

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

DANIELE FERNANDA PERON

***Porphyromonas gingivalis* induz remodelamento cardíaco em ratos**

São Paulo, SP

2020

DANIELE FERNANDA PERON

***Porphyromonas gingivalis* induz remodelamento cardíaco em ratos**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de doutor em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Andrey Jorge Serra

São Paulo, SP

2020

Peron, Daniele Fernanda.

Porphyromonas gingivalis induz remodelamento cardíaco em ratos. / Daniele Fernanda Peron. 2020.

62 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. Audrey Jorge Serra.

1. *Porphyromonas gingivalis*. 2. Coração. 3. Infâmiação. 4. Doenças cardiovasculares.

Serra, Audrey Jorge. II. T(tulo.

CDU 615.831

SAo Paulo, 03 de junho de 2020

TERMO DE APROVASAO


Aluno (a): Daniele Fernanda Peron

Titulo da Tese: "Porphyromonas gengivalis induz remodelamento cardiaco em ratos".

Presidente: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA 

Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES 

Membro: PROFA. DRA. CHRISTIANE PAVANI 

Membro: PROFA. DRA. ANA CARLA RAPHAELI NANAS SCOCATE 

Membro: PROFA. DRA. CAMILA QUAGLIO 

Dedicatória

À Deus provedor e fonte de todo conhecimento e sabedoria, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar o meu caminho e me dar forças para seguir em frente.

Aos meus pais Guilherme Peron e Anita Peron responsáveis pela minha vida e a quem devo meu caráter e disciplina ao trabalho.

Ao meu marido Fabio Mukai Berbert companheiro da vida, meu porto seguro, me incentivando a percorrer este caminho e por compartilhar todos os momentos desta etapa.

À minha querida filha Isabela Peron Berbert presente de Deus, fonte constante de amor e afeto, razão da minha vida, força matriz que faz romper e vencer todos os desafios com alegria e determinação.

Agradecimentos especiais

Quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Andrey Jorge Serra pela paciência e compreensão nestes anos, sempre me incentivando e ajudando nas dificuldades encontradas. Admiro muito sua competência e determinação.

À toda minha família, irmãs, sobrinhos e cunhados pela compreensão nos momentos de ausência em busca das minhas realizações e objetivos.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Nove de Julho referência em ensino, a proporcionar este sonho em realidade.

Ao programa de mestrado e doutorado em Biofotônica aplicada a ciências da saúde por esta oportunidade, orgulho de ter sido aluna deste programa (Capes 5).

A professora e atual coordenadora do programa de pós-graduação stricto sensu de Biofotônica aplicada a ciência da saúde Profa. Dra. Kristhianne Porta Santos Fernandes por acreditar no potencial de cada aluno. Um grande exemplo!

A todo o corpo docente do programa de Biofotônica aplicada a ciência da saúde da Universidade Nove de Julho pela elevada qualidade de ensino oferecido.

Em especial ao Prof. Dr. Renato Araújo Prates, que desde o início deste estudo nos ajudou cordialmente e com toda gentileza na elaboração e criação com muita dedicação.

Aos colegas de doutorado por compartilhamos ensinamentos e momentos incríveis de amizade, principalmente as amigas Ana Paula Taboada Sobral e Fernanda Kobayashi.

Aos professores da banca examinadora deste trabalho meus agradecimentos e minha admiração pelas contribuições e considerações feitas tanto nas qualificações quanto na defesa.

Ao Prof. Dr. Paulo Tucci por ter acolhido no seu laboratório de fisiologia cardíaca da Unifesp e ter permitido a realização do meu protocolo experimental, dia a dia no seu laboratório.

A todos do laboratório de fisiologia cardíaca da Unifesp, em especial, Ednei, Igor, Helenita e Barbara por terem me apoiado e me ajudado nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Garcez por nos fornece gentilmente as bactérias *P. gingivalis* para a execução do trabalho.

A Capes por ter concedido a bolsa de estudo do doutorado.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta ajudaram na elaboração deste trabalho.

