/L) and light dose of 50 J / cm² (660nm) were evaluated. After application of aPDT, the biofilms were incubated with different concentrations of MTZ (MIC, 50x MIC and 100x MIC) for 24 hours. Positive control groups (L-F-) received no photosensitizer and were also not illuminated. The viability of the microorganisms after the treatments was evaluated by counting CFU/ml. The results demonstrated that the 24 hours adhesion period followed by 5 days of biofilm formation was satisfactory for obtaining a mature biofilm in single-specie. For *F. nucleatum*, the results demonstrated that 75 mg/L aPDT associated with MTZ 100x and 100 mg/mL aPDT associated with MTZ at 50x MIC and 100x MIC concentrations significantly reduced the number of CFU/mL, 2.99; 2.9 and 3.94 Log₁₀ respectively. For *P. gingivalis*, the greatest reduction of CFU/mL was obtained when the association of aPDT 100 mg/L and MTZ 100x MIC was performed, resulting in 5 Log₁₀ reduction. Additionally, there was a significant reduction in the groups that were exposed only to the light or the highest concentration of antibiotic, 1.71 and 3.07 Log₁₀, compared to the group without treatment. The

treatment effect of MTZ-associated aPDT was potentiated when compared to the isolated treatments.

Key words: Photochemotherapy. Metronidazole. *Fusobacterium nucleatum*. *Porphyromonas gingivalis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	18
3 PUBLICAÇÃO 1	19
4 PUBLICAÇÃO 2	58
5 PUBLICAÇÃO 3	78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
7 CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS	110
ANEXO A	115
ANEXO B.....	117

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o “Instituto Nacional da Saúde” (NIH), infecções causadas por microrganismos organizados em biofilmes, são consideradas um problema crônico de saúde pública, uma vez que as doenças decorrentes desta comunidade microbiana estão associadas a 80% de todas as infecções em seres humanos (<http://grants.nih.gov/bolsas/guia/pa-files/PA-07-288.html>). Biofilmes são estruturas biológicas constituídas por microrganismos envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, que assegura a sobrevivência dos mesmos (Lamfon et al.³⁵, 2005; Ramage et al.⁵³, 2006), agindo como uma barreira protetora a agentes físicos e químicos externos, o que pode limitar a penetração de agentes antimicrobianos (Evans et al.¹³, 1990). Particularmente na cavidade oral, o biofilme é responsável pelo desenvolvimento de diversas patologias, incluindo a doenças periodontal e peri-implantar.

Peri-implantite, assim como a periodontite, é caracterizada pela perda de inserção e destruição do osso alveolar adjacente. Embora estas patologias sejam mediadas e reguladas por processos inflamatórios advindos do próprio hospedeiro, as bactérias são responsáveis pelo seu desenvolvimento (Rosen et al.⁵⁶, 2013). De acordo com Socransky, Haffajee⁶², 2002, as bactérias envolvidas nestas patologias agrupam-se em complexos, cujo o complexo conhecido como laranja, representado pelas espécies *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium periodonticum* e *Fusobacterium nucleatum* têm a capacidade de interagir e favorecer a implantação do complexo vermelho, representado pelas espécies *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* (Socransky et al.⁶¹, 1998; Socransky, Haffajee⁶², 2002).

P. gingivalis e *F. nucleatum*, são bactérias anaeróbias Gram-negativas associadas com a periodontite crônica, periodontite agressiva localizada e doença peri-

implantar. *P. gingivalis* tem sido considerada uma das principais espécies que desenvolvem a doença periodontal, devido aos seus numerosos fatores de virulência (Hajishengallis, Lamont²⁶, 2012). *F. nucleatum* é considerado fundamental para a maturação do biofilme dental, devido à grande capacidade de co-agregação com outros microrganismos, tais como *P. gingivalis* (Kolenbrander, Andersen³², 1989; Bradshaw et al.⁷, 1998). Estudos relatam aumento no grau de patogenicidade, determinado pelos fatores de virulência expressos durante a interação entre essas espécies (Sundqvist et al.⁶⁵, 1979; Baumgartner et al.⁴, 1992; Feuille et al.²³, 1996; Ebersole et al.¹⁷, 1997). Estas interações são definidas como um sinergismo patogênico que conduzem a uma relação de cooperação que contribui para a sobrevivência e a persistência de ambas em diversos nichos orais (Metzger et al.⁴¹, 2009).

