



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



Julio Cesar Sánchez Puetate

**Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica
antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e
in vitro**

Araraquara

2020



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



Julio Cesar Sánchez Puetate

Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Coorientadora: Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidório

Araraquara

2020

Sánchez Puetate, Julio Cesar

Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro / Julio Cesar Sánchez Puetate.-- Araraquara: [s.n.], 2020

64f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

Coorientadora: Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidório

1. Fotoquimioterapia 2. Biofilmes 3. Periodontite

I.Título

Julio Cesar Sánchez Puetate

Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

2º Examinador: Profa. Dra. Leticia Helena Theodoro

3º Examinador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Araraquara, 30 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Julio Cesar Sánchez Puetate

NASCIMENTO	02 de Maio de 1990 – Quito – Equador
FILIAÇÃO	Rosa de las Nieves Puetate Llerena Julio César Sánchez Zambrano
2008-2013	Graduação em Odontologia Universidad Central del Ecuador - Equador
2015-2017	Especialização em Periodontia Universidad San Francisco de Quito - Equador
2017-2019	Especialização em Implantodontia Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia Faculdade Herrero
2018-Atual	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia – Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Aos meus Pais,
que iluminam meu caminho com o coração cheio de amor e paciência, pela
compreensão, por aceitarem e apoiarem a minha escolha neste caminho, as
palavras não são suficientes para descrever todo o amor que sinto por vocês, muito
obrigado por sonhar comigo.

Aos meus irmãos,
pelo suporte incondicional mesmo com a distância e as saudades, vocês sempre
serão parte das minhas conquistas.

Aos meus sobrinhos,
que me inspiram com o brilho de suas miradas e a ingenuidade de seus sorrisos,
vocês são a minha grande inspiração.

Ao meu avô.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, pela confiança para a realização desta pesquisa, pela motivação e por sua valiosa orientação, por suas contribuições científicas e humanas para me formar plenamente durante esse período.

À Profa. Denise Madalena Palomari Spolidorio, pela solicitude e pela oportunidade de fazer parte da equipe do laboratório de Microbiologia, por guiar os passos nesse novo desafio que foi trabalhar num laboratório.

À Profa. Janice Rodrigues Perussi e ao Prof. Anderson Ribeiro de Oliveira, pela síntese dos fotossensibilizadores, para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Alessandra Rastelli, pelo empréstimo do equipamento para o desenvolvimento da parte do projeto.

À Patty Maquera Huacho, por toda a paciência, e pelos ensinamentos transmitidos, fico muito grato por ter tido a oportunidade de compartilhar essa fase da minha formação acadêmica ficando perto de você, obrigado pela compreensão das minhas limitações durante este período.

Ao Gabriel e José Rodolfo, companheiros e grandes amigos, por seus valiosos conselhos e tornar esta etapa acadêmica mais suportável, com todas as experiências e memórias.

À Beatriz Aroni, pela ajuda com parte do desenvolvimento deste trabalho, tendo sempre interesse em crescermos juntos.

Aos meus amigos David, Luis e Javier amizade de longa data e irmãos que a vida me deu, apesar da distância, minha gratidão pelo apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Edson Alves de Campos e Vice-Diretora, Profa. Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia, pela oportunidade e infra-estrutura oferecidas para à realização deste projeto.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, José Alexandre e Cristiano, pela sua atenção.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2016/00275-8) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles
são a abertura para achar as que estão certas.
Carl Sagan*

* Sagan C. Pálido ponto azul. Rio de Janeiro: Companhia das Letras; 2019.

Sánchez-Puetate JC. Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (antimicrobial Photodynamic Therapy – aPDT), tem sido utilizada como uma terapia coadjuvante na doença periodontal (DP). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antimicrobianos da aPDT, com os fotossensibilizadores Hipericina-glucamina (Hy-g) e Ftalocianina-glucamina (Ft-g), no tratamento e progressão da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos, assim como sobre um modelo de biofilme multiespécie in vitro. Os micro-organismos avaliados foram *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, ATCC 33277), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*, JP2), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*, ATCC25586), e *Streptococcus oralis* (*S. oralis*, ATCC 35037). Dois estudos distintos foram conduzidos. No Estudo 1, foi avaliado in vivo a viabilidade dos micro-organismos mediante o modelo da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos após 7 dias de indução da DP. Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais (n=8): Grupo Controle; Ftalocianina-glucamina (Ft-g); Hipericina-glucamina (Hy-g); LED vermelho (LV, 655nm; 34 J/cm²); LED âmbar (LA, 590nm; 34,10 J/cm²); aPDT 1 (aPDT-Hy-g + LA); aPDT 2 (aPDT-Ft-g + LV). Os animais foram eutanasiados com 7 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos no período baseline. No Estudo 2, foi avaliado in vitro a viabilidade dos micro-organismos mediante o modelo de biofilme multiespécie, as amostras foram divididas em 8 grupos experimentais: Controle Negativo; Controle Positivo (clorexidina 0,12%); Ftalocianina-glucamina (Ft-g); Hipericina-glucamina (Hy-g); LED Vermelho (LED-V, 660nm; 39,65 J/cm²); LED Âmbar (LED-A, 590nm; 39,30 J/cm²); aPDT 1 (aPDT-Ft-g + LV); aPDT 2 (aPDT-Hy-g + LA), três experimentos independentes foram realizados em triplicata (n=9). Para os dois estudos foi analisada a quantificação individual dos micro-organismos pela técnica de qPCR combinada com Propidium Monoazide (PMA). Os dados foram submetidos a análise estatística ($\alpha=0,05$). Os resultados do modelo in vivo no período baseline quando comparados os grupos aPDTs com o grupo controle negativo para *P. gingivalis* foram, no grupo controle ($6,89 \pm 0,11$), aPDT 1 ($6,74 \pm 0,26$), aPDT 2 ($5,88 \pm 0,42$); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle ($9,98 \pm 0,20$), aPDT 1 ($9,76 \pm 0,42$), aPDT 2 ($9,10 \pm 0,43^*$); para *A. actinomycetemcomitans* foram, no grupo controle ($9,75 \pm 0,54$), aPDT 1 ($10,25 \pm 0,47^*$), aPDT 2 ($9,57 \pm 0,14$); para *So* foram, no grupo controle ($2,62 \pm 0,30$), aPDT 1 ($2,28 \pm 0,30^*$), aPDT 2 ($2,12 \pm 0,14^*$); no período de 7 dias para *P. gingivalis* foram, no grupo controle ($6,08 \pm 0,39$), aPDT 1 ($7,13 \pm 0,18^*$), aPDT 2 ($6,73 \pm 0,35$); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle ($8,39 \pm 0,27$), aPDT 1 ($9,45 \pm 0,29^*$), aPDT 2 ($9,42 \pm 0,11^*$); para *A. actinomycetemcomitans* foram, no grupo controle ($8,75 \pm 0,30$), aPDT 1 ($8,36 \pm 0,27$), aPDT 2 ($8,44 \pm 0,44$); para *So* foram, no grupo controle ($2,55 \pm 0,26$), aPDT 1 ($2,66 \pm 0,20$), aPDT 2 ($2,75 \pm 0,28$); no período de 30 dias para *P. gingivalis* foram, no grupo controle ($6,98 \pm 0,31$), aPDT 1 ($6,95 \pm 0,39$), aPDT 2 ($6,67 \pm 0,38$); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle ($9,18 \pm 0,59$), aPDT 1 ($9,41 \pm 0,42$), aPDT 2

(9,26 $\pm$ 0,33); para *A. actynomicetemcomitans* foram, no grupo controle (8,75 $\pm$ 0,34), aPDT 1 (8,39 $\pm$ 0,35*), aPDT 2 (7,80 $\pm$ 0,75*); para *S. oralis* foram, no grupo controle (2,62 $\pm$ 0,35), aPDT 1 (2,93 $\pm$ 0,44), aPDT 2 (2,98 $\pm$ 0,26). Os resultados do modelo in vitro quando comparados os grupos aPDTs com o grupo controle negativo para *A. actynomicetemcomitans* foram, no grupo controle negativo (8,77 $\pm$ 0,93), aPDT 1 (6,74 $\pm$ 0,74*), aPDT 2 (9,05 $\pm$ 0,70); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle negativo (8,99 $\pm$ 0,84), aPDT 1 (7,42 $\pm$ 0,52*), aPDT 2 (12,24 $\pm$ 0,42*); para *P. gingivalis* foram, no grupo controle negativo (6,60 $\pm$ 0,33), aPDT 1 (5,77 $\pm$ 0,58*), aPDT 2 (7,63 $\pm$ 0,23); para *S. oralis* foram, no grupo controle negativo (8,81 $\pm$ 0,49), aPDT 1 (8,34 $\pm$ 0,65), aPDT 2 (9,78 $\pm$ 0,20).

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. Biofilmes. Periodontite.

Sánchez-Puetate JC. Evaluation of different photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of induced periodontal disease: in vivo and in vitro study [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Antimicrobial Photodynamic Therapy (antimicrobial Photodynamic Therapy - aPDT), has been used as an adjunct therapy in periodontal disease (PD). The objective of this work was to evaluate the antimicrobial effects of aPDT, with the photosensitizers Hypericin-glucamine (Hy-g) and Phthalocyanine-glucamine (Ft-g), in the treatment and progression of experimentally induced periodontal disease in rats, as well as on a model of multispecies biofilm in vitro. The microorganisms evaluated were *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, ATCC 33277), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*, JP2), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*, ATCC25586), e *Streptococcus oralis* (*S. oralis*, ATCC 35037). Two separate studies were conducted. In Study 1, the viability of microorganisms was evaluated in vivo using the periodontal disease model experimentally induced in rats after 7 days of PD induction. The animals were divided into 7 experimental groups (n = 8): Control Group; Phthalocyanine-glucamine (Ft-g); Hypericin-glucamine (Hy-g); Red LED (LV, 655nm; 34 J / cm²); Amber LED (LA, 590nm; 34.10 J / cm²); aPDT 1 (aPDT-Hy-g + LA); aPDT 2 (aPDT-Ft-g + LV). The animals were euthanized 7 and 30 days after the application of the treatments in the baseline period. In Study 2, the viability of microorganisms was evaluated in vitro using the multispecies biofilm model, the samples were divided into 8 experimental groups: Negative Control; Positive Control (0.12% chlorhexidine); Phthalocyanine-glucamine (Ft-g); Hypericin-glucamine (Hy-g); Red LED (LED-V, 660nm; 39.65 J / cm²); Amber LED (LED-A, 590nm; 39.30 J / cm²); aPDT 1 (aPDT-Ft-g + LV); aPDT 2 (aPDT-Hy-g + LA), three independent experiments were carried out in triplicate (n = 9). For both studies, the individual quantification of microorganisms was analyzed using the qPCR technique combined with Propidium Monoazide (PMA). The data were submitted to statistical analysis ($\alpha = 0.05$). The results of the in vivo model in the baseline period when comparing the aPDTs groups with the *P. gingivalis* negative control group were, in the control group (6.89 ± 0.11), aPDT 1 (6.74 ± 0.26), aPDT 2 (5.88 ± 0.42); for *F. nucleatum*, in the control group (9.98 ± 0.20), aPDT 1 (9.76 ± 0.42), aPDT 2 (9.10 ± 0.43 *); for *A. actinomycetemcomitans*, in the control group (9.75 ± 0.54), aPDT 1 (10.25 ± 0.47 *), aPDT 2 (9.57 ± 0.14); for *S. oralis*, in the control group (2.62 ± 0.30), aPDT 1 (2.28 ± 0.30 *), aPDT 2 (2.12 ± 0.14 *); in the 7-day period for *P. gingivalis*, in the control group (6.08 ± 0.39), aPDT 1 (7.13 ± 0.18 *), aPDT 2 (6.73 ± 0.35); for *F. nucleatum*, in the control group (8.39 ± 0.27), aPDT 1 (9.45 ± 0.29 *), aPDT 2 (9.42 ± 0.11 *); for *A. actinomycetemcomitans*, in the control group (8.75 ± 0.30), aPDT 1 (8.36 ± 0.27), aPDT 2 (8.44 ± 0.44); for *S. oralis*, in the control group (2.55 ± 0.26), aPDT 1 (2.66 ± 0.20), aPDT 2 (2.75 ± 0.28); in the 30-day period for *P. gingivalis*, in the control group (6.98 ± 0.31), aPDT 1 (6.95 ± 0.39), aPDT 2 (6.67 ± 0.38); for *F. nucleatum*, in the control group (9.18 ± 0.59), aPDT 1 (9.41 ± 0.42), aPDT 2 (9.26 ± 0.33); for *A. actinomycetemcomitans*, in the control group (8.75 ± 0.34), aPDT 1 (8.39 ± 0.35 *), aPDT 2 (7.80 ± 0.75 *); for *S. oralis*, in the control group (2.62 ± 0.35), aPDT 1 (2.93 ± 0.44), aPDT 2 (2.98 ± 0.26). The results of the in vitro model when comparing the aPDTs groups with the negative

control group for *A. actynomicetemcomitans* were, in the negative control group (8.77 ± 0.93), aPDT 1 (6.74 ± 0.74 *), aPDT 2 (9.05 ± 0.70); for *F. nucleatum*, in the negative control group (8.99 ± 0.84), aPDT 1 (7.42 ± 0.52 *), aPDT 2 (12.24 ± 0.42 *); for *P. gingivalis*, in the negative control group (6.60 ± 0.33), aPDT 1 (5.77 ± 0.58 *), aPDT 2 (7.63 ± 0.23); for *S. oralis*, in the negative control group (8.81 ± 0.49), aPDT 1 (8.34 ± 0.65), aPDT 2 (9.78 ± 0.20).