RESUMO

As *Porphyromonas gingivalis* estão presentes em várias formas de doenças periodontais. Ainda que uma associação entre a ação sinérgica das *P.gingivalis* e doenças cardiovasculares tenha sido sugerida, os efeitos das bactérias *P. gingivalis* como etiologia ainda não foram esclarecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a inoculação sistêmica de *P. gingivalis* poderia induzir remodelamento cardíaco em ratos. Foram utilizadas 33 ratas de linhagem Wistar, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: Sem inoculação de *P. gingivalis*: Inoculação de 1×10^8 UFC/mL de *P. gingivalis*: Inoculação de 3×10^8 UFC/mL de *P. gingivalis*. Inicialmente realizaram uma coleta de sangue basal e um ecocardiograma inicial em todos os animais, executaram uma coleta de sangue após sessenta minutos da primeira e segunda inoculação, no décimo quinto dia os animais inoculados receberam a segunda inoculação de *P. gingivalis*. No vigésimo nono dia os animais foram submetidos a última coleta de sangue e ao último ecocardiograma, no trigésimo dia, procedeu a hemodinâmica e a coleta dos tecidos em todos os grupos experimentais. Os resultados demonstraram que animais inoculados com maior concentração bacteriana 3×10^8 UFC/mL apresentaram um aumento na temperatura retal, uma redução do TRIV (Tempo de relaxamento isovolumétrico), teor de água no pulmão, exibiram $-dP/dt$ menor e PD_2 maior, um aumento da necrose miocárdica pelo CK-MB e pelos dados histológicos hematosina-eosina, um teor de colágeno pela coloração tricoma de masson, Intensificação do padrão em “escada” da fragmentação do DNA, aumento dos níveis de MDA (Malondialdeído) e proteínas oxidadas no miocárdio e a presença da expressão de macrófagos no miocárdio. Concluíram que animais inoculadas com 3×10^8 UFC/mL evoluíram com congestão disfunção sistólica e diastólica do VE, necrose, apoptose e fibrose miocárdica, aumento do estresse oxidativo e infiltrado inflamatório de macrófagos no miocárdio.

Palavras-chaves: Porphyromonas gingivalis, Coração, Doenças cardiovasculares, inflamação.

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis are present in various forms of periodontal diseases. Although an association between the synergistic action of *P.gingivalis* and cardiovascular diseases has been suggested, the effects of *P. gingivalis* bacteria as a cause have not yet been clarified. The aim of the present study was to evaluate whether the systemic inoculation of *P. gingivalis* could induce cardiac remodeling in rats. 33 rats of Wistar lineage were used, the animals were distributed in the following experimental groups: Without inoculation of *P. gingivalis*: Inoculation of 1×10^8 UFC / mL of *P. gingivalis*: Inoculation of 3×10^8 UFC / mL of *P. gingivalis*. Initially, they performed a basal blood collection and an initial echocardiogram in all animals, and performed a blood collection sixty minutes after the first and second inoculation, on the fifteenth day the inoculated animals received the second inoculation of *P. gingivalis*. On the twenty-ninth day, the animals underwent the last blood collection and on the last echocardiogram, on the thirty-th day, hemodynamics and tissue collection were performed in all experimental groups. The results showed that animals inoculated with a higher bacterial concentration 3×10^8 CFU / mL showed an increase in rectal temperature, a reduction in TRIV (Isovolumetric relaxation time), water content in the lung, exhibited a lower $-dP / dt$ and a greater PD2, an increase of myocardial necrosis by CK-MB and hematosin-eosin histological data, a collagen content by trichome staining, intensification of the "ladder" pattern of DNA fragmentation, increased levels of MDA (Malondialdehyde) and oxidized proteins in the myocardium and the presence of macrophage expression in the myocardium. They concluded that animals inoculated with 3×10^8 UFC/ mL evolved with LV systolic and diastolic dysfunction, necrosis, apoptosis and myocardial fibrosis, increased oxidative stress and inflammatory infiltrate of macrophages in the myocardium.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, Heart, Cardiovascular diseases, inflammation.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. METODOLOGIA.....	6
3.1 Grupos experimentais e desenho do estudo.....	6
3.2 Coleta de sangue	7
3.3 Preparo e inoculação da <i>P.gingivalis</i>	7
3.4 Temperatura Retal	8
3.5 Ecocardiograma	8
3.6 Cateterismo VE.....	8
3.7 Atividade sérica da isoforma MB da creatinoquinase (CK-MB)	9
3.8 Teor de água no pulmão, biometria cardíaca e armazenamento do material biológico.....	9
3.9 Histologia.....	10
3.10 Extração e análise da fragmentação de DNA	10
3.11 Imuno-histoquímica para macrófago.....	11
3.12 Marcadores de estresse oxidativo (MDA) (TBARS)	11
3.12.1 Oxidação Proteica (<i>Western blot</i>).....	12
3.13 Análise estatísticas.....	12
4. RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS.....	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental do estudo.....	6
Figura 2: Temperatura Retal	13
Figura 3: Estudo hemodinâmico.....	15
Figura 4: Atividade sérica da isoforma MB da creatinoquinase (CK-MB).....	15
Figura 5: Micrografias representativas dos grupos experimentais obtidas em coloração com hematoxilina/eosina	17
Figura 6: Micrografias representativas da marcação para colágeno no miocárdio.	18
Figura 7: Fotografia de eletroforese em gel de agarose que caracteriza a fragmentação em escada do DNA	18
Figura 8: Micrografias representativas dos grupos experimentais obtidas pela imunomarcação para macrófagos	19
Figura 9: Expressão de malondialdeído (MDA).....	19
Figura 10: Expressão de proteínas oxidadas	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados ecocardiográfico	14
Tabela 2: Dados biometricos	16