Indivíduos portadores de doença periodontal apresentam grande quantidade de microrganismos patogênicos na cavidade oral. Em caso da perda de dentes comprometidos, estas bactérias permanecem sobre os dentes remanescentes e podem influenciar a microbiota peri-implantar (Metzger et al.⁴¹, 2009). Estudos anteriores identificaram alta prevalência de bactérias anaeróbias Gram-negativas ao redor de implantes com sinais clínicos de peri-implantite (Mombelli et al.⁴⁴, 1987; Mombelli, Mericske-ster⁴³, 1990; Shibli et al.⁶⁰, 2008; Tabanella et al.⁶⁶, 2009). As bactérias encontradas nestas regiões foram similares às espécies envolvidas na periodontite, incluindo as bactérias do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*) e laranja (*Fusobacterium sp.* and *Prevotella intermedia*) (Socransky et al.⁶¹, 1998). Espécies bacterianas como *P. gingivalis* and *P. intermedia* mostraram ter alta afinidade pelo titânio. Esta capacidade de se aderirem diretamente ao titânio poderia causar infecções na região peri-implantar (Kuula et al.³⁴, 2004). A inflamação em consequência da presença do biofilme bacteriano na região subgingival,

é considerada um dos principais responsáveis pela perda dos implantes após o processo de osseointegração (Hayek et al.²⁷, 2005; Elter et al.²⁰, 2008).

O tratamento da peri-implantite deve ser focada na descontaminação da superfície do implante e na regeneração dos tecidos perdidos (Schou et al.⁵⁹, 2004; Bautista, Huynh-Ba⁵, 2013). No entanto, o desenho e os tratamentos de superfície do titânio podem facilitar a adesão de bactérias e desenvolvimento de biofilme bacteriano (Schou et al.⁵⁹, 2004; Bautista, Huynh-Ba⁵, 2013). O tratamentos convencional, tal como o debridamento mecânico, é insuficiente para a remoção completa do biofilme (Karring et al.²⁹, 2005). Então, o uso de antibiótico pode ser indicado para potencializar a redução bacteriana desde exista o reconhecimento da etiologia infecciosa da doença. O metronidazol foi considerado o antibiótico de escolha, dada a sua capacidade de causar dano ao DNA bacteriano, especialmente em anaeróbios como *P. gingivalis* (Müller⁴⁷, 1983). Embora os antibióticos tenham seus benefícios, a utilização de grandes quantidades por longos períodos é indesejável na prática clínica devido aos efeitos adversos que causam na microbiota e ao aumento do potencial para induzir resistência.

Recentemente, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) foi introduzida como uma nova abordagem na descontaminação de superfície de implantes (Marotti et al.⁴⁰, 2008; Lima et al.³⁶, 2009). No processo fotodinâmico, a célula-alvo deve ser tratada com o fotossensibilizador (FS) de absorção máxima de luz específica, em um processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, a interação da luz com comprimento de onda adequado, com o FS e na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas de oxigênio capazes de induzir a morte celular. Esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva os elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela

transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies reativas (Bonnett, Martinez⁶, 2001) e, conseqüentemente, à morte celular. Estudos têm demonstrado que aPDT é mais eficaz na inativação de bactérias Gram-positivas que Gram-negativas, possivelmente pela estrutura química da parede celular das mesmas (Malik et al.³⁸, 1992). O efeito bactericida da aPDT associada ao azul de metileno (MB) foi avaliado em culturas planctônicas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *Prevotella Intermedia* e *Streptococcus. sanguis*. Os dados mostraram que as espécies Gram-negativas foram mais resistentes e *S. sanguis* foi a espécie mais suscetível (Chan, Lai⁹, 2003), sugerindo uma relação direta da composição química da parede celular com o fotossensibilizador utilizado. Estudos anteriores relataram que as suspensões de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* são suscetíveis a aPDT (Chan, Lai⁹, 2003; Habiboallah et al.²⁵, 2014). Por outro lado, não foi observada a inativação completa desses microrganismos, quando organizados em biofilmes (Street et al.⁶⁴, 2010). Estudos anteriores sugeriram que a aplicação prévia de aPDT associada a um antibiótico poderia potencializar a redução bacteriana (Di Poto et al.¹⁴, 2009; Barra et al.³, 2015; Ronqui et al.⁵⁵, 2016).