Keywords: Photochemotherapy. Biofilms. Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Estudo In Vivo.....	26
4.2 Estudo In Vitro	32
4.3 Análise Estatística Modelo Biofilme In Vivo	37
4.4 Análise Estatística Modelo Biofilme Multiespécie In Vitro	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Efeitos Da aPDT No Modelo Biofilme In Vivo	39
5.2 Efeitos Da aPDT No Modelo De Biofilme Multiespécie In Vitro.....	42
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	62
APÊNDICE A –RESULTADOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

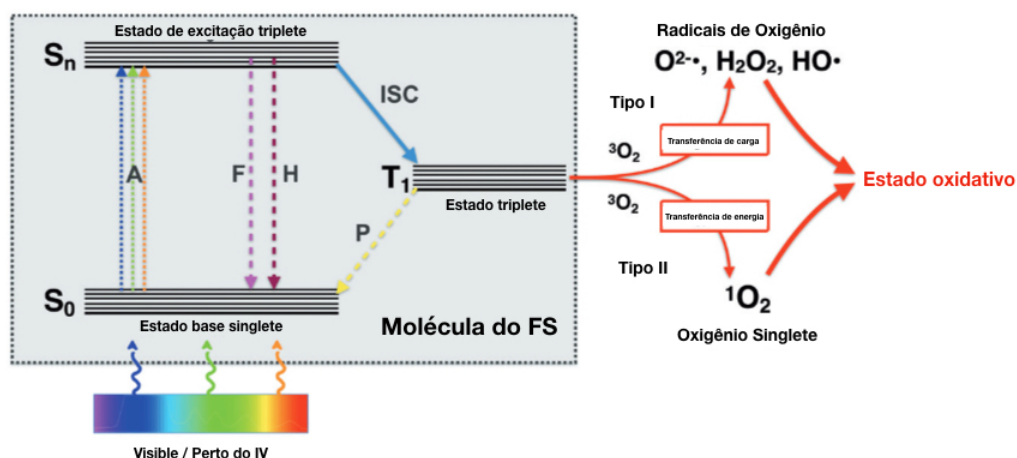
O entendimento da patogênese das doenças e condições periodontais está continuamente mudando com o aumento do conhecimento científico. A Periodontite é definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por grupos de micro-organismos específicos, sítio-específica e caracterizada por sinais clínicos como inflamação, sangramento à sondagem e perda de inserção^{1,2}.

A terapia periodontal visa reduzir a carga microbiana, mediante remoção mecânica do biofilme para impedir ou retardar a progressão da doença periodontal³ e atualmente o tratamento mais usado é a remoção e desorganização do biofilme, sendo a Raspagem e o Alisamento Radicular (RAR) a terapia não-cirúrgica de escolha. Os resultados clínicos obtidos com RAR são, em geral, satisfatórios⁴⁻⁶. No entanto, esta terapia pode apresentar limitações em determinados quadros clínicos, assim, novas terapias têm surgido como alternativas terapêuticas^{7,8}.

Sabendo da crescente resistência de algumas cepas bacterianas pelo uso de antibióticos e do interesse em buscar estratégias terapêuticas que apresentem pouco ou nenhum efeito colateral, nos últimos anos, vêm sendo utilizadas terapias com fontes de luzes (Lasers e LEDs) para o tratamento das doenças periodontais⁸. Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – Photodynamic Antimicrobial Therapy) tem relevância por ser um procedimento coadjuvante pela sua ação antimicrobiana e pela pouca invasividade. Vários estudos têm comprovado a eficácia da aPDT, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*⁹⁻¹⁵, porém ainda não existe consenso para benefícios da aPDT.

A aPDT como mostrado na Figura 1, consiste na utilização de um fotossensibilizador (FS) associado a uma fonte de luz (LASER/LED), capaz de excitar o FS formando radicais livres e espécies altamente reativas de oxigênio, que subsequentemente produzem a morte bacteriana e destruição dos seus subprodutos^{14,16}. A aPDT apresenta segurança na sua utilização, devido aos seus produtos e subprodutos não serem citotóxicos com células não alvo (aonde o FS não teve permeabilidade)¹⁷.

Figura 1 – Diagrama de Jablonski



Fonte: Adaptado de Cieplik et al.¹⁸ 2018 para o português.

Estudos tem demonstrado que a aPDT é uma terapia coadjuvante no tratamento da periodontite crônica, retratamento de bolsas residuais, coadjuvante na terapia cirúrgica, terapia de manutenção, dentre outros^{19–21}. Sua indicação na terapia de manutenção tem como vantagem o menor desgaste da superfície radicular, neste caso reduzindo a incidência da hipersensibilidade dentinária causada pela remoção excessiva do cimento radicular nas sessões de manutenção de RAR²².

Os estudos do grupo de pesquisa de Garcia et al.¹² e Theodoro et al.²² que avaliaram a utilização da terapia fotodinâmica em associação a raspagem e alisamento radicular, em vários modelos, concluíram que a aplicação de aPDT como tratamento adjunto à RAR reduziu significativamente os níveis de *A. actinomycetemcomitans*, além de observarem menor perda óssea em área de furca quando realizada apenas uma aplicação da aPDT.

Vários FS estão mencionados na literatura, sendo as fenotiazinas como o azul de metileno e azul de toluidina os mais citados, porém estes estudos não têm demonstrado vantagens clínicas no tratamento periodontal^{23,24}, indicando, desta forma, a necessidade de novos estudos com objetivo de testar novos FS.

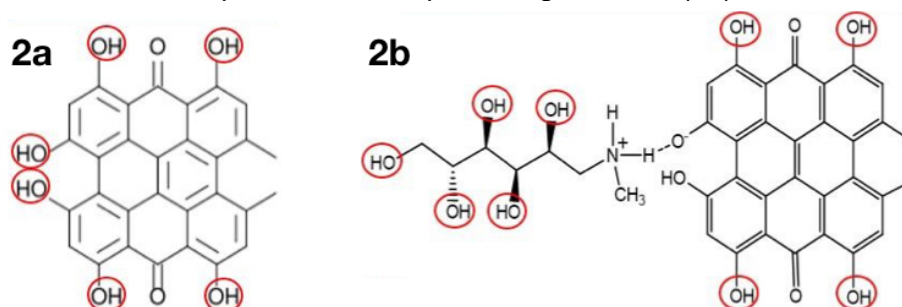
A literatura mostra que as bactérias Gram-positivas (G+) podem ser eliminadas por diversos FS e doses mais baixas de irradiação do que bactérias

Gram-negativas (G-)^{25,26}. Os parâmetros importantes do FS para esta interação bacteriana incluem: solubilidade relativa em água e lipídios, capacidade de ionização, fatores específicos como as características de absorção de luz, e a eficiência da formação do estado excitado tripleto ou da produção de oxigênio singleto²⁶⁻²⁸.

Portanto, para uma maior eficiência da inativação dos micro-organismos, essas diferenças devem ser superadas modificando o FS quanto a sua hidrofobicidade e carga, de acordo com a característica celular de cada micro-organismo²⁶. A importância da hidrofobicidade baseia-se que em meio aquoso leva à autoagregação e, em muitos casos, a uma subsequente precipitação, reduzindo drasticamente a capacidade do composto de gerar espécies reativas de oxigênio, desse modo, é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solúvel em meio aquoso para possível aplicação clínica.

A Hipericina (Figura 2) é um FS natural, presente em plantas herbáceas conhecidas como erva de São João (gênero *Hypericum perforatum*)²⁹. Possui propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, anti-infecciosas, antivirais, estimula a circulação sanguínea e elimina hematomas²⁹⁻³³. É considerada uma quinona policíclica (Figura 2a) que, quando ativada, reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio, induzindo a produção do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), além de ser potente e fotoestável^{32,34,35}.

Figura 2 - Estrutura química da Hipericina: estrutura base da Hipericina (2a), e sua espécie supramolecular Hipericina-glucamina (2b)



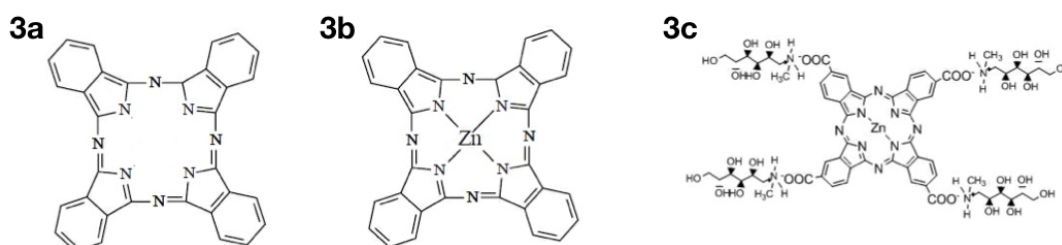
Fonte: Macedo et al.³⁶

O FS Hipericina possui característica hidrofóbica e, perde a sua ação quando em meio biológico. Uma estratégia proposta para melhorar o comportamento químico é a indução da formação de espécies supramoleculares hidrofílicas. Uma supramolécula é uma espécie química constituída por duas ou mais moléculas, unidas por interações moleculares, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade³⁷. No caso da Hipericina, para a formação de uma supramolécula hidrofílica, é induzida uma reação a partir do grupo fenólico, que cede o próton H⁺, formando a Hipericina-glucamina (Figura 2b).

A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula Hipericina-glucamina, fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio serão estabelecidas, aumentando sua hidrofiliidade. Em estudos prévios *in vitro*, foram avaliadas diferentes concentrações do FS Hipericina. Os resultados mostraram que a concentração de 10 mg/mL foi capaz de eliminar bactérias G⁺ e G⁻²⁶.

As Ftalocianinas (Figura 3), que são corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azaporfirinas³⁸ têm sido estudadas e avaliadas suas aplicações³⁹⁻⁴¹. A Ftalocianina é um macrociclo simétrico composto por quatro unidades iminoisoindol com uma cavidade central de tamanho suficiente para acomodar vários íons metálicos e este metal central possui influência considerável em sua propriedade fotossensibilizadora^{38,42}. 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 singlete⁴⁰. A eficácia desse FS 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*⁴¹. Outros estudos⁴³⁻⁴⁷ têm corroborado a eficiência das Ftalocianinas como agentes fotossensíveis na eliminação de micro-organismos periodonto patogênicos com uso em aPDT.

Figura 3 - Estrutura química da Ftalocianina: Estrutura base da Ftalocianina (3a), Ftalocianina acomodando o íon metálico zinco (3b), e a sua espécie supramolecular Ftalocianina-glucamina (3c)



Fonte: de Melo et al.⁴⁸

Portanto, observa-se que a utilização da aPDT demonstrou efeito antimicrobiano contra vários periodonto patogênicos^{49,50}, além de ser capaz de reduzir fatores-chave de virulência como lipopolissacarídeos e proteases^{49,51,52}, e inativar citocinas inflamatórias do hospedeiro, tais como interleucina 1 β e TNF α ⁵¹.

Conhecendo as propriedades dos FS Hipericina-glucamina e Ftalocianina-glucamina, os objetivos deste estudo foram avaliar in vivo (modelo de doença periodontal induzida em ratos) a viabilidade das bactérias periodonto patogênicas presentes nas ligaduras dos animais após o tratamento com aPDT nos diferentes períodos, utilizando a técnica de qPCR (PCR quantitativo em tempo real) em combinação com Propidium Monoazide (PMA), e in vitro, avaliar a viabilidade das bactérias periodonto patogênicas (modelo de biofilme multiespécie) após o tratamento com aPDT, utilizando a técnica de qPCR (PCR quantitativo em tempo real) em combinação com PMA.

2 PROPOSIÇÃO

Hipótese: A aPDT mediada pelos fotossensibilizadores Hipericina-glucamina e Ftalocianina-glucamina promove redução na viabilidade microbiana e possibilita melhores resultados no tratamento da doença periodontal.

Estudo 1: Avaliar a viabilidade das bactérias periodontopatogenicas presentes nas ligaduras dos animais após o tratamento com aPDT mediada pelos fotossensibilizadores Hipericina-glucamina e Ftalocianina-glucamina, utilizando a técnica de PMA-qPCR.

Estudo 2: Avaliar in vitro a viabilidade das bactérias periodontopatogenicas após o tratamento com aPDT mediada pelos fotossensibilizadores Hipericina-glucamina e Ftalocianina-glucamina, utilizando a técnica de PMA-qPCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Periodontite, juntamente com cárie dentária, são as doenças bucais mais comuns e ambas podem levar à perda dentária. É relatado que a prevalência de periodontite varia de 31% a 76%⁵³. Os biofilmes orais, compostos por espécies bacterianas patogênicas e seus fatores de virulência, são bem estabelecidos como o principal agente etiológico das doenças periodontais⁵⁴. Microrganismos como *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, são frequentemente encontrados em locais periodontais com sinais de doença⁵⁵. Essas bactérias desencadeiam uma resposta inflamatória exacerbada e consequente progressão da gravidade da doença⁵⁶.

O uso excessivo, negligenciado e descontrolado de antibióticos levou a comunidade científica a uma exploração interminável de novas abordagens terapêuticas, uma vez que o desenvolvimento de resistência bacteriana a agentes antimicrobianos convencionais é apenas uma questão de tempo. As infecções triviais logo se tornarão intratáveis para os medicamentos atualmente disponíveis⁵⁷. O relatório da Organização Mundial da Saúde de 2014 (OMS) alerta para a era pós-antibiótica, seguida por uma demanda crescente e urgente de ações coordenadas contra infecções microbianas⁵⁸. A aPDT surge como uma alternativa promissora contra essa ameaça⁵⁹.

Sob excitação da luz, um FS aumenta sua energia e, a partir deste ponto, o mecanismo aPDT pode atuar em duas vias: tipo I a energia do FS induz a formação de radicais na presença de substratos ricos em elétrons e envolve moléculas biológicas são atacadas; tipo II é dependente de oxigênio, o FS excitado transfere sua energia diretamente para o oxigênio molecular que o cerca, formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), responsável pelo maior efeito antimicrobiano da aPDT^{60,61}, a mesma terapia já provou ser eficaz para câncer e diferentes doenças infecciosas⁶². Comparado às terapias antimicrobianas convencionais, aPDT mostra algumas vantagens: efeito em múltiplos alvos celulares, é por essa razão que o desenvolvimento da resistência não foi relatado até o momento; início imediato da ação; entrega local; invasividade mínima e fraca repercussão; e lavagem rápida⁶³⁻⁶⁶.

Em termos de periodontite, aPDT provou ser seguro e eficaz como um complemento ao tratamento convencional da doença periodontal em vários estudos⁶⁷⁻⁶⁹.

O biofilme subgengival, que pode ser até 1000 vezes mais difícil de interromper⁷⁰ a drenagem do fluido gengival crevicular e a rotatividade do fluido da saliva⁷¹ e o difícil acesso aos locais afetados são os principais desafios para o controle químico do mesmo. Portanto, a remoção mecânica continua sendo o tratamento essencial e fundamental para a periodontite, enquanto as alternativas químicas/fotoquímicas precisam de melhorias. Os avanços na aPDT foram estudados principalmente através da adição de veículo de nanopartículas e modificação das cargas^{64,71-73} efeito sinérgico com peptídeos antimicrobianos⁷⁴ e otimização do regime de luz⁷⁵ onde a modificação das cargas é um dos objetivos a ser avaliado neste estudo.