ABREVIATURAS

CK-MB - Atividade sérica da isoforma MB da creatinoquinase

DCM - Doença cardiomiopatia dilatada

DP - Doenças Periodontais

MDA - Expressão de malondialdeído

V E- Ventriculo Esquerdo

TRIV – Tempo de relaxamento isovolumétrico

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A doença periodontal (DP) caracteriza-se por infecção crônica consequente a níveis elevados de bactérias gram-negativas com períodos de exacerbação e de remissão. O fator causal corresponde ao acúmulo de componentes microbianos do biofilme dental no interior dos tecidos do periodonto, levando a destruição das estruturas periodontais, incluindo tecidos de suporte, ossos e ligamentos (PETERSEN; BOURGEOIS; OGAWA; ESTUPINAN-DAY *et al.*, 2005).

A agressão microbiana aos tecidos periodontais é determinada principalmente por bactérias gram-negativas, conhecidas como periodontopatogênicas, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* (O'BRIEN-SIMPSON; VEITH; DASHPER; REYNOLDS, 2004; SOCRANSKY; HAFFAJEE; CUGINI; SMITH *et al.*, 1998). A respeito da *P. gingivalis*, a bactéria é presente em várias formas de doenças periodontais e sua patogenicidade depende de fatores de virulência, incluindo fímbrias, lipopolissacarídeos e produção de toxinas. O resultado é colonização da placa subgengival com consequente invasão e destruição dos tecidos (BAINBRIDGE; DARVEAU, 2001). A participação da *P. gingivalis* na doença periodontal pode ser exemplificada em estudo conduzido na Tailândia, em que a bactéria estava presente na placa subgengival de 62% dos 479 indivíduos sem ou com periodontite leve e 96% dos 849 casos com periodontite severa (TORRUNGRUANG; JITPAKDEEBORDIN; CHARATKULANGKUN; GLEEBBUA, 2015).

O desfecho principal das doenças periodontais é a perda dentária, porém, há evidências que associam a periodontite com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo acidente vascular cerebral, aterosclerose, endocardite, infarto do miocárdio, miocardite e insuficiência cardíaca (BRODALA; MERRICKS; BELLINGER; DAMRONGSRI *et al.*, 2005; CHEN; CHEN; YANG; WU *et al.*, 2007; FRIEDEWALD; KORNMAN; BECK; GENCO *et al.*, 2009; GAUDILLIERE; CULOS; DJEBALI; TSAI *et al.*, 2019; LI; MESSAS; BATISTA; LEVINE *et al.*, 2002; MUSTAPHA; DEBREY; OLADUBU; UGARTE, 2007; NAKAYAMA, 2010; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005; SUZUKI; SATO; KANEKO; YOSHIDA *et al.*, 2017). Além disso, estudos

experimentais documentaram piora do remodelamento cardíaco em roedores com constrição da aorta (SEKINISHI; SUZUKI; AOYAMA; OGAWA *et al.*, 2012) e hiperatividade adrenérgica com isoproterenol (SATO; SOLANAS; PEIXOTO; BEE *et al.*, 2017) inoculados com dois importantes patógenos periodontais (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*). O tema assumiu relevância real em 2012, quando a associação americana do coração publicou um documento que suporta a associação entre doença periodontal e aterosclerose independente dos fatores de confusão conhecidos (LOCKHART; BOLGER; PAPAPANOU; OSINBOWALE *et al.*, 2012).

As informações precedentes conduzem a acreditar que patógenos orais podem agir sinergicamente com doenças cardiovasculares para acentuar o remodelamento cardíaco. Todavia, não é conhecido se esses patógenos podem despertar este conjunto de alterações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestam clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração em sujeitos desprovidos de doença cardíaca pré-existente (AZEVEDO; POLEGATO; MINICUCCI; PAIVA *et al.*, 2016). A presunção de que micro-organismo orais podem agir no miocárdio sadio tem fundamento em diversos estudos mostrando bacteremia basal em pacientes acometidos por doença periodontal (KINANE; RIGGIO; WALKER; MACKENZIE *et al.*, 2005; MURPHY; DALY; MITCHELL; STEWART *et al.*, 2006; MUSTAPHA; DEBREY; OLADUBU; UGARTE, 2007; SENTILHES; MICHAUD; MIDA, 1989). Além disso, a prevalência de bacteremia após procedimento cirúrgico pode ser alta em pacientes medicados ou não com antibióticos (POVEDA-RODA; JIMENEZ; CARBONELL; GAVALDA *et al.*, 2008; TOMAS; ALVAREZ; LIMERES; POTEL *et al.*, 2007; TOMAS; DIZ; TOBIAS; SCULLY *et al.*, 2012).