Atualmente, uma nova classe de FS vem sendo empregada em aPDT, os fotossensibilizadores de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine[®] (PDZ) é uma clorina e6 que mostrou ter efeito significativo em células tumorais (Corrêa¹¹, 2006). Em estudos preliminares (Dovigo et al.¹⁶, 2013; Quishida et al.⁵², 2015; Carmello et al.⁸, 2016) foi avaliado a eficácia da PDZ na fotoinativação de cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* isoladas de pacientes com estomatite protética. As suspensões foram tratadas com 25, 50 e 75mg/L de PDZ e expostas a luz LED a 37,5;

25,5 e 18,0J/cm² e os biofilmes foram tratados com maiores concentrações de PDZ (100 e 125mg/L). Os resultados demonstraram que a aPDT promoveu redução significativa na viabilidade da *C. tropicalis* e da *C. glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a aPDT. A maior redução do biofilme foi observada com a utilização de 125 mg/L de PDZ. Para *C. albicans*, houve uma redução de 62,1% enquanto para a *C. tropicalis* e *C. glabrata* foi observada uma redução de 76 e 76,9%, respectivamente (Dovigo et al.¹⁶, 2013). Quando um biofilme misto formado por *C. albicans*, *C. glabrata*, e *S. mutans* foi submetido a aPDT com o PDZ foi observada redução significativa na viabilidade das colônias das três espécies avaliadas, e redução significativa na atividade metabólica dos biofilmes submetidos a aPDT (Quishida et al.⁵², 2015). No tratamento da candidíase oral em um modelo murino, aPDT mediada por PDZ foi tão eficaz quanto a nistatina na inativação de *C. albicans* e apresentou regressão completa das lesões orais após seis aplicações (Carmello et al.⁸, 2016)

Apesar dos resultados promissores, seria interessante o desenvolvimento de estratégias que aumentassem a suscetibilidade dos microrganismos aos métodos antibacterianos já conhecidos (Di Poto et al.¹⁴, 2009; Ronqui et al.⁵⁵, 2016). A avaliação do pré-tratamento do biofilme maduro de *Streptococcus aureus* com aPDT seguida pela aplicação de vancomicina reduziu significativamente a concentração bacteriana, sugerindo que aPDT poderia provocar a desintegração da matriz extracelular e, conseqüentemente, aumentaria a suscetibilidade ao antibiótico (Di Poto et al.¹⁴, 2009). Em biofilmes de *S. aureus* e *Escherichia coli* resultados significativos também foram observados na combinação entre aPDT e o ciprofloxacino, com redução de 5.4 Log₁₀ para *S. aureus* e aproximadamente 7 Log₁₀ para *E. coli* (Ronqui et al.⁵⁵, 2016).

Até o presente momento, os autores não localizaram informações de aPDT mediada pela PDZ sobre bactérias periodontopatogênicas, tão pouco sobre a influência

no tratamento com antibióticos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo será avaliar se a aplicação da aPDT poderia atuar no biofilme bacteriano formado pela *P. gingivalis* e *F. nucleatum* e favorecer a suscetibilidade destas bactérias ao antibiótico MTZ.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais avaliadas, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O período de 24 horas de adesão seguido de 5 dias de formação de biofilme é satisfatório para a formação de biofilme maduro mono-espécie de *F. nucleatum* e *P. gingivalis*;
- A aPDT (PDZ 100 mg/L) associada ao MTZ100x promoveu uma redução significativa de UFC/mL para *F. nucleatum* e *P. gingivalis*, com redução de 3.94 e 5 Log₁₀, respectivamente;
- A aplicação de aPDT associada ao MTZ foi potencializada quando comparada aos tratamentos isoladamente.