Como mencionado anteriormente, o principal mecanismo da aPDT para induzir a morte bacteriana, é dado pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)^{50,76}, para cada espécie bacteriana essa formação de ROS é diferente, e no biofilme a dificuldade para atingir as camadas mais profundas é uma das grandes limitações da terapia. Cieplik et al.⁷⁷, afirmaram que as bactérias podem desenvolver mecanismos de defesa para desintoxicação desses ROS por agentes altamente específicos e vias enzimáticas⁷⁸⁻⁸⁰.

A seleção do FS é essencial para alcançar resultados positivos com a aPDT, sabendo disso, e como mencionado anteriormente, neste estudo foram utilizados dois FS de diferente natureza, Hipericina-glucamina (Hy-g) de origem natural e Ftalocianina-glucamina (Ft-g) de origem sintética. Estes fotossensibilizadores foram utilizados em estudos anteriores⁸¹ por este grupo, entre os resultados obtidos verificou-se que a dose utilizada (10mg/ml) oferece segurança sobre os tecidos periodontais.

As primeiras fontes luminosas utilizadas em aPDT foram lâmpadas convencionais, com luz não-coerente, policromática e forte componente térmico. Com a descoberta e desenvolvimento do LASER (do inglês, Light Amplification Stimulated Emission of Radiation), tornou-se possível o uso de luz homogênea de

baixa intensidade para ativar a reação fotodinâmica⁸² e posteriormente a introdução do LED (do inglês, Light Emitting Diode) neste processo.

Os LEDs possuem diferenças sobre o laser para o uso clínico: emitem uma combinação de comprimentos de onda ideal para reparo de feridas, podem ser dispostos em arranjos grandes e achatados permitindo irradiação de uma superfície extensa e tridimensional e homogeneidade entre densidade de energia, potência e área de campo irradiado⁸³.

As principais características dos LEDs são: longa durabilidade, baixo custo, circuitos eletrônicos mais simples e confiáveis, não geração de calor, dimensões reduzidas, temperatura de cor (expressa a aparência de cor da luz emitida pela fonte de luz), alta eficiência energética (quase toda energia fornecida para o LED é transformada em luz e uma pequena porção é perdida na forma de calor)⁸⁴. A luz emitida pelos LEDs é monocromática, não-coerente (emissão estimulada gera fótons que se propagam em diferentes direções no tempo e no espaço), não colimada (feixe de luz não é unidirecional), menos concentrada que a radiação do laser e mais que a luz comum⁸. Atualmente, há LEDs capazes de emitir luz no modo contínuo e pulsátil⁸⁵. Tem sido válido investigar o valor e os benefícios dos LEDs como fonte de luz alternativa para a fototerapia⁸⁵⁻⁸⁷. Adicionalmente, como o LED emite pouco calor e em potências ideais consegue obter boa penetração nos tecidos, levando a um mínimo risco de dano térmico ao tecido epitelial, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso de LEDs para testes terapêuticos em humanos. Entretanto, há poucas evidências sobre o efeito modulatório do LED⁸⁸⁻⁹⁰. Com isso, apesar da fototerapia LED ser sugerida para melhorar o processo de reparo de feridas^{91,92} suas vantagens e benefícios ainda são controversos⁹². Mais estudos são necessários para consolidar a combinação ideal de comprimento de onda, densidade de energia, potência, bem como trabalhos que avaliem os questionamentos sobre os mecanismos do efeito da luz LED⁸⁶ e estudos que investiguem os efeitos biomodulatórios desta luz em relação a luz laser nos diversos âmbitos e tecidos biológicos⁹³.

O FS ideal para a aPDT deve possuir os seguintes requisitos: ser quimicamente puro e de composição conhecida, atóxicos ou de baixa toxicidade, ser

biologicamente estável, inativos em seu estado fundamental, ser preferencialmente retido pelo tecido alvo, ser rapidamente excretado pelo corpo (para prover baixa toxicidade sistêmica), ter alta eficiência quântica para o evento fotoquímico, ter forte absorção com um alto coeficiente de excitação na faixa de 600-800nm (onde a penetração de luz no tecido está no máximo) e o comprimento de onda da luz deve permanecer energético o suficiente para produzir o oxigênio singlete^{82,94-96}.

Um fato importante é quanto à hidrofobicidade que alguns FS 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 singlete²⁶. Desse modo é necessário que o princípio fotoativo se apresenta 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 funcionalidade⁴⁸. A meglumina, conhecida também como N-metilglucamina é um aminocarboidrato derivado da glicose capaz de formar espécies supramoleculares binárias hidrofílicas com compostos que possuam em sua estrutura átomos de hidrogênio ácidos⁴⁸.

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 (FtZnTc)⁴⁸. 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 para a Ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina (FtZnTcG). A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio são estabelecidas aumentando a hidrofiliabilidade das Ftalocianinas⁴⁸.

Os FS mais estudados na erradicação de microrganismos pertencem a diferentes grupos de compostos. Na aPDT, os principais são: fenotiazínicos (azul de toluidina e azul de metileno), eritrosina, conjugados de clorina, derivados de hematoporfirinas e fitoterápicos⁵⁹. Nas últimas décadas, foram desenvolvidos compostos considerados como a segunda geração de corantes, com propósitos diagnóstico e terapêutico, entre os quais está incluída uma das alternativas mais promissoras para a aPDT, o grupo das Ftalocianinas^{97,98}. O espectro de absorção das Ftalocianinas em solução consiste em duas bandas principais centradas em torno de 350 nm e 670 nm. Os estudos de Sibata et al.⁹⁹ (2004); Oliveira et al.¹⁰⁰ (2006); Dobson, Wilson et al.⁴³ (1993); Wilson, Dobson⁴⁷ (1993) têm corroborado a eficiência das Ftalocianinas como agentes fotossensíveis na eliminação de microrganismos periodontopatogênicos com uso em aPDT.

A Hipericina é um FS natural, presente em plantas herbáceas conhecidas como erva de São João (gênero *Hypericum perforatum*)¹⁰¹. Possui propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, anti-infecciosas, antivirais, estimula a circulação sanguínea e elimina hematomas¹⁰². Atualmente é utilizado como medicamento fitoterápico em quadros de distúrbios psicovegetativos, estados depressivos, medo e/ou ansiedade¹⁰³. Na aPDT, estudos têm mostrado o grande poder fototóxico da Hipericina no tratamento da psoríase e outras doenças de pele¹⁰⁴, potente atividade anticâncer induzindo tanto apoptose quanto a necrose de células tumorais¹⁰⁵, e capacidade de promover a inativação de microrganismos, sendo considerado como um dos mais potentes fotossensibilizadores encontrados na natureza^{106,107}. Yow 2012¹⁰⁸, determinou o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica com Hipericina em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e observou que a eficácia da terapia foi fortemente afetada pela estrutura celular e absorção do fotossensibilizador. A combinação da Hipericina com a irradiação de luz induziu morte celular de *S. aureus* (Gram positivas), mas não foi efetiva para as células de *E. Coli* (Gram negativas). A autora atribuiu tal resultado as diferenças estruturais de parede celular/membrana, que afetaram a captação celular de Hipericina.

São parâmetros importantes para a ação do fotossensibilizador: solubilidade relativa em água e lipídios, constante de ionização, fatores específicos como as características de absorção de luz, e a eficiência da formação do estado excitado

triplete ou da produção de oxigênio singleto^{28,109}. Portanto, para uma maior eficiência da inativação dos microrganismos essas diferenças devem ser superadas modificando o FS quanto a sua hidrofobicidade e carga, de acordo com a característica celular de cada microrganismo^{110,111}. A Hipericina possui característica hidrofóbica e perde a sua ação fotossensibilizadora quando em meio biológico, devido a auto agregação em meio aquoso e em muitos casos a uma subsequente precipitação que reduz drasticamente a capacidade de gerar oxigênio singleto, diminuindo sua efetividade na aPDT^{30,112}. Uma estratégia proposta é a indução da formação de espécies supramoleculares hidrofílicas, como mencionado anteriormente. No caso da Hipericina, para a formação de uma supramolécula hidrofílica, é induzida uma reação a partir do grupo fenólico, que cede o próton H⁺, formando a Hipericina-glucamina. A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula, fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio serão estabelecidas, aumentando sua hidrofiliidade³⁴.

As cepas utilizadas têm características estruturais e fisiológicas específicas, sendo *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) anaeróbias Gram negativas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JP2) anaeróbia facultativa Gram negativa, e *Streptococcus oralis* (ATCC 35037) anaeróbia facultativa Gram positiva^{113,114}. Independente da característica do grupo microbiano, também podem ocorrer diferenças dentro de uma mesma cepa microbiana. Yow et al.³³, demonstraram que diferentes cepas do mesmo micro-organismo (*S. Aureus*) podem apresentar diferentes ligações com o FS, apresentando variações nos resultados.

Segundo Malik et al.¹¹⁵, e Nitzan et al.¹¹⁶ as bactérias Gram-positivas (G⁺) são geralmente mais suscetíveis à fotoinativação, enquanto as Gram negativas (G⁻) são mais resistentes, essa resistência é atribuída à configuração da membrana externa que proporciona uma barreira protetora para os micro-organismos, a configuração desse membrana externa possui um grande espaço periplásmico cercado por camadas de peptidoglicano, entre as membranas citoplasmáticas externas e internas, o que pode ser um desafio para a penetração dos FS. O uso de um FS catiônico (+), mostra maior atividade fotodinâmica contra bactérias G⁻, uma vez que essa carga positiva típica do FS promove uma ligação eletrostática à superfície

externa desse tipo de bactéria, induzindo um dano inicial que favorece a penetração de FS^{8,77}.

Atualmente, várias fontes de luz e FS têm sido estudados com a técnica de aPDT nos modelos de DP⁷⁶, no entanto, ainda existem vários desafios para esta técnica, como melhorar a seletividade dos FS para micro-organismos periodontopatogênicos, que possuem características estruturais específicas (por exemplo as bactérias anaeróbicas, Gram-), e apresentam uma estrutura ainda mais complexa quando organizadas em biofilmes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo In Vivo

Se seguiram os seguintes protocolos e o desenho como descrito na Figura 4.

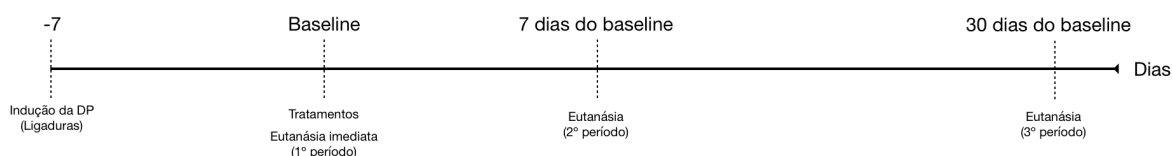
Comité de Ética: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP (Proc. CEUA Nº 07/2012), dentro dos regulamentos exigidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (ANEXO A).

Amostra: Neste estudo foram utilizados *Rattus Norvegicus*, variação *albinus Holtzman*, machos, adultos, com peso variando entre 300-350g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)- UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério da FOAr, com luz, umidade e temperatura controladas, e tratados com ração e água *ad libitum* antes e durante todo o período experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em caixas plásticas coletivas, resultando em no máximo 5 animais por caixa.

Indução da Doença Periodontal: Cada animal foi pesado e em seguida anestesiado por uma combinação de 0,08ml/100g de Quetamina (Cloridrato de Quetamina – Francotar 3% - Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.) com 0,04ml/100mg de Xilazina (Cloridrato de Xilazina – Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.). Posteriormente, cada animal foi colocado em posição supina na mesa operatória específica para a manutenção da boca aberta e obtenção de livre acesso aos molares. As ligaduras (Fio de algodão no 24, Coats Ltda., São Paulo, Brasil) foram inseridas na região subgengival, até a eutanasia dos animais (Figura 5).

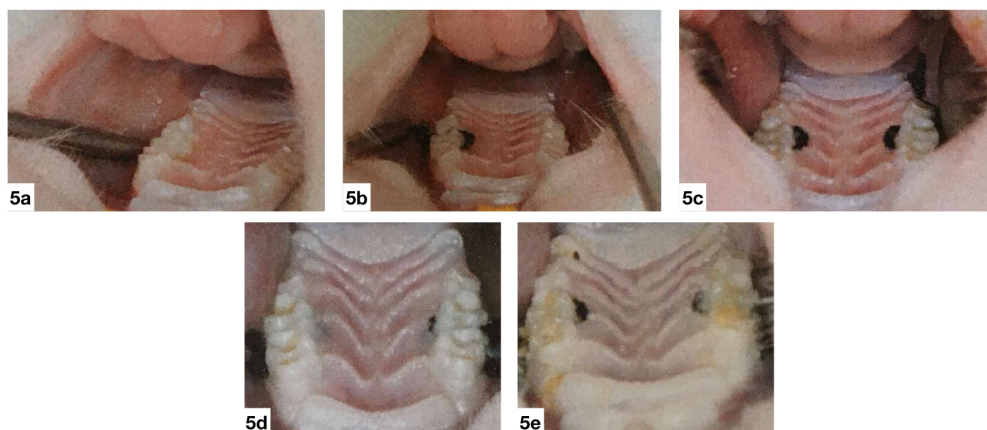
Desenho Experimental:

Figura 4 – Desenho experimental



Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 – Ligaduras: Observamos a região dos molares; 5b, a ligadura em posição; 5c, as duas ligaduras em posição; 5d e 5e, acúmulo de biofilme nas ligaduras



Fonte: Elaboração própria.