A procura do patógeno que poderia conectar a doença periodontal com o desenvolvimento de anormalidades cardiovasculares conduz a considerar o envolvimento da *P. gingivalis*. Toma-se como exemplo o estudo de (AOYAMA; KURE; MINABE; IZUMI, 2019), em que os autores reportaram que pacientes com níveis elevados de anticorpo contra *P. gingivalis* exibiram taxas altas de insuficiência cardíaca comparados com sujeitos que tinha menores níveis do anticorpo.

O mecanismo que conecta a doença periodontal às anomalias

cardiovasculares, tendo a *P. gingivalis* como agente causador, ainda não foi elucidado, em que a resposta inflamatória sistêmica surge como explicação mais razoável (GAUDILLIERE; CULOS; DJEBALI; TSAI *et al.*, 2019). Por exemplo, a invasão bacteriana da parede arterial resulta em maior expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , o que desperta recrutamento de monócitos e aumenta a captação de lipídeos pelos macrófagos (CHEN; CHEN; YANG; WU *et al.*, 2007). Essa informação corrobora achados de que a exposição a longo prazo à *P. gingivalis* acelera a progressão da placa aterogênica (LI; MESSAS; BATISTA; LEVINE *et al.*, 2002). A resposta inflamatória despertada pela *P. gingivalis* pode ser mediada pela ação de lipopolissacarídeos (LPS) e da protease gingipain-cisteína, culminando em apoptose, secreção de citocinas pró-inflamatórias e ruptura de leucócitos polimorfo nucleares (ABREU; VORA; FAURE; THOMAS *et al.*, 2001; GUTIERREZ-VENEGAS; TORRAS-CEBALLOS; GOMEZ-MORA; FERNANDEZ-ROJAS, 2017; MULLER-WERDAN; SCHUMANN; LOPPNOW; FUCHS *et al.*, 1998; MYERS; MURTHY; FLANIGAN; WITCHELL *et al.*, 2003). Em conjunto, esses fatores conduzem ao desenvolvimento de miocardite bacteriana (SHARMA; NOVAK; SOJAR; SWANK *et al.*, 2000).

A respeito da possível atuação da *P. gingivalis* no miocárdio, as primeiras evidências derivaram de experimentos *in vitro* com mioblastos incubados em meio de cultura das bactérias. Em conjunto, os estudos foram concordantes em ilustrar que meio de cultura da *P. gingivalis* induz hipertrofia e apoptose cardiomiócitos (LEE; CHANG; KUO; YING *et al.*, 2006; LEE; KUO; LIN; CHEN *et al.*, 2006; LEE; WU; CHANG; CHANG *et al.*, 2006; WU; YEH; KUO; HUANG *et al.*, 2008).

Ao considerar condições experimentais *in vivo* que caracterizaram o impacto da *P. gingivalis*, a literatura é escassa e contraditória. Akamatsu *et al.* foram os pioneiros a demonstrar que camundongos inoculados com 2×10^8 UFC/mL *i.v.* de *P. gingivalis* exibiram infiltrado de neutrófilos e monócitos no miocárdio (AKAMATSU; YAMAMOTO; YAMAMOTO; OSEKO *et al.*, 2011). Esses achados foram acompanhados de maiores níveis teciduais de IL1- β , IL-6, IL17A, IL-18, TNF- α e IFN- γ . Em outro estudo realizado por Ashigaki *et al.* (2013), camundongos sujeitos a três injeções *s.c.* de 10^9 UFC/mL de *P. gingivalis* não apresentaram qualquer efeito deletério miocárdico (ASHIGAKI;

SUZUKI; OGAWA; WATANABE *et al.*, 2013). Em suma, esses estudos ilustram que há controvérsia a respeito da repercussão negativa da *P. gingivalis* no coração sem anormalidades pré-existentes. Além disso, não há dados na literatura que ilustram as repercussões funcionais cardíacas associadas à infecção por *P. gingivalis*. Consequentemente, as limitações e achados inclusivos acerca da ação da *P. gingivalis* no miocárdio fomentaram a realização deste estudo experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar se a inoculação sistêmica de *P. gingivalis* pode induzir remodelamento cardíaco em ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a temperatura retal dos animais;
- Avaliar dados biométricos cardiopulmonares;
- Analisar a morfologia e função VE;
- Examinar a morte celular por necrose e apoptose.
- Estudar marcadores de estresse oxidativo;
- Avaliar o teor de fibrose e macrófagos no miocárdio.