REFERÊNCIAS*

1. Barra F, Roscetto E, Soriano AA, Vollaro A, Postiglione I, Pierantoni GM, et al. Photodynamic and antibiotic therapy in combination to fight biofilms and resistant surface bacterial infections. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(9): 20417-30.
2. Baumgartner JC, Falkler W, Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Mol Oral Microbiol.* 1992; 7(4): 253-6.
3. Bautista L, Huynh-Ba G. In patients with peri-implantitis, access flap surgery may be more effective than mechanical debridement in terms of clinical attachment gain although both treatments lead to improved clinical parameters. *Texas Dent J.* 2013; 130(11): 1112.
4. Bonnett R, Martinez G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 2001; 57(47): 9513-47.
5. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun;* 66(10): 4729-32.
6. Carmello JC, Alves F, Basso FG, de Souza Costa CA, Bagnato VS, de Oliveira Mima EG, et al. Treatment of Oral Candidiasis using Photodithazine®-Mediated Photodynamic Therapy in vivo. *PloS one.* 2016; 11(6): e0156947.
7. Chan Y, Lai C-H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med sci.* 2003; 18(1): 51-5.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaomarco-2015.pdf>

8. Corrêa JC. Fotodegradação do Photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser [tese de doutorado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2006.
9. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. 2009; 30(18): 3158-66.
10. Dovigo LN, Carmello J, Carvalho M, Mima E, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*. 2013; 29(9): 1057-67.
11. Ebersole J, Machen R, Steffen M, Willmann D. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol*. 1997; 107(2): 347-52.
12. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach F-W, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 23(2): 327-34.
13. Evans DJ, Allison DG, Brown MRW, Gilbert P. Growth rate and the resistance of Gram-negative biofilms to ceftrimide. *J Antimicrob Chemother*. 1990; 26(4):473–8.
14. Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Steffen M, Holt SC. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun*. 1996; 64(6): 2094-100.
15. Gursay H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yılmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest*. 2013; 17(4): 1113-25.

16. Habiboallah G, Mahdi Z, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Sina F, Majid Z. Bactericidal effect of visible light in the presence of erythrosine on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* compared with diode laser, an in vitro study. *Laser Ther.* 2014; 23(4): 263-71.
17. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27(6): 409-19.
- ap18. Hayek RR, Araújo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada Jr AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol.* 2005; 76(8): 1275-81.
19. Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B, Karring T. Treatment of peri-implantitis by the Vector® system. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16(3): 288-93.
20. Kolenbrander PE, Andersen RN. Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. *Infect Immun.* 1989; 57(10): 3204-9.
21. Kuula H, Könönen E, Lounatmaa K, Konttinen YT, Könönen M. Attachment of oral gram-negative anaerobic rods to a smooth titanium surface: an electron microscopy study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19(6): 803-9.
22. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242(2): 345-51.

23. Lima JP, Sampaio de Melo MA, Borges F, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre dos Santos M, et al. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117(5): 568-74.
24. 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.
25. Marotti J, Pigozzo MN, Nakamae AEM, Tortamano Neto P, Laganá DC, Campos TNd. Terapia fotodinâmica no tratamento da periimplantite. *ImplantNews.* 2008; 5(4): 401-5.
26. Metzger Z, Lin Y-Y, Dimeo F, Ambrose WW, Trope M, Arnold RR. Synergistic pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in the mouse subcutaneous chamber model. *J Endod.* 2009; 35(1): 86-94.
27. Mombelli A, Mericske-ster R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Implants Res.* 1990; 1(1): 1-7.
28. Mombelli A, Oosten M, Schürch E, Lang N. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Mol Oral Microbiol.* 1987; 2(4): 145-51.
29. Müller M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery.* 1983; 93(1 Pt 2): 165-71.
30. Quishida CCC, Carmello JC, de Oliveira Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2): 685-94.
31. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(7): 979-86.

32. Ronqui MR, de Aguiar TMSF, de Freitas LM, Miranda ET, Fontana CR. Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 158(5): 122-9.
33. Rosen P, Clem D, Cochran D, Froum S, McAllister B, Renvert S, et al. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnoses and clinical implications. *J Periodontol*. 2013; 84(4): 436-3.
34. Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19(7): 140-9.
35. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra-and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(10): 975-82.
36. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent R. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2): 134-44.
37. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002; 28(1): 12-55.
38. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6(3): 199-210.
39. Street CN, Pedigo LA, Loebel NG. Energy dose parameters affect antimicrobial photodynamic therapy-mediated eradication of periopathogenic biofilm and planktonic cultures. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(S1): S-61-S-6.
40. Sundqvist GK, Eckerbom M, Larsson A, Sjögren U. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun*. 1979; 25(2): 685-93.
41. Tabanella G, Nowzari H, Slots J. Clinical and microbiological determinants of failing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009; 11(1): 24-36.