Preparo dos Fotossensibilizadores: O preparo dos fotossensibilizadores foi realizado no Laboratório de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (IQSC-USP). A manipulação dos fotossensibilizadores foi feita a partir de soluções estoque, sintetizadas pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC. A solução estoque do FS Hipericina-glucamina ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$), foi obtida em solvente aprótico polar, dimetil sulfóxido (DMSO), esterilizada por filtração em membrana $0,22 \mu\text{m}$ e mantida ao abrigo da luz. A solução de trabalho foi preparada, diluindo-se a solução estoque em tampão fosfato de sódio (pH 7,2) obtendo-se uma consistência líquida, de concentração final de $10 \mu\text{g/mL}$. A solução estoque do FS Ftalocianina-glucamina ($1,1 \text{ mg/mL}$), foi obtida em solvente aprótico polar, dimetil sulfóxido (DMSO), esterilizada por filtração em membrana $0,22 \mu\text{m}$ e mantida ao abrigo da luz. A solução de trabalho foi preparada, diluindo-se a solução de estoque em tampão fosfato de sódio (pH 7,2) obtendo-se consistência líquida, de concentração final de $10 \mu\text{g/mL}$. A porcentagem final de DMSO nos dois FS foi inferior a 1%.

Fonte de Luz: Foram utilizadas duas fontes de luz com diferentes comprimentos de onda para ativar os fotossensibilizadores. A fonte de luz necessária para ativar o fotossensibilizador Hipericina-glucamina deve ter comprimento de onda de 590nm , coincidindo com a banda de absorção máxima da Hipericina, e para ativar o fotossensibilizador Ftalocianina-glucamina a luz deve ter

comprimentos de onda de 655nm, coincidindo com a banda de absorção máxima da Ftalocianina. Foi utilizado LED que emite luz âmbar, com um comprimento de onda de 590 nm e potência de 90 Mw (MM Optics, São Carlos/SP, Brasil), e um LED que emite luz vermelha, com um comprimento de onda de 655nm e potência de 0,45 W (DMC equipamentos Ltda, São Carlos/SP, Brasil).

Técnica de Aplicação dos Fotossensibilizadores: Embora os fotossensibilizadores apenas sejam ativados por luz com comprimento de onda específico, para que houvesse um maior controle e padronização da técnica, optou-se por mantê-los protegidos de fontes de luz até o momento da irradiação com os LEDs (âmbar e vermelho). No dia dos tratamentos, a sala de cirurgia do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP permaneceu em penumbra, com apenas uma luz acesa distante do campo operatório. Para a adequada visualização da área a ser tratada, foram utilizadas lupas de cabeça com iluminação própria, que era desligada assim que a agulha (13x0,45 mm; Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltd., Curitiba, PR, Brasil) sem corte, que continha o FS fosse posicionada. No momento da aplicação, foi depositado o volume de 0,2 ml, e manteve-se no escuro por 10 minutos (tempo de incubação ou pre-irradiação do FS).

Grupos Experimentais: Os animais foram randomicamente divididos de acordo com o grupo (n=8) e os tratamentos referentes a cada grupo experimental foram aplicados após 7 dias da inserção das ligaduras (*Baseline*). A hemimaxila que recebeu o tratamento (direita ou esquerda), foi escolhida de forma randômica, sendo sua contralateral seu controle negativo (não foi realizado nenhum tratamento/intervenção). No momento de aplicação dos tratamentos a hemimaxila controle foi protegida, para que não sofresse interferência do tratamento. As ligaduras foram removidas nos períodos experimentais de 7 e 30 dias após os tratamentos. Os tratamentos aplicados foram:

- Grupo Controle: Indução da Doença Periodontal (DP), somente indução da doença periodontal, não houve tratamento.
- Grupo Ftalocianina-glucamina (Ft-g): 0,2 ml do fotossensibilizador Ftalocianina-glucamina (que se encontrava em falcon protegido da luz), o mesmo foi

transferido a uma seringa com agulha de ponta romba e cilindro revestido, o FS foi depositado no sulco gengival, foram aguardados 10 minutos de incubação.

- Grupo Hipericina-glucamina (Hy-g): 0,2 ml do fotossensibilizador Hipericina-glucamina (que se encontrava em falcon protegido da luz), foram transferidos a uma seringa com agulha de ponta romba e cilindro revestido. O FS foi depositado no sulco gengival e aguardados dez (10) minutos de incubação.

- Grupo LED vermelho (LV): irradiação com LED vermelho (655nm; 34 J/cm²) durante 72 segundos.

- Grupo LED âmbar (LA): irradiação com LED âmbar (590nm; 34,10 J/cm²) durante 360 segundos.

- Grupo Hipericina-glucamina + LED âmbar (aPDT1): 0,2 ml do fotossensibilizador Hipericina-glucamina foram aplicados como no grupo Hy-g tempo de incubação de 10 minutos e aplicado o LED âmbar por 360 segundos (34,10 J/cm²).

- Grupo Ftalocianina-glucamina + LED vermelho (aPDT2): 0,2 ml do fotossensibilizador Ftalocianina-glucamina foram aplicados como no grupo Ft-g, tempo de incubação de 10 minutos e depois foi aplicado o LED vermelho por 72 segundos (34 J/cm²).

Obtenção das ligaduras: Após o período experimental correspondente a cada grupo, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (Quetamina e Xilazina). As ligaduras foram cuidadosamente removidas para preservar o biofilme presente. Posteriormente foram suspensas em solução de PBS estéril e armazenadas em *ependorf* previamente marcados para imediata extração de DNA.

Teste de Viabilidade: As ligaduras que continham o biofilme, foram ressuspensas em 500 µL de PBS estéril e estes foram agitados em vortex (Phoenix, Araraquara/SP, Brasil) por 30 segundos. Em seguida trasladados a um novo *ependorf* que continha 500 µL de PBS estéril, o biofilme era centrifugado a 8.000 rpm durante 5 minutos para a formação do *pellet*. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspensado em 500 µL de PBS. Alíquota de 90 µL da amostra foi colocada em um novo *ependorf*.

Alíquota de 10 µL de Propidium Monoazide (PMA; Biotium Inc., Hayward, CA, USA) foi adicionada em cada *ependorf* que continha 90 µL da amostra e após incubação de 5 minutos no escuro, as amostras foram expostas (com a tampa do *ependorf* aberta) por 10 minutos a uma fonte de luz de halogênio de 650W colocada 20 cm acima das amostras. As amostras foram mantidas em gelo durante esse período, para evitar excesso de aquecimento.

Extração do DNA: Para a extração do DNA foi utilizado o sistema QIAamp DNA minikit® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Os *ependorfs* foram centrifugados por 10 min a 8000 rpm, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, o *pellet* ressuspendido em 180 µL de lisozima e em seguida, aquecidas a 37 °C por 30 minutos em banho seco (*Thermomixer Comfort Eppendorf*, Hamburg, Alemanha). Foram adicionados 20 µL de proteinase K e 200 µL de Buffer AL seguido de agitação por vortex durante 10 segundos e incubados a 56 °C durante 30 minutos e em seguida, incubados a 95 °C e por 15 minutos. Posteriormente foi realizada uma ligeira centrifugação, adicionados 200 µl de etanol, seguido de agitação durante 15 segundos e centrifugado.

A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp DNA minikit® e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 ao dispositivo com a coluna, centrifugados 8.000 rpm por 1 minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500 µl de Buffer AW2, seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 3 minutos. O DNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 200 µl de Buffer AE, aguardando-se 5 minutos e centrifugando-se a 8.000 rpm durante 1 minuto. Após estes procedimentos, as amostras foram transferidas do dispositivo para o *ependorf* de armazenamento. As mesmas foram armazenadas a -20°C.

Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR): Este teste teve como objetivo detectar, quantitativamente, as seguintes bactérias: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JP2),

Fusobacterium nucleatum (ATCC25586), e *Streptococcus oralis* (ATCC 35037). Os primers específicos (5' – 3') utilizados para o qPCR foram adquiridos pela Life Technologies (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e estão listadas no Quadro 1^{117–119}.

Quadro 1 - Primers e sondas utilizados para a detecção e quantificação por vitalidade qPCR.

Bactéria	Sentido	Oligonucleotídeos 5' - 3'	Fragmento	Referência
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Forward	GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA	80 pb	Loozen et al., 2011; Sánchez et al., 2013; Herrero et al., 2018
	Reverse	TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC		
	Probe	AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Forward	GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC	162 pb	
	Reverse	GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA		
	Probe	CTC TAC ACT TGT AGT TCC G		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Forward	GCG CTC AAC GTT CAG CC	68 pb	
	Reverse	CAC GAA TTC CGC CTG C		
	Probe	CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA		
<i>Streptococcus oralis</i>	Forward	ACC AGC AGA TAC GAA AGA AGC AT	229 pb	
	Reverse	AGG TTC GGG CAA GCG ATC TTT CT		
	Probe	AAG GCT GCT GTT GCT GAA GAA GT		

Fonte: Elaboração própria.

Os oligonucleotídeos foram dissolvidos em solução estéril contendo Tris HCl (10 mM – pH 7,6) e EDTA (1 mM – pH 8,0) em volume calculado para concentração final de 25 µM.

Quantificação e amplificação do DNA: As reações do qPCR foram realizadas utilizando o aparelho Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos). Reações em triplicata foram preparadas em volume total de 25 µL contendo 12,5 µL de Takyon ROX Probe 2x Master Mix blue dTTP (Eurogentec, Searing, Bélgica), 1 µL de cada par de oligonucleotídeo (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), 5,5 µL de H₂O estéril livre de DNase e RNase, 5 µL do DNA da amostra. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise e controle negativo, sem DNA molde.

A termociclagem utilizada foi de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos e 56 °C por 1 minuto. Após a reação de PCR, foi feita a curva de dissociação (curva de Melting) com temperatura entre 60 °C e 95 °C. Todas as

reações foram feitas em placas MicroAmp® optical 96-well e adesivos ópticos (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos). Os dados foram analisados utilizando o programa Step One 2.1™ (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos).

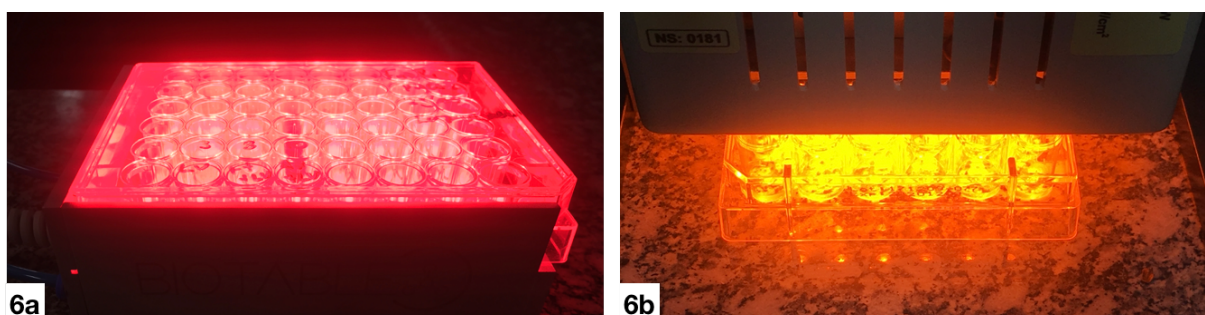
Os resultados foram analisados com base nos escores de CT (*cycle threshold*) obtidos das amostras.

4.2 Estudo In Vitro

No estudo in vitro se seguiram os seguintes protocolos.

Fontes de Luz: Foram utilizadas duas fontes de luz com diferentes comprimentos de onda para ativar os fotossensibilizadores (Figura 6). A fonte de luz para ativar o FS Hipericina-glucamina deve ter comprimento de onda de 590 nm, coincidindo com a banda de absorção máxima da Hipericina, e para ativar o FS Ftalocianina-glucamina a luz deve ter comprimentos de onda de 655 nm, coincidindo com a banda de absorção máxima da Ftalocianina. Foi utilizado uma *biotable* que emite luz vermelha, com comprimento de onda de 655 nm (MM Optics, São Carlos/SP, Brasil) e uma *biotable* que emite luz âmbar, com um comprimento de onda de 590 nm (DMC equipamentos Ltda, São Carlos/SP, Brasil).

Figura 6 – *Biotables*: *Biotable* de luz vermelha (6a); *Biotable* de luz âmbar(6b)



Fonte: Elaboração própria.

Cepas microbianas e condições de crescimento Bacteriano: Foram utilizadas neste estudo cepas de referência *Porphyromonas gingivalis* (ATCC

37277), *Aggregatibacter actynomicetemcomitans* (JP2), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Streptococcus oralis* (ATCC 35037).

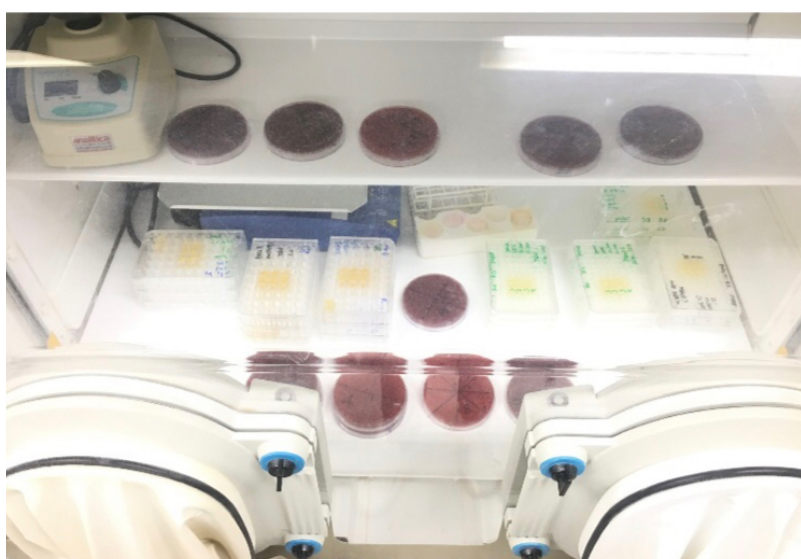
Reativação e Manutenção das espécies bacterianas: Os micro-organismos armazenados a -80 °C foram reativados em ágar brucellas (Himedia, Mumbai, India) suplementado com extrato de levedura (Himedia, Vadhani/MB, India), sangue de carneiro desfibrinado, hemina e menadiona e mantidos a 37 °C. As cepas de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* foram incubadas em anaerobiose (85% N₂, 10% de H₂, 5% de CO₂) (Don Whitley, Shipley, Inglaterra), e as cepas de *A. actynomicetemcomitans* e *S. oralis* em jarra de microaerofilia por um tempo que variou de acordo com as exigências fisiológicas de cada micro-organismo. A partir das colônias crescidas em placa, foi realizada coloração de Gram para identificação bacteriana por morfologia. Uma vez confirmadas, as colônias foram transferidas para tubos com 10 mL de BHI (Brain Heart Infusion, Difco™ BD, Rutherford/NJ, USA) suplementado com extrato de levedura (Himedia, Vadhani/MB, India), hemina (10 mg/μL) e menadiona (5 mg/μL), seguido de agitação por vortex. Posteriormente foram incubadas *overnight* (seguindo as condições específicas descritas na reativação dos micro-organismos). A turbidez do material resultante foi estimada pela determinação da absorbância através da densidade óptica de 600 nm com o auxílio do espectrofotômetro (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Quando a fase *mid-log* foi atingida, cada inóculo foi diluído para obter concentração final de 1×10^7 unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) em meio BHI. Para a subsequente formação de biofilme, foram realizadas diluições seriadas em solução salina de cada micro-organismo e inoculadas em placas de cultura com ágar brucellas suplementado (como descrito anteriormente) para determinação do valor de UFC mL⁻¹.