3. METODOLOGIA

3.1. Grupos experimentais e desenho de estudo

Um total de 33 ratas de linhagem Wistar-EPM, com oito semanas de vida e peso corporal entre 180 e 200 g, foram utilizadas no estudo. As ratas foram mantidas no biotério sob condições controladas de umidade do ar (50% - 60%), luminosidade (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura ambiente (22°C - 25°C). Procedeu-se com alocação das ratas em caixas plásticas, agrupados em no máximo quatro animais por caixa. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal de São Paulo (processo: 4396121018). As ratas foram distribuídas em um dos seguintes grupos experimentais:

- Sem inoculação de *P. gingivalis* (SHAM, n = 11): ratas não submetidas a inoculação de *P. gingivalis* e que receberam somente injeção do meio de diluição das bactérias em duas etapas (1º e 15º dias do estudo);
- Inoculação de *P. gingivalis* (n = 11): ratas submetidas a inoculação de 1×10^8 UFC/mL de *P. gingivalis*, sendo inoculadas em duas etapas (1º e 15º dias do estudo);
- Inoculação de *P. gingivalis* (n = 11): ratas submetidas a inoculação de 3×10^8 UFC/mL de *P. gingivalis*, sendo inoculadas em duas etapas (1º e 15º dias do estudo).

O protocolo experimental foi definido com base em um estudo prévio da literatura, em que os autores inocularam 2×10^8 UFC/mL de *P. gingivalis* em camundongos em dois momentos – inicial e após 15 dias da primeira inoculação (AKAMATSU; YAMAMOTO; YAMAMOTO; OSEKO *et al.*, 2011). Esse protocolo promoveu o desenvolvimento de fibrose miocárdica e infiltrado inflamatório no seguimento de 28 dias. Assim, nós seguimos o mesmo desenho experimental, todavia, para caracterizar o efeito da carga bacteriana, optamos por incluir um grupo de ratos com menor e maior carga bacteriana, respectivamente, ao adotado no estudo utilizado como base – Akamatsu *et al.* (AKAMATSU; YAMAMOTO; YAMAMOTO; OSEKO *et al.*, 2011). O desenho experimental do estudo pode ser visualizado na Figura 1.

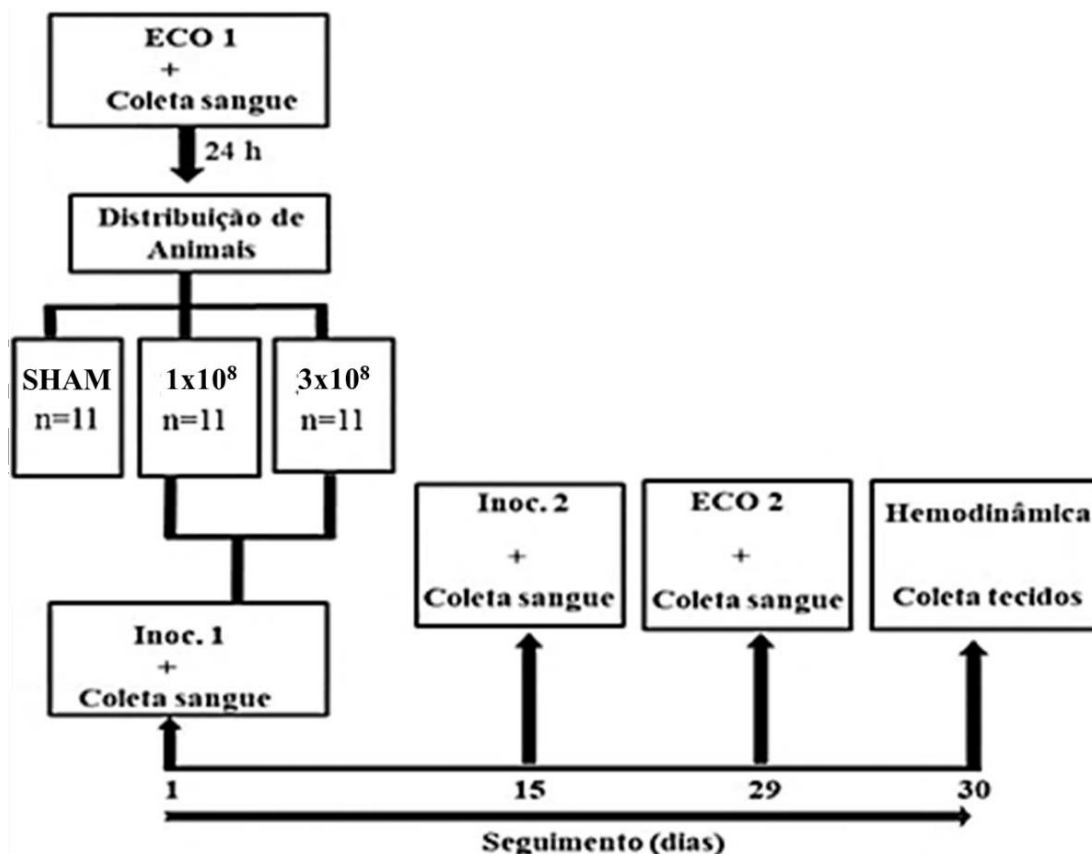


Figura 1. Desenho experimental do estudo, contemplando as intervenções, coleta de material biológico e função do VE.