Formação e tratamento do Biofilme multiespécie: Para a formação do biofilme multiespécies em placa de microtitulação (n=9), *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actynomicetemcomitans* e *S. oralis* foram utilizados, conforme protocolo descrito por Millhouse et al.¹²⁰ (2014) e Ramage et al.¹²¹ (2017).

Foram utilizados 1000 μL de suspensão bacteriana de *S. oralis* correspondendo a 1×10^7 UFC mL⁻¹ e adicionada nas primeiras 24 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e 1000 μL de *F. nucleatum* (1×10^7 UFC

mL⁻¹) foi adicionado e os biofilmes foram incubados por mais 24 horas. Em seguida o sobrenadante foi removido e, 500 µL de *P.gingivalis* (1x10⁷ UFC mL⁻¹) e 500 µL de *A. actinomycetemcomitans* (1x10⁷ UFC mL⁻¹) foram adicionados ao biofilme e incubados por mais 4 dias. Em todo o processo de desenvolvimento, os biofilmes foram mantidos a 37 °C, em condições anaeróbias em câmara de anaerobiose (85% N₂, 10% de H₂, 5% de CO₂) (Don Whitley, Shipley, Inglaterra) como mostrado na Figura 7 e Figura 8, e o meio renovado a cada 24 horas¹²¹

Figura 7 – Câmera de anaerobiose



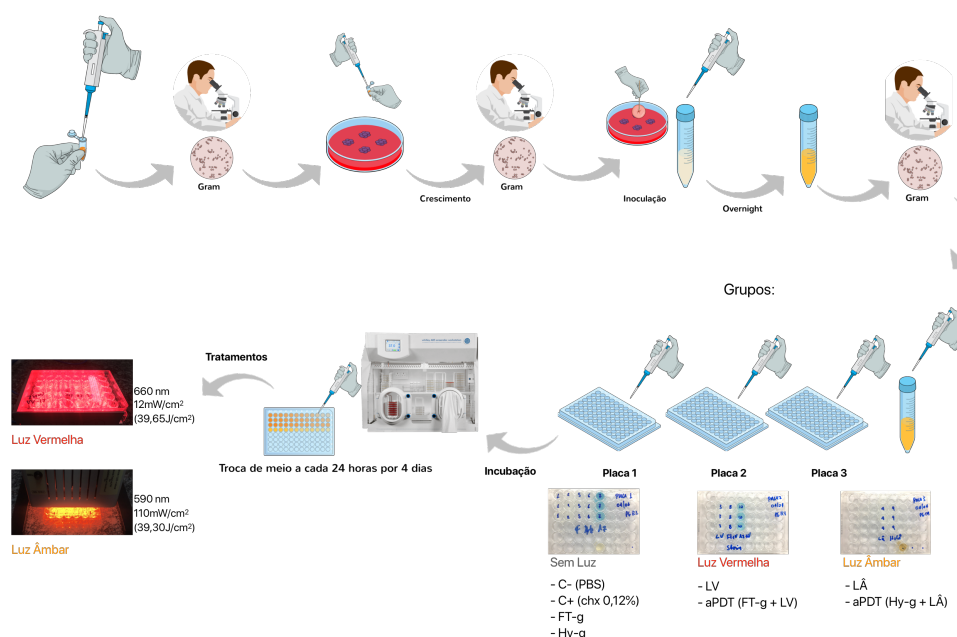
Fonte: Elaboração própria.

Grupos e tratamentos: O meio de cultura de cada poço foi retirado delicadamente e o biofilme maduro foi lavado com tampão fosfato estéril (PBS, 100 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, pH 7.2). Imediatamente após a lavagem do biofilme, os tratamentos foram aplicados seguindo a distribuição:

- Grupo Controle Negativo (controle-): aplicação de 500 µL de solução de PBS estéril por 60 segundos, sem tratamento.
- Grupo Controle Positivo (controle+): aplicação de 500 µL de clorexidina 0,12% por 60 segundos.
- Grupo Ftalocianina-glucamina (Ft-g): aplicação de 200 µL de fotossensibilizador Ftalocianina-glucamina por um tempo total de 64 minutos e 35 segundos.

- Grupo Hipericina-glucamina (Hy-g): aplicação de 200 μL de fotossensibilizador Hipericina-glucamina por um tempo total de 16 minutos.
- Grupo Luz Vermelha (LV): irradiação com *biotable* (660nm; 39,65 J/cm²) durante 54 minutos e 35 segundos.
- Grupo Luz Âmbar (LA): irradiação com *biotable* (590nm; 39,30 J/cm²) durante 6 minutos.
- Grupo Ftalocianina-glucamina e luz vermelha (aPDT1): aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com 200 μL do fotossensibilizador Ftalocianina-glucamina, foram aguardados 10 minutos de incubação, depois a placa foi irradiada com *biotable* (660nm; 39,65 J/cm²) durante 54 minutos e 35 segundos.
- Grupo Hipericina-glucamina e luz âmbar (aPDT2): aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com 200 μL do fotossensibilizador Hipericina-glucamina, foram aguardados 10 minutos de incubação, depois a placa foi irradiada com *biotable* (590nm; 39,30 J/cm²) durante 6 minutos.

Figura 8 – Metodologia estudo in vitro



Fonte: Elaboração própria.

Análise de Expressão génica: Uma alíquota de 90 μL da amostra de cada poço, foi colocada em *ependorf* para fazer a imediata extração de DNA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

Teste de viabilidade: Uma alíquota de 10 µL de PMA foi adicionada na amostra anteriormente descrita e incubadas por 5 minutos no escuro. As amostras foram expostas (com a tampa do *ependorf* aberta) por 10 minutos a uma fonte de luz de halogênio de 650W colocada 20 cm acima das amostras, estas foram mantidas em gelo durante esse período, para evitar aquecimento.

Extração de DNA: Para a extração do DNA foi utilizado o sistema QIAamp DNA minikit® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, conforme descrito na metodologia da extração do estudo in vivo.

Os *ependorfs* foram centrifugados por 10 min a 8000 rpm, para a formação do *pellet*, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o *pellet* ressuspenso em 180 µL de lisozima, em seguida, aquecidas a 37 °C por 30 minutos em banho seco (Thermomixer Comfort *Eppendorf*, Hamburg, Alemanha), se adicionou 20 µL de proteinase K e 200 µL de Buffer AL seguido de agitação por vortex durante 10 segundos para uma nova incubação a 56 °C durante 30 minutos. Após este período, foi realizado um novo ajuste da temperatura para 95°C e o material foi novamente incubado por 15 minutos, seguido de uma ligeira centrifugação. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol, agitando-se durante 15 segundos e centrifugando brevemente.

A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp DNA minikit® e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm por 1 minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500 µl de Buffer AW2, seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 3 minutos. O DNA extraído da coluna foi diluído pela adição de 200 µl de Buffer AE. Após a adição foi aguardado 5 minutos e a solução foi centrifugada a 8.000 rpm durante 1 minuto, posteriormente as amostras foram transferidas do dispositivo para o *ependorf* de armazenamento. As mesmas foram armazenadas a -20°C.

Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR): Este teste teve como objetivo quantificar as seguintes bactérias: *P.gingivalis* (ATCC 33277), *A.*

actynomicetemcomitans (JP2), *F. nucleatum* (ATCC25586), e *S. oralis* (ATCC 35037). Os *primers* específicos (5' – 3') utilizados para o qPCR foram adquiridos pela Life Technologies (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e estão listadas no Quadro 1.

Os oligonucleotídeos foram dissolvidos em solução estéril contendo Tris HCl (10 mM – pH 7,6) e EDTA (1 mM – pH 8,0) em volume calculado para concentração final de 25 µM.

Quantificação e amplificação do DNA: As reações do qPCR foram realizadas utilizando o aparelho Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos). Reações em triplicata foram preparadas em volume total de 25 µL contendo 12,5 µL de Takyon ROX Probe 2x Master Mix blue dTTP (Eurogentec, Searing, Bélgica), 1 µL de cada par de oligonucleotídeo (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), 5,5 µL de H₂O estéril livre de DNase e RNase, 5 µL do DNA da amostra. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise e controle negativo, sem DNA molde.

A termociclagem utilizada foi de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos e 56 °C por 1 minuto. Após a reação de PCR foi feita a curva de dissociação (curva de Melting) com temperatura entre 60 °C e 95 °C. Todas as reações foram feitas em placas MicroAmp® optical 96-*well* e adesivos ópticos (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos). Os dados foram analisados utilizando o programa Step One 2.1™ (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos).

Os resultados foram analisados com base nos escores de CT (*cycle threshold*) obtidos das amostras.

4.3 Análise Estatística Modelo Biofilme In Vivo

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) e os resultados expressos como médias ± desvio padrão. A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os

dados normalmente distribuídos foram analisados utilizando ANOVA two-way. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

4.4 Análise Estatística Modelo Biofilme Multiespécie In Vitro

O software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas. A normalidade das variáveis foi confirmada com o teste de Shapiro-Wilk e as diferenças entre os grupos foram avaliadas com a ANOVA e Tukey teste post-hoc configurados para cada bactéria separadamente. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$. Para todos os resultados, três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos Da aPDT No Modelo Biofilme In Vivo

Na análise no modelo in vivo, foram analisadas amostras de biofilme que se acumularam nas ligaduras, em diferentes períodos (7 e 30 dias), após uma única aplicação de aPDT no período baseline, com o objetivo de verificar a eficácia antimicrobiana da terapia com os dois FS, independentemente de qualquer outra forma de tratamento, dados de suporte estão no APÊNDICE A.

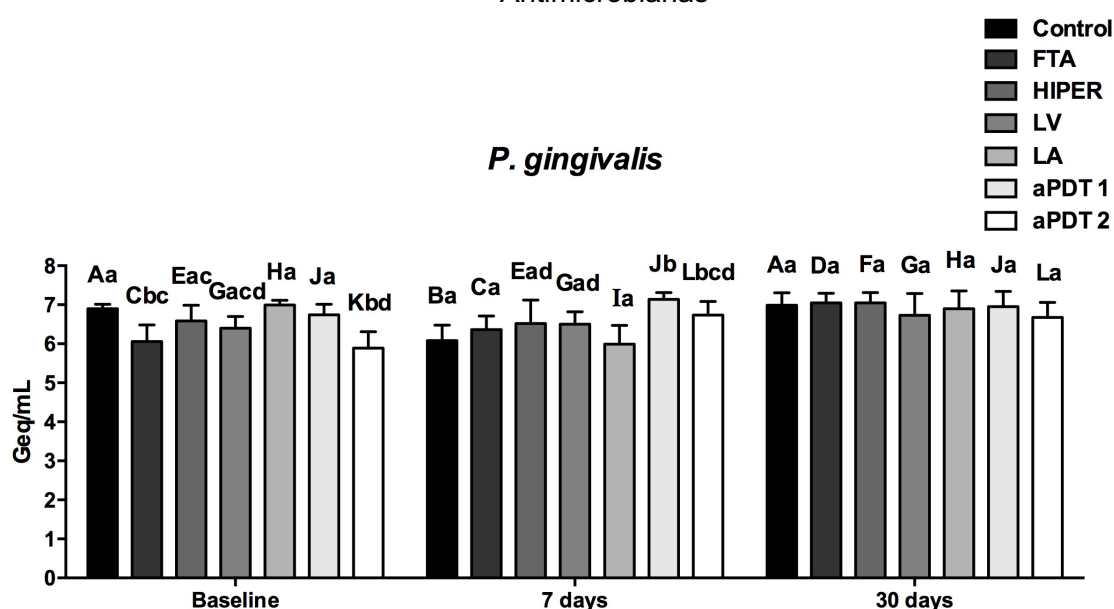
No período baseline, quando se analisa o efeito da terapia sobre *P. gingivalis* (Figura 9), pode se identificar diferenças estatisticamente significativas na redução da viabilidade para os grupos FS (Ft-g = 12,19%; Hy-g = 4,45%), LEDs (LV = 7,19%) e aPDT 2 (14,64%) quando comparados ao grupo controle. Quando se analisa o efeito da terapia sobre *F. nucleatum* (Figura 10), as diferenças estatisticamente significativas foram observadas nos grupos FS (Ft-g = 7,85%), LEDs (LV = 9,23%) e aPDT 2 (8,78%) quando comparados ao grupo controle. Quando se analisa o efeito da terapia sobre *S. oralis* (Figura 11), as diferenças estatisticamente significativas foram observadas nos grupos FS (Ft-g = 26,75%; Hy-g = 17,42%), aPDT 1 (13,16%) e aPDT 2 (19,29%) quando comparados ao grupo controle. Neste período de baseline não se identificaram diferenças estatisticamente significativas na redução da viabilidade para nenhum dos grupos para a *A. actynomicetemcomitans* (Figura 12). Estes resultados demonstram a efetividade da terapia no momento da aplicação, mesmo se tratando de uma condição onde não foi realizado nenhum outro tratamento como a raspagem, dados de suporte estão no APÊNDICE A.

Os resultados no período baseline estão caracterizados por mostrar uma redução da viabilidade celular para *P. gingivalis* (Ft-g = 12,19%; Hy-g = 4,45%; LV = 7,19%; aPDT2 = 14,64%), para *S. oralis* (Ft-g = 26,75%; Hy-g = 17,42%; aPDT 1 = 13,16%; aPDT 2 = 19,29%), no entanto, nessas condições, para o micro-organismo *A. actynomicetemcomitans* o mesmo efeito inibitório não foi obtido. Estes resultados demonstram a efetividade da terapia no momento da aplicação, mesmo se tratando de uma condição onde não foi realizado nenhum outro tratamento como a raspagem e alisamento radicular.

Para o período de 7 dias, o comportamento foi diferente, quando se analisa o efeito da terapia sobre *A. actynomicetemcomitans* (Figura 12), pode se identificar diferenças estatisticamente significativas na redução da viabilidade para o grupo, FS (Hy-g = 6,39%) quando comparados ao grupo controle. Quando se analisa o efeito da terapia sobre *S. oralis* (Figura 11), as diferenças estatisticamente significativas foram observadas nos grupos LEDs (LV = 20,47%; LÂ = 19,42%) quando comparados ao grupo controle. Neste período não se identificaram diferenças estatisticamente significativas na redução da viabilidade para nenhum dos outros grupos.

No período de 30 dias, a tendência na inibição da viabilidade também foi diferente, sendo observado diferenças estatisticamente significativas para *A. actynomicetemcomitans* (Figura 12), com os grupos LEDs (LÂ = 4,66%), aPDT 1 (4,06%) e aPDT 2 (10,80%) quando comparados ao grupo controle. Os outros grupos permaneceram sem diferenças estatisticamente significativas.

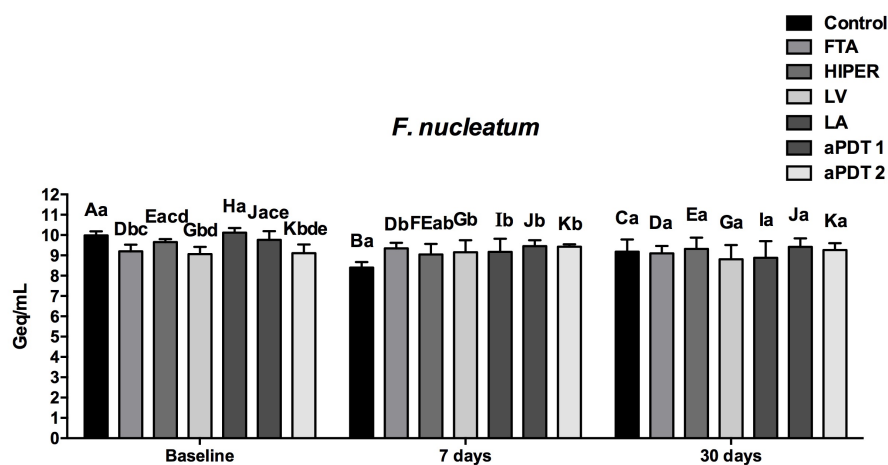
Figura 9 - Resultados microbiológicos de *P. gingivalis* obtidos por qPCR nos períodos Baseline, 7 dias e 30 dias após o tratamento de diferentes Terapias Fotodinâmicas Antimicrobianas



Letras maiúsculas permitem comparações entre os períodos para o mesmo grupo e letras minúsculas permitem comparações entre os grupos para o mesmo período. Diferenças estatísticas estão representadas por letras diferentes (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

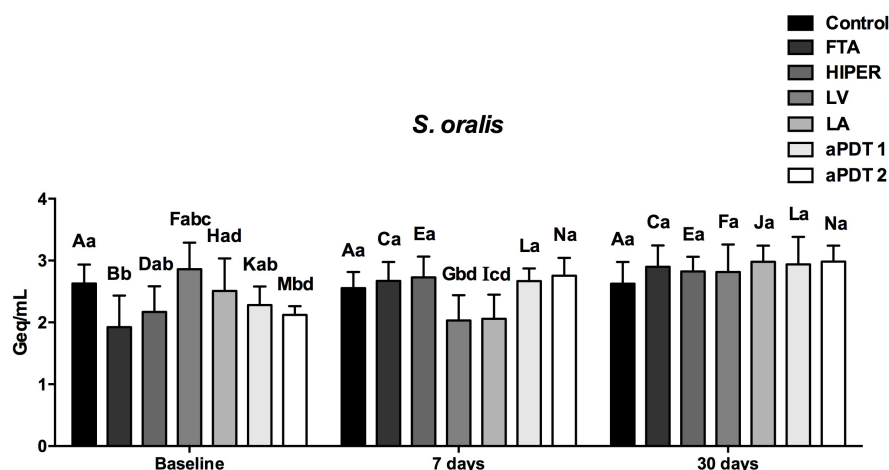
Figura 10 - Resultados microbiológicos de *F. nucleatum* obtidos por qPCR nos períodos Baseline, 7 dias e 30 dias após os diferentes tratamentos.



Letras maiúsculas permitem comparações entre os períodos para o mesmo grupo e letras minúsculas permitem comparações entre os grupos para o mesmo período. Diferenças estatísticas estão representadas por letras diferentes (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

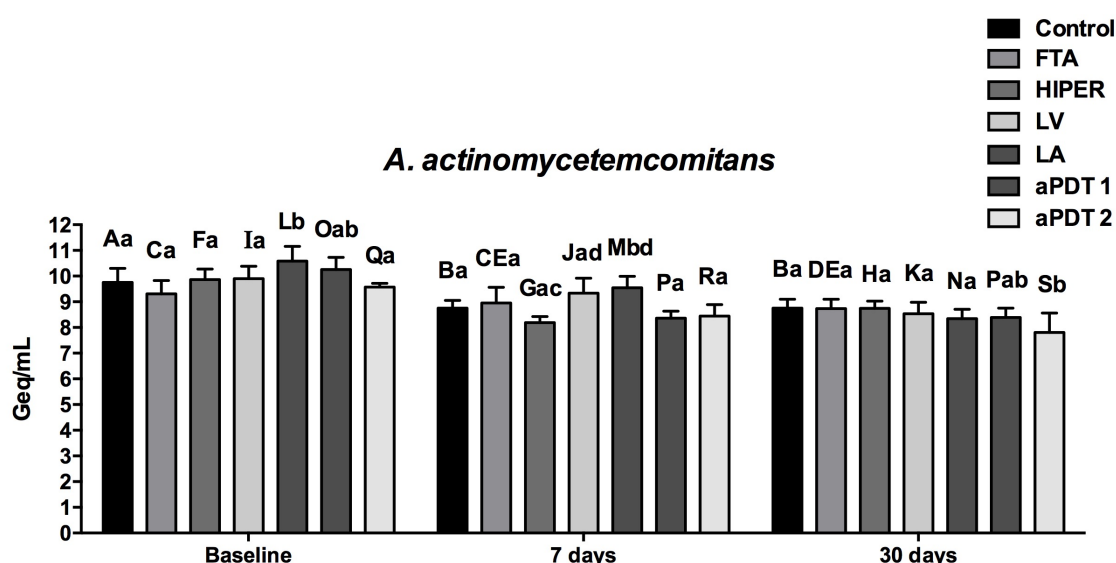
Figura 11 - Resultados microbiológicos de *S. oralis* obtidos por qPCR nos períodos Baseline, 7 dias e 30 dias após o tratamento de diferentes Terapias Fotodinâmicas Antimicrobianas.



Letras maiúsculas permitem comparações entre os períodos para o mesmo grupo e letras minúsculas permitem comparações entre os grupos para o mesmo período. Diferenças estatísticas estão representadas por letras diferentes (ANOVA two-way, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Resultados microbiológicos de *A. actinomycetemcomitans* obtidos por qPCR nos períodos Baseline, 7 dias e 30 dias após o tratamento de diferentes Terapias Fotodinâmicas Antimicrobianas.



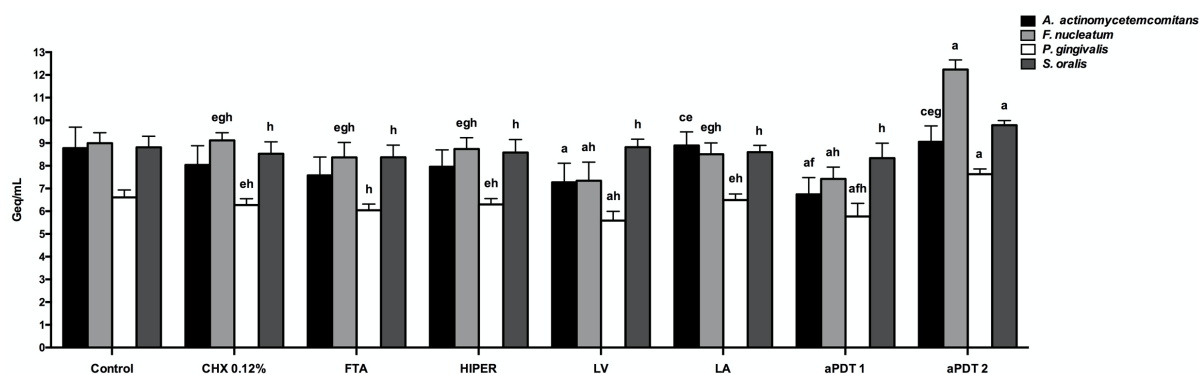
Letras maiúsculas permitem comparações entre os períodos para o mesmo grupo e letras minúsculas permitem comparações entre os grupos para o mesmo período. Diferenças estatísticas estão representadas por letras diferentes (ANOVA two-way, $p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Efeitos Da aPDT No Modelo De Biofilme Multiespécie In Vitro

Pode-se observar que, no modelo de biofilme multiespécies desenvolvido, os tratamentos que obtiveram diferenças estatísticas na inibição da viabilidade bacteriana de *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* (Figura 13 e Figura 14), foram os grupos com LED vermelho (*P. gingivalis* 15,46%; *F. nucleatum* 18,36%; *A. actinomycetemcomitans* 17,11%) e aPDT com Ft-g + LED vermelho (*P. gingivalis* 12,58%; *F. nucleatum* 17,47%; *A. actinomycetemcomitans* 23,15%), quando comparados aos grupos controles negativos. Os resultados observados com *S. oralis* não tiveram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos grupos. Por outro lado, o uso de Hy-g neste modelo apresentou uma tendência diferente, sem obter diferenças estatisticamente significativas quando comparado aos grupos controle em qualquer um dos micro-organismos analisados.

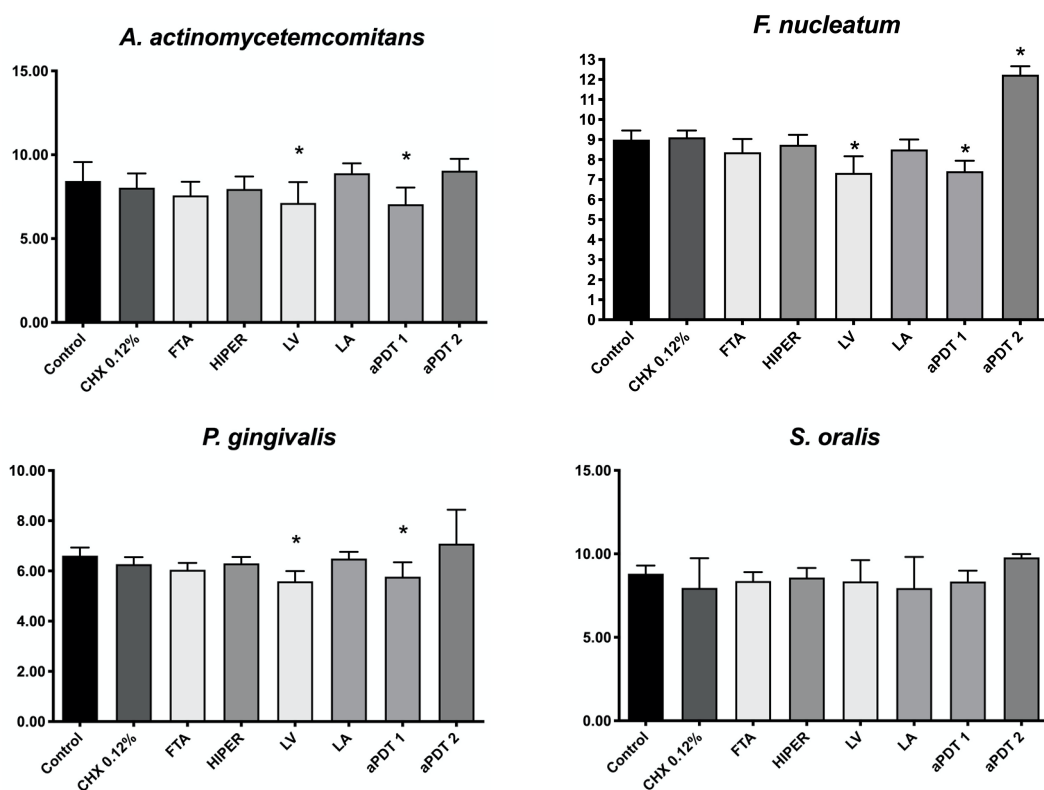
Figura 13 - Efeito das Terapias Fotodinâmicas Antimicrobianas em biofilmes multiespécies pré-formados, obtidos pela técnica de qPCR.



Letra 'a' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo controle. Letra 'b' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo Clorexidina (CHX). Letra 'c' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo Ftalocianina-glucamina (FTA). Letra 'd' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo Hipericina-glucamina (HIPER). Letra 'e' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo LED vermelho. Letra 'f' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo LED âmbar. Letra 'g' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo LED vermelho + Ftalocianina-glucamina (aPDT 1). Letra 'h' corresponde a diferença estatística em relação ao grupo LED âmbar + Hipericina-glucamina (aPDT 2). (ANOVA, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 - Efeito das Terapias Fotodinâmicas Antimicrobianas nos diferentes micro-organismos



A. actinomycetemcomitans, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. oralis* categorizados por tratamento. O símbolo * nas colunas indicam uma diferença significativa com o baseline; Teste ANOVA ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou in vivo e in vitro uma diminuição na viabilidade dos micro-organismos aplicando aPDT mediada pelos fotossensibilizadores Hipericina-glucamina e Ftalocianina-glucamina nos modelos de biofilme testados. Estes resultados microbiológicos complementam outras análises conduzidas pelo nosso grupo de pesquisa. Até o momento não há estudos relatando a avaliação da atividade antibacteriana da aPDT com a técnica PMA-qPCR sobre os micro-organismos testados (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *S. oralis*)

Segundo Castano e Hamblin^{122,123} (2004) aPDT atua essencialmente na parede ou membrana celular e o dano parece ser proporcional às espécies reativas produzidas (pelos mecanismos do tipo I e II), particularmente o oxigênio singlete. Malik et al.¹¹⁶, e Nitzan, et al.¹¹⁵, demonstraram que as bactérias Gram-positivas (G+) são geralmente mais suscetíveis à fotoinativação, enquanto as Gram negativas (G-) são mais resistentes como, essa resistência é atribuída à configuração da membrana externa que proporciona uma barreira protetora para os micro-organismos, a configuração dessa membrana externa possui um grande espaço periplásmico cercado por camadas de peptidoglicano, entre as membranas citoplasmáticas externas e internas, o que pode ser um desafio para a penetração dos FS, assim o uso de um FS catiônico (+), teria maior atividade fotodinâmica contra bactérias G-, uma vez que essa carga positiva típica do FS promove uma ligação eletrostática à superfície externa desse tipo de bactéria, induzindo um dano inicial que favorece a penetração de FS como descrito por Cieplik et al.⁷⁷, e George et al.⁸.