3.2. Coleta de sangue

Os animais foram anestesiados com Isoflurano 5% e dose de manutenção de 2%. Com auxílio de capilares de vidro procedeu-se com a coleta de 1 ml de sangue da fossa ocular. As coletas de sangue foram realizadas 24 horas antes da primeira inoculação bacteriana (basal) e 60 minutos após cada uma das inoculações de *P. gingivalis*. O sangue foi centrifugado por 12 minutos a 4000 rpm e as amostras de soro foram separadas e armazenadas a -80°C para posterior processamento.

3.3. Preparo e inoculação da *P. gingivalis*

A *P. gingivalis* ATCC 33277 (<https://www.atcc.org/products/all/33277.aspx>) foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Aguinaldo Garcez. As bactérias foram cultivadas em ágar sangue e acondicionado em atmosfera anaeróbica a 37°C por 48 a 72 horas. Colônias crescidas puras foram colhidas e cultivadas novamente por 72 horas em 10 mL

de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). O tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e, posteriormente, o sobrenadante foi removido. O precipitado de células microbianas foi suspenso em 3 mL de tampão fosfatos (PBS; pH 7,2). A suspensão foi diluída de 10^{-1} a 10^{-8} vezes a concentração original e as placas foram incubadas por 48 horas em jarra de anaerobiose a 37°C para contagem de UFC/mL. Foi obtido uma concentração de inóculo de aproximadamente 10^9 UFC/mL. Para inoculação contaminante dos ratos, foi selecionado 0,1 μ L do inóculo para o grupo 1×10^8 e 0,3 μ L para o grupo 3×10^8 . As bactérias foram inoculadas via veia caudal previamente aquecida para causar dilatação.

3.4. Temperatura retal

A temperatura retal foi avaliada com termômetro digital (Letica, Hb101/2, Espanha) em quatro animais por grupo (Letica, Hb101/2, Espanha) (TUCCI, 2012). A mensuração foi realizada 5 minutos após a inoculação e, em período similar para o grupo SHAM.

3.5. Ecocardiograma

O exame foi realizado no final do estudo (i.e. 28 dias) em aparelho HP SONOS 5500, estando os animais anestesiados com mistura de quetamina (50 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), i.p. As áreas do ventrículo esquerdo (VE) ao final da diástole (AdVE) e da sístole (AsVE) foram analisadas em modo bidimensional. A função sistólica foi avaliada por meio da fração de encurtamento da área transversa (FEAT) segundo a fórmula: $FEAT = (AdVE - AsVE) / AdVE \times 100\%$. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se a amostragem de volume próximo à face ventricular da valva mitral. Então, determinou-se os valores de onda E (maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular), onda A (maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral) e razão E/A (DE SOUZA VIEIRA; ANTONIO; DE MELO; PORTES *et al.*, 2019; PICOLLO; SANTOS; ANTONIO; SILVA *et al.*, 2019).

3.6. Cateterismo do VE

Os animais foram avaliados 24 horas após o último exame

ecocardiográfico. O procedimento foi conduzido com os animais anestesiados com Uretana (1,2 g/kg, i.p.), aquecidos à 37°C e ventilados mecanicamente. A partir do cateterismo da artéria carótida direita, um micromanômetro Millar modelo Mikro-Tip 2F (AD Instruments, Sidney, AUS) foi posicionado dentro do VE. Os registros obtidos por meio do *software* AcqKnowledge® (versão 3.7.5.; Camino Goleta, CA, EUA) da pressão intraventricular possibilitaram computar os valores da frequência cardíaca (em batimentos por min), das pressões ventriculares (mmHg) sistólica (PSVE) e diastólica final (PDfVE) e da primeira derivada temporal da pressão (mmHg/s) positiva (+dP/dt) e negativa (-dP/dt) (LEVY; SERRA; ANTONIO; DOS SANTOS *et al.*, 2017; MANCHINI; ANTONIO; SILVA JUNIOR; DE CARVALHO *et al.*, 2017).