Os FS utilizados neste estudo, foram modificados seguindo o princípio de conversão das moléculas, buscando torná-las mais hidrofílicas e com uma carga catiônica, sem afetar a sua composição. Para isso foi adicionada uma molécula de glucamina como descrito por Bernal et al.³⁴ e de Melo et al.²⁶, estes autores demonstraram que essa propriedade aumenta a eficiência fotodinâmica sobre algumas cepas bacterianas específicas, sugerindo que, além de promover uma

junção eletrostática mais seletiva, ocorre maior acúmulo intracelular de FS hidrofílico em bactérias G-.

Os resultados para o modelo in vivo apresentam variações particulares para cada micro-organismo, isto devido as características específicas deles como citado anteriormente, e as variações significativas também ocorrem nos diferentes períodos, fazendo uma análise individual desde essa perspectiva, a maior redução da viabilidade foi para *S. oralis* no período baseline, isso confirma que os FS testados são altamente efetivos quando aplicados com a técnica de aPDT contra micro-organismos anaeróbios facultativos e G+, não entanto para *A. actinomycetemcomitans* que é anaeróbio facultativo e G-, essa redução se observa no período de 7 e 30 dias, e para *P. gingivalis* e *F. nucleatum* que são anaeróbios estritos e G-, a redução se apresenta só no período baseline, assim podemos afirmar que com uma aplicação de aPDT são obtidas reduções na viabilidade dos micro-organismos aeróbios e G-, imediatamente após a aplicação do tratamento, no entanto se não se aplicam outros tratamentos ou repetições de aPDT, os micro-organismos que estão organizados em biofilmes aumentam sua viabilidade, esses resultados podem estar relacionados à teoria da recolonização bacteriana que é descrita na literatura^{113,124,125}, em que a relação homeostática dos biofilmes é restaurada através da recolonização microbiana com espécies bacterianas específicas e pelo processo de cicatrização dos tecidos ao redor do dente, que no nosso modelo ocorreria, nos períodos de 7 e 30 dias. O fato de a ligadura ficar no local aonde foi aplicado a terapia, também seria um fator limitante, já que essa ligadura favoreceria a um maior acúmulo do biofilme. Outro fator que deve ser considerado é a característica do biofilme aderido a ligadura, Davies et al.¹²⁶, e Dougherty et al.¹²⁷, demonstraram que pode existir diferentes fenótipos microbianos, e que isso pode levar a diminuição da ação da aPDT.

Embora os parâmetros de aplicação de tempo da luz LED utilizados foram os que demonstraram bons resultados em outros estudos^{36,81}, à busca por um protocolo da terapia é um desafio. Wenzler et al.¹²⁸ concluíram que a irradiação transgengival apresenta efetividade na aPDT mas que deve-se levar em consideração uma possível diminuição da potência da fonte de luz.

No nosso modelo in vivo há limitações que se comparam as descritas por Matevski et al.¹²⁹ como o tempo para a resposta biológica, o fato de realizar apenas uma aplicação de aPDT, a presença de materiais orgânicos, como o fluido gengival, saliva, sangue e exudato, bem como, distribuição de luz na área aplicada, presença de matriz extracelular, entre outros que podem interferir no mecanismo de ação do aPDT. Outra limitação importante é o tempo de ação dos FS, onde a produção de ROS é limitada devido ao baixo oxigênio disponível nesses locais, já que às bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas consomem grande parte do oxigênio presente.

Longo et al.¹³⁰ reportaram que várias aplicações de aPDT têm um resultado sinérgico, e que os resultados podem ser potencializados quando combinados com uma terapia mecânica, como RAR, nesse estudo avaliaram múltiplas aplicações de aPDT (azul de metileno + InGaAlP) em periodontite induzida em ratos e obtiveram uma diminuição de *A. actynomicetemcomitans*, o que sugere que a fonte de luz é um fator que também pode modificar os resultados, em nosso estudo, não foram realizadas aplicações múltiplas, nem outros tipos de tratamentos, com o objetivo de não interferir na análise microbiológica específica de uma única aplicação de aPDT.

No estudo in vitro, quatro cepas diferentes de bactérias associadas à DP foram utilizadas (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actynomicetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus oralis*) levando-se em consideração que a presença destes micro-organismos tem sido comprovada em diferentes estudos^{131–133} de caracterização da DP em ratos. Cada uma dessas cepas tem uma função diferente nas fases de formação e maturação do biofilme como descrito na literatura^{113,114}, bem como uma estrutura bacteriana com diferentes mecanismos fisiológicos^{134,135}. Os resultados obtidos no modelo in vitro, podem estar relacionados com a característica dos micro-organismos, decorrente de diferenças na parede celular e/ou na sua estrutura como mencionado no modelo in vivo. Os resultados obtidos também podem estar relacionados ao protocolo de aplicação da luz, onde os grupos que receberam tratamentos com luz âmbar ficaram por um tempo menor de exposição a luz, para ser compatível com a dosagem proposta, e que foi o tempo necessário para se obter a dose similar a utilizada pelo LED do modelo in vivo, dose que também tem sido utilizada em outros estudos^{136,137}.

Um desafio importante ao usar um diagnóstico molecular para identificação microbiana, particularmente quando tratamentos antimicrobianos são aplicados, é a diferenciação entre bactérias viáveis e não viáveis. A técnica de análise microbiológica utilizada no presente estudo foi qPCR em combinação com PMA, para obter uma diferenciação na quantificação de células viáveis e não viáveis, como Loozen et al.¹¹⁸ e Sánchez et al.¹¹⁹ tem demonstrado que a técnica facilita a detecção seletiva apenas de micro-organismos viáveis nesse meio contendo não viáveis.

Nos dois estudos, *in vitro* e *in vivo*, foram utilizados grupos controles negativos. Cieplik et al.¹⁸ descreve a importância destes grupos uma vez que os grupos controle negativos avaliam isoladamente o uso da fonte de luz ou do FS, e o controle positivo no estudo *in vitro* avalia a eficácia da aPDT comparada ao efeito de um medicamento que já demonstrou exibir propriedades antimicrobianas evidentes, como é a clorexidina, mas que também apresenta algumas limitações como as descritas por Wand et al.¹³⁸.

Nossos resultados, embora não apresentem importantes diferenças estatisticamente significativas, facilitam o entendimento do comportamento biológico na redução da viabilidade quando comparadas ao grupo controle. Estes resultados, evidenciam que aPDT, com o FS e fonte de luz adequado é um método promissor para o controle de micro-organismos periodonto patogênicos, no entanto, mais estudos são necessários para verificar a eficácia desta modalidade de tratamento, avaliando novos parâmetros de aplicação da luz e novas modificações nos fotossensibilizadores, e também a associação de aPDT com terapias mecânicas que promovam uma disbiose.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias utilizadas e dentro das limitações dos estudos, podemos concluir:

1. A aPDT apresenta reduções na viabilidade das cepas que foram utilizadas nos diferentes modelos.
2. Embora os fotossensibilizadores utilizados, tenham sido modificados para melhorar o comportamento nos modelos estudados, ainda é limitada a sua ação contra micro-organismos anaeróbios e G- em forma de biofilmes.
3. Mais estudos in vitro e in vivo são necessários para elucidar a ação da aPDT e o efeito destes fotossensibilizadores como terapia coadjuvante no tratamento da Doença Periodontal.

REFERÊNCIAS*

1. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010;81(1):4-14. doi:10.1902/jop.2009.090285
2. Wolff L, Dahlén G, Aeppli D. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol*. 1994;65(5 Suppl):498-510. doi:10.1902/jop.1994.65.5s.498
3. Grzech-Leśniak K, Gaspirc B, Sculean A. Clinical and microbiological effects of multiple applications of antibacterial photodynamic therapy in periodontal maintenance patients. A randomized controlled clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;27:44-50. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.05.028
4. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2009;24(5):681-688. doi:10.1007/s10103-008-0565-z
5. Rajendra Santosh AB, Ogle OE, Williams D, Woodbine EF. Epidemiology of Oral and Maxillofacial Infections. *Dent Clin North Am*. 2017;61(2):217-233. doi:10.1016/j.cden.2016.11.003
6. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, 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. doi:10.1016/j.adaj.2015.01.028
7. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2004;36:59-97. doi:10.1111/j.1600-0757.2004.03679.x
8. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol* 2000. 2009;51:109-140. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00302.x
9. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*. 2009;36(3):219-228. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01355.x
10. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol*. 2011;38(12):1106-1114. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01785.x

* 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-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 143-150. doi: 10.1007/s10103-012-1099-y.
12. Garcia VG, Gualberto Júnior 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. doi: 10.1902/jop.2012.120163.
13. Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci*. 2015;30(6):1647-56. doi: 10.1007/s10103-014-1632-2.
14. Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpe A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010;81(7):975-81. doi: 10.1902/jop.2010.090246.
15. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci*. 2012;27(4):687-93. doi: 10.1007/s10103-011-0942-x.
16. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2(3):175-91. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
17. 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.
18. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):571-589. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876.
19. Müller Campanile VS, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombelli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):27-34. doi: 10.1007/s10103-013-1337-y.
20. Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, Nociti FH Jr, et al. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2014;85(8):e277-86. doi: 10.1902/jop.2014.130559.
21. Lulic M, Leiggenger Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009;36(8):661-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x.

22. Alberton Nuernberg MA, Janjacomio Miessi DM, Ivanaga CA, Bocalon Olivo M, Ervolino E, Gouveia Garcia V, et al. Influence of antimicrobial photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing on alveolar bone loss: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:354-363. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.020.
23. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(7):575-80. doi: 10.1111/j.1600-051x.2009.01412.x.
24. Pourabbas R, Kashefimehr A, Rahmanpour N, Babaloo Z, Kishen A, Tenenbaum HC, et al. Effects of photodynamic therapy on clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2014;85(9):1222-9. doi: 10.1902/jop.2014.130464.
25. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009;6(3-4):170-88. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
26. de Melo WC, Avci P, de Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(7):669-93. doi: 10.1586/14787210.2013.811861.
27. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B.* 2009;95(2):71-80. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.01.005.
28. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;294(2):133-40. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01555.x.
29. Zanolli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev.* 2004;10(3):203-18. doi: 10.1111/j.1527-3458.2004.tb00022.x.
30. Malkin, J, Mazur Y. Hypericin derived triplet states and transients in alcohols and water. *Photochem Photobiol.* 1993; 57(1): 929-933. doi:10.1111/j.1751-1097.1993.tb02951.x
31. Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(6):955-89. doi: 10.1111/1574-6976.12026.
32. Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(6):955-89. doi: 10.1111/1574-6976.12026.
33. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):626-32. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01085.x

34. Bernal C, Tominaga TT, Ribeiro AO, Imasato H, Perussi JR. Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8(2): 190. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.03.226.
35. Bernal C, Tominaga TT, Ribeiro AO, Imasato H, Perussi JR. Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8(2): 190. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.03.226.
36. Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira GJPL, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:43-49. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.003.
37. Cassimiro DL, Kobelnik M, Ribeiro CA, Crespi MS, Boralle N. Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin–meglumine supramolecular adducts. *Thermochim Acta.* 2012; 529: 59–67. doi: 10.1016/j.tca.2011.11.030.
38. Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1986;43(6):691-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb05648.x.
39. Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fátima 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. doi: 10.1007/s10103-011-0962-6.
40. 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. doi: 10.1590/s0100-879x2004000200016.
41. 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. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01198.x.
42. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1991; 53: 859–870.
43. 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. doi: 10.1016/0003-9969(92)90058-g.
44. 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. doi: 10.1166/jnn.2006.512.