3.7. Atividade sérica da isoforma MB da creatinoquinase (CK-MB)

A atividade enzimática da CK-MB foi realizada com quite da Biotécnica (ref.:1100300; Biotécnica Inc., Varginha, MG, Brasil). O reagente de trabalho foi preparado conforme instruções do fabricante e pré-aquecido em banho maria à 37°C durante 180 segundos. Seguiu-se com adição de 8 µL de soro em 200 µL de reagente de trabalho em duplicata em placa de 96 poços. Após 120 segundos, realizou-se quatro leituras a 340 nm em intervalos de 60 segundos em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

3.8. Teor de água no pulmão, biometria cardíaca e armazenamento do material biológico

Imediatamente após estudo hemodinâmico, os animais foram eutanasiados com superdosagem de Uretana (4,8 g/kg⁻¹; i.p.) (SERRA; SANTOS; BOCALINI; ANTONIO *et al.*, 2010). O pulmão direito foi retirado e pesado para obtenção do valor de massa tecidual úmida (MU). Em seguida, o pulmão foi mantido em dessecador a 80°C por 24 h e pesado para obtenção da massa tecidual seca (MS). O teor de água no pulmão foi utilizado como indicador de insuficiência cardíaca e calculado com a seguinte equação: [(MU–MS)/MU]x100. O coração foi retirado, dissecado para retirada dos vasos da base e átrios e, em seguida, foi pesado em balança analítica de precisão de 0,0001 g. Em seguida, o VE foi separado para determinação de sua massa e transversalmente cortado em duas porções. A porção basal foi conservada em

formol tamponado 10% e a porção apical congelada em freezer -80°C.

3.9. Histologia

A porção basal do VE pré-fixada em formol tamponado a 10% foi desidratada em soluções crescente de álcool etílico (70%, 80% e 90%) por 90 minutos cada, três passagens em álcool absoluto e Xilol, respectivamente. Após impregnação do tecido em parafina, os músculos foram clivados e incluídos transversalmente no bloco para obtenção de dois cortes de 12 µm de espessura em micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram dispostos em lâminas de microscópio e mantidos repousando a 37°C por 12 horas para seguinte coloração com hematoxilina-eosina e tricromo de Masson. As lâminas foram visualizadas em microscópio Olympus (modelo BX53, Shinjuku, Tokio, Japão) com o objetivo de avaliar áreas com presença de infiltrado inflamatório, edema, necrose e fibrose intersticial. A expressão de colágeno foi realizada em 8-10 fotomicrografias documentadas aleatoriamente em aumento de 20x. As análises foram conduzidas por dois avaliadores independentes com *software* Image-Pro Plus (Rockville, EUA) desprezando-se as mensurações na região perivascular.

3.10. Extração e análise da fragmentação de DNA

Para a obtenção de DNA genômico, 50 mg de tecidos foram homogeneizados com 500 µL de solução TNES (Tris-HCl 250 mM (pH= 7,5), NaCl 2 mM, EDTA 100 mM, SDS 2,5%). A essa mistura foram adicionados 5 µL de proteinase K (20 mg/ml), seguido de agitação em vórtex por 10 segundos e incubação a 65°C por 40 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas no gelo, adicionados 3 µL de ribonuclease A (4 mg/ml), agitadas em vórtex por 10 segundos e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de NaCl 5 M, agitadas em vórtex por 10 segundos e centrifugadas a 15000 xg a 4°C por 6 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol 100% gelado e as amostras centrifugadas a 15000 xg à 4°C por 6 minutos. Os sobrenadantes foram descartados por inversão e 600 µL de etanol 70% gelado foram adicionados aos precipitados, seguido de centrifugação a 15000 xg à 4°C por 6 minutos. Após o descarte dos sobrenadantes, os precipitados foram

secos em estufa a 37°C e, então, ressuspensos em 30 µL de solução TE (Tris-HCl 10mM (pH = 8,0), EDTA-NaOH (pH 8,0; 1 mM)). Alíquotas de 5 µg do DNA foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 90 V e corrente de 60 mA constantes. Foram utilizados marcador de peso molecular de 1 Kb e as imagens dos géis foram digitalizadas em transluminador UV Kodak, modelo 120 (Koda, NY, EUA).

3.11. Imuno-histoquímica para macrófago

A porção basal do VE embutida em parafina foi cortada transversalmente em duas fatias de 7 µm de espessura. As amostras foram fixadas em lâminas silanizadas e incubadas com anticorpo monoclonal primário anti-*macrophage* HAM-56 (1:100, ref.: 279M-16; Cell Marque, CA, EUA) por cerca de 18 horas (Marques et al., 2016 de Oliveira et al., 2018). Após lavagem de 30 minutos, a reação de coloração foi realizada com diaminobenzidina (Scytek Laboratories, Logan, EUA) e os núcleos contrastados com hematoxilina. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus (modelo BX53, Shinjuku, Tokio, Japão). Para cada lâmina, foram registradas aleatoriamente de 8 a 10 fotomicrografias correspondentes as regiões meso/subendocárdica em aumento de 20x. A expressão de macrófagos foi analisada por dois avaliadores independentes com software Image-Pro Plus (Rockville, EUA) desprezando-se as mensurações na região perivascular.