45. 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. doi: 10.1016/j.ejps.2004.06.004.
46. Wilson M, Dobson J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 1993;16 Suppl 4:S414-5. doi: 10.1093/clinids/16.supplement_4.s414
47. 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. doi: 10.1002/lsm.1900160309.
48. Melo WCMA. Fotoinativação seletiva dos microorganismos: *Escherichia coli* e *staphylococcus aureus*. [tese de doutorado]. São Carlos: Bioengenharia, Universidade de São Paulo; 2014.
49. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):468-81. doi: 10.1002/lsm.20361.
50. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004;75(10):1343-9. doi: 10.1902/jop.2004.75.10.1343.
51. 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. doi: 10.1902/jop.2009.090214.
52. 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. doi: 10.1902/jop.2005.76.7.1100.
53. Holde GE, Oscarson N, Trovik TA, Tillberg A, Jönsson B. Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian Circumpolar Communities. *J Periodontol.* 2017;88(10):1012-1022. doi: 10.1902/jop.2017.170164.
54. Feres M, Cortelli SC, Figueiredo LC, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological basis for periodontal therapy. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(4):256-66. doi: 10.1590/s1678-77572004000400002.
55. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol.* 2014;85(3):465-77. doi: 10.1902/jop.2013.130225.
56. Hajishengallis G, Abe T, Maekawa T, Hajishengallis E, Lambris JD. Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium. *Semin Immunol.* 2013;25(1):65-72. doi: 10.1016/j.smim.2013.04.004.
57. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health.* 2017;10(4):369-378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
58. World Health Organization. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Geneva. WHO Library. 2014

59. Wainwright M. Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation?. *Photochem Photobiol Sci*. 2019;18(1):12-14. doi: 10.1039/c8pp00390d.
60. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem Rec*. 2017;17(8):775-802. doi: 10.1002/tcr.201600121.
61. Ogilby PR. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev*. 2010;39(8):3181-209. doi: 10.1039/b926014p.
62. Zhang R, Li Y, Zhou M, Wang C, Feng P, Miao W, et al. Photodynamic Chitosan Nano-Assembly as a Potent Alternative Candidate for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(30):26711-26721. doi: 10.1021/acsami.9b09020.
63. Kessel D. Photodynamic Therapy: A Brief History. *J Clin Med*. 2019; 8(10):1581. doi: 10.3390/jcm8101581.
64. de Freitas LM, Calixto GM, Chorilli M, Giusti JS, Bagnato VS, Soukos NS, et al. Polymeric Nanoparticle-Based Photodynamic Therapy for Chronic Periodontitis in Vivo. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(5):769. doi: 10.3390/ijms17050769.
65. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992; 55(1):145-57. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.
66. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1997; 39(1):1-18. doi: 10.1016/s1011-1344(96)07428-3.
67. Alwaeli HA, Al-Khateeb SN, Al-Sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(2):801-7. doi: 10.1007/s10103-013-1426-y.
68. Moreira AL, Novaes AB Jr, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL, Palioto DB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2015; 86(3):376-86. doi: 10.1902/jop.2014.140392.
69. Sreedhar A, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Kamath V, et al. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. *J Nat Sci Biol Med*. 2015; 6(Suppl 1):S102-9. doi: 10.4103/0976-9668.166100.
70. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(10):981-90. doi: 10.1111/1469-0691.12651.
71. Sun X, Wang L, Lynch CD, Sun X, Li X, Qi M, et al. Nanoparticles having amphiphilic silane containing Chlorin e6 with strong anti-biofilm activity against periodontitis-related pathogens. *J Dent*. 2019; 81:70-84. doi: 10.1016/j.jdent.2018.12.011.
72. Huang L, Wang M, Huang YY, El-Hussein A, Wolf LM, Chiang LY, et al. Progressive cationic functionalization of chlorin derivatives for antimicrobial photodynamic inactivation and related vancomycin conjugates. *Photochem Photobiol Sci*. 2018; 17(5):638-651. doi: 10.1039/c7pp00389g.

73. Zhang T, Ying D, Qi M, Li X, Fu L, Sun X, et al. Anti-Biofilm Property of Bioactive Upconversion Nanocomposites Containing Chlorin e6 against Periodontal Pathogens. *Molecules*. 2019; 24(15):2692. doi: 10.3390/molecules24152692.
74. de Freitas LM, Lorenzón EN, Santos-Filho NA, Zago LHP, Uliana MP, de Oliveira KT, et al. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. *Sci Rep*. 2018; 8(1):4212. doi: 10.1038/s41598-018-22687-x.
75. Shakhova M, Loginova D, Meller A, Sapunov D, Orlinskaya N, Shakhov A, et al. Photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer at 405 nm: numerical, morphological, and clinical study. *J Biomed Opt*. 2018; 23(9):1-9. doi: 10.1117/1.JBO.23.9.091412.
76. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys*. 2016; 26(12):123001. doi: 10.1088/1054-660X/26/12/123001.
77. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014; 5:405. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.
78. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10(1):1-18. doi: 10.1128/CMR.10.1.1-18.1997.
79. Pomposiello PJ, Dimple B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol*. 2002; 46:319-41. doi: 10.1016/s0065-2911(02)46007-9.
80. Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, et al. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog*. 2017; 110:56-65. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.015.
81. Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira GJPL, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019; 25:43-49. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.003.
82. Ackroyd R, Keltly C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2001; 74(5):656-69. doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2.
83. S Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001; 19(1):29-33. doi: 10.1089/104454701750066910.
84. Seeger K. Semiconductor physics - an introduction. 6th ed. Austria: Springer; 1997.
85. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM, et al. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg*. 2005; 31(9 Pt 2):1199-205. doi: 10.1111/j.1524-4725.2005.31926.

86. Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21(5):249-58. doi: 10.1089/104454703322564451.
87. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(2):167-71. doi: 10.1089/pho.2005.23.167.
88. Whelan HT, Connelly JF, Hodgson BD, Barbeau L, Post AC, Bullard G, et al. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20(6):319-24. doi: 10.1089/104454702320901107.
89. Borekci T, Meseli SE, Noyan U, Kuru BE, Kuru L. Efficacy of adjunctive photodynamic therapy in the treatment of generalized aggressive periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2019; 51(2):167-175. doi: 10.1002/lsm.23010.
90. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989;9(5):497-505. doi: 10.1002/lsm.1900090513.
91. Yeager RL, Franzosa JA, Millsap DS, Lim J, Heise SS, Wakhungu P, et al. Survivorship and mortality implications of developmental 670-nm phototherapy: dioxin co-exposure. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(1):29-32. doi: 10.1089/pho.2006.24.29.
92. Huang PJ, Huang YC, Su MF, Yang TY, Huang JR, Jiang CP. In vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoradiation of fibroblast collagen synthesis. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(3):183-90. doi: 10.1089/pho.2007.2062.
93. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(2):102-6. doi: 10.1089/pho.2006.2011.
94. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2004; 47(16):3897-915. doi: 10.1021/jm040074b.
95. Fickweiler S, Abels C, Karrer S, Bäumler W, Landthaler M, Hofstädter F, et al. Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 48(1):27-35. doi: 10.1016/S1011-1344(99)00004-4.
96. Karmakova T, Feofanov A, Pankratov A, Kazachkina N, Nazarova A, Yakubovskaya R, et al. Tissue distribution and in vivo photosensitizing activity of 13,15-[N-(3-hydroxypropyl)]cycloimide chlorin p6 and 13,15-(N-methoxy)cycloimide chlorin p6 methyl ester. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 82(1):28-36. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.08.006.
97. Wiedmann MW, Caca K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004; 5(4):397-408. doi: 10.2174/1389201043376805.

98. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004; 5(8):497-508. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
99. 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. doi: 10.1016/j.ejps.2004.06.004.
100. 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. doi: 10.1166/jnn.2006.512.
101. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5):436-50. doi: 10.1039/b311900a.
102. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim Nova.* 2007; 30(4): 988–994. doi: 10.1590/S0100-40422007000400039
103. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(3):221-41. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00126-1.
104. Kamuhabwa AR, Roelandts R, de Witte PA. Skin photosensitization with topical hypericin in hairless mice. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 53(1-3):110-4. doi: 10.1016/s1011-1344(99)00135-9.
105. Fox FE, Niu Z, Tobia A, Rook AH. Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol.* 1998; 111(2):327-32. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00278.x.
106. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(5-6):551-6. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04406.x.
107. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE, Belkin M. Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers Surg Med.* 1983; 2(3):267-74. doi: 10.1002/lsm.1900020310.
108. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3):626-32. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01085.x.
109. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95(2):71-80. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.01.005.
110. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6):2329-35. doi: 10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.

111. Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4):1542-52. doi: 10.1128/AAC.49.4.1542-1552.2005.
112. Stupáková V, Varinská L, Mirossay A, Sarisský M, Mojzis J, Dankovcík R, et al. Photodynamic effect of hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. *Phytother Res.* 2009; 23(6):827-32. doi: 10.1002/ptr.2681.
113. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x.
114. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000.* 2005;38:9-12. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00112.x.
115. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol.* 1992; 55(1):89-96. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04213.x.
116. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *JPhotochem Photobiol B.* 1992; 14(3):262-6. doi: 10.1016/1011-1344(92)85104-3.
117. Herrero ER, Fernandes S, Verspecht T, Ugarte-Berzal E, Boon N, Proost P, et al. Dysbiotic Biofilms Deregulate the Periodontal Inflammatory Response. *J Dent Res.* 2018; 97(5):547-555. doi: 10.1177/0022034517752675.
118. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Mol Oral Microbiol.* 2011; 26(4):253-61. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00615.x.
119. Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V, et al. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res.* 2014; 49(1):20-8. doi: 10.1111/jre.12073.
120. Millhouse E, Jose A, Sherry L, Lappin DF, Patel N, Middleton AM, et al. Development of an in vitro periodontal biofilm model for assessing antimicrobial and host modulatory effects of bioactive molecules. *BMC Oral Health.* 2014; 14:80. doi: 10.1186/1472-6831-14-80.
121. Ramage G, Lappin DF, Millhouse E, Malcolm J, Jose A, Yang J, et al. The epithelial cell response to health and disease associated oral biofilm models. *J Periodontal Res.* 2017; 52(3):325-333. doi: 10.1111/jre.12395.
122. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(17):7223-8. doi: 10.1073/pnas.0611328104.
123. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004; 1(4):279-93. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.

124. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7):481-90. doi: 10.1038/nrmicro2337.
125. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol.* 1984; 11(3):193-207. doi: 10.1111/j.1600-051x.1984.tb01323.x.
126. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998; 280(5361):295-8. doi: 10.1126/science.280.5361.295.
127. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(12):889-905. doi: 10.1093/jnci/90.12.889.
128. Wenzler JS, Böcher S, Frankenberger R, Braun A. Feasibility of transgingival laser irradiation for antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 28:75-79. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.08.030.
129. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003; 38(4):428-35. doi: 10.1034/j.1600-0765.2003.00673.x.
130. Longo M, Garcia V, Ervolino E, Alves ML, Duque C, Wainwright M, et al. Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: histomorphometrical, immunohistochemical, immunological and microbiological analyses. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 25:92-102. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.014.
131. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(2):142-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.10.006.
132. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech.* 2018; 81(12):1412-1421. doi: 10.1002/jemt.23101.
133. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4):e1002623. doi: 10.1371/journal.ppat.1002623.
134. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018; 26(3):229-242. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008.
135. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x.
136. Quishida CC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5):997-1009. doi: 10.1007/s10103-016-1942-7.

137. Trigo-Gutierrez JK, Sanitá PV, Tedesco AC, Pavarina AC, Mima EGO. Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018; 24:212-219. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.10.005.
138. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 61(1):e01162-16. doi: 10.1128/AAC.01162-16.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 07/2012

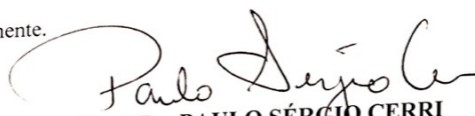
Araraquara, 13 de setembro de 2017.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado ***"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA E HIPERICINA-GLUCAMINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL. ESTUDO EM RATOS"*** (Proc. CEUA nº 07/2012), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de prorrogação no prazo da pesquisa.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **DEZEMBRO/2019**.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Vice-Coordenador da CEUA

À
Profa. Dra. ROSEMARY ADRIANA CHIERICI MARCANTONIO
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

APÊNDICE A – RESULTADOS

Resultados do modelo in vivo

Resultados obtidos por qPCR-PMA nos períodos Baseline, 7 dias e 30 dias após o tratamento. *P Value refere-se às diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no mesmo período; análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e testes de Tukey. †P Value refere-se às diferenças estatisticamente significativas para cada grupo entre os períodos em comparação com baseline (P <0,05); análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e testes de Tukey.

A. actinomycetemcomitans:

Grupo	Baseline	DP	7 Dias	DP	30 Dias	DP	P Value†
Grupo Controle	9,756	±0,54	8,753†	± 0,30	8,75†	± 0,34	P <0.05
Ftalocianina-glucamina (FTA)	9,312	±0,51	8,953†	± 0,61	8,733†	± 0,36	P <0.05
Hipericina-glucamina (HIPER)	9,867	± 0,40	8,193*†	± 0,23	8,747†	± 0,27	P <0.05
LED vermelho (LV)	9,899	± 0,48	9,336*†	± 0,52	8,536†	± 0,44	P <0.05
LED âmbar (LA)	10,58*	± 0,58	9,544*†	± 0,45	8,342*†	± 0,36	P <0.05
aPDT 1	10,25*	± 0,47	8,366†	± 0,27	8,394*†	± 0,35	P <0.05
aPDT 2	9,573	± 0,14	8,445†	± 0,44	7,805*†	± 0,75	P <0.05
P Value*	P <0.05		P <0.05		P <0.05		

F. nucleatum:

Grupo	Baseline	DP	7 Dias	DP	30 Dias	DP	P Value†
Grupo Controle	9,982	± 0,20	8,399†	± 0,27	9,185†	± 0,59	P <0.05
Ftalocianina-glucamina (FTA)	9,198*	± 0,32	9,346*	± 0,27	9,102	± 0,36	P <0.05
Hipericina-glucamina (HIPER)	9,651	± 0,14	9,045*†	± 0,52	9,322	± 0,55	P <0.05
LED vermelho (LV)	9,060*	± 0,36	9,154*	± 0,58	8,805	± 0,70	P <0.05
LED âmbar (LA)	10,12	± 0,22	9,172*†	± 0,64	8,88†	± 0,82	P <0.05
aPDT 1	9,762	± 0,42	9,452*	± 0,29	9,417	± 0,42	P <0.05
aPDT 2	9,105*	± 0,43	9,428*	± 0,11	9,268	± 0,33	P <0.05
P Value*	P <0.05		P <0.05		P <0.05		

P. gingivalis:

Grupo	Baseline	DP	7 Dias	DP	30 Dias	DP	P Value†
Grupo Controle	6,896	± 0,11	6,082†	± 0,39	6,987	± 0,31	P <0.05
Ftalocianina-glucamina (FTA)	6,055*	± 0,43	6,365	± 0,34	7,046†	± 0,24	P <0.05
Hipericina-glucamina (HIPER)	6,589*	± 0,39	6,517*	± 0,60	7,05†	± 0,26	P <0.05
LED vermelho (LV)	6,400*	± 0,30	6,503*	± 0,32	6,729	± 0,56	P <0.05
LED âmbar (LA)	6,993	± 0,12	5,99†	± 0,48	6,898	± 0,45	P <0.05
aPDT 1	6,743	± 0,26	7,135*	± 0,18	6,951	± 0,39	P <0.05
aPDT 2	5,886*	± 0,42	6,733*†	± 0,35	6,677†	± 0,38	P <0.05
P Value*	P <0.05		P <0.05		P <0.05		

S. oralis:

Resultados obtidos pela técnica de qPCR-PMA. *P Value refere-se às diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; análise de variância (ANOVA).

[illegible]

Não autorizo a publicação deste trabalho até 30/03/2022

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de março de 2020

Julio Cesar Sánchez Puetate