3.12. Marcadores de estresse oxidativo

A lipoperoxidação foi determinada pela análise dos níveis miocárdicos de malondialdeído (MDA) com ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DOS SANTOS; DE OLIVEIRA; ANTONIO; TEIXEIRA *et al.*, 2020). Para tal, 40 mg do VE foi homogeneizado em 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M; SDS 0,5%; DTT 1mM; pH 8). Preparou-se mistura contendo 250 µL de homogenato, 50 µL de 4% butilidroxitolueno (BHT), 300 µL de ácido acético 20% e 300 µL 0,78% de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (pH 3,5). Foram preparadas misturas contendo 250 µL de homogenato, 50 µL de BHT 4%, 300 µL de ácido acético 20% e 300 µL 0,78%

de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (pH 3,5). Em seguida, a mistura foi aquecida a 95°C por 60 minutos e centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos. Então, 100 µL do sobrenadante foi pipetado em duplicata em placa de 96 poços para determinação da absorbância em 532 nm em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína total dosada pelo método de Bradford e expressos como mM/g de proteína total.

O teor de proteínas oxidadas foi analisado por *Western blot* com quite da Abcam (ref.: ab178020, Abcam, Cambridge, MA, EUA) em homogenato de VE contendo 10 µg de proteína (DE OLIVEIRA; ANTONIO; ARSA; SANTANA *et al.*, 2018; GRANDINETTI; CARLOS; ANTONIO; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-poliacrilamida (12%) e, em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno. A eficiência da transferência e a igualdade da carga de proteínas foram verificadas com Ponceau S. As membranas foram bloqueadas em TBST (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20; pH 7,4), contendo BSA 5%, lavadas três vezes e, em seguida, incubada *overnight* a 4°C com os anticorpos disponíveis no quite. Após lavagem com TBST, as membranas foram expostas ao reagente de detecção por quimiluminescência. Marcadores de peso molecular foram usados para identificar as proteínas. A expressão proteica foi determinada por imagem obtida em fotodocumentador (ImageQuant 4000 mini, GE, Alemanha) e a densidade óptica das lâminas foram mensuradas em *software* do próprio equipamento.

3.13. Análise estatística

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão da média. A normalidade dos dados foi analisada com teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram analisados com ANOVA uma (pós-teste de Newman-Keuls) ou duas (pós-teste de Bonferroni) vias. Dados não paramétricos foram analisados com Kruskal-Wallis complementado por Dunns. Todas as análises foram realizadas com o programa *Graph Pad Prism* (versão 6,01; CA, EUA). O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais dos animais

Os 33 animais incluídos no estudo sobreviveram até o final do protocolo independentemente da infecção bacteriana com *P. gingivalis*. Ao final do período do estudo e, seguinte eutanásia dos animais, procedeu-se com a análise macroscópica de órgãos vitais e que não revelou anormalidades patentes em decorrência da inoculação com *P. gingivalis*.

Como análise inicial da repercussão da *P. gingivalis*, observamos que houve aumento significativo da temperatura retal (Figura 2). Nota-se, ainda, que as alterações de temperatura ocorreram independentemente da concentração de bactérias inoculadas.

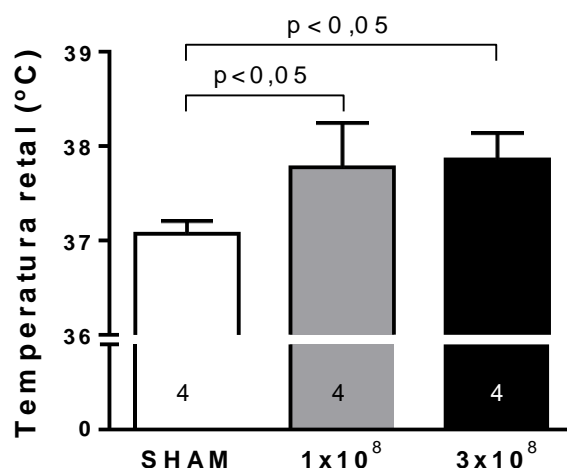


Figura 2. Temperatura retal dos animais SHAM e submetidos a inoculação de diferentes concentrações de *P. gingivalis*. O tamanho amostral para cada grupo experimental é ilustrado dentro das respectivas barras. Os registros foram obtidos com cinco minutos após cada inoculação. O nível de significância para cada comparação é representado acima das barras.

4.2. Dados ecocardiográficos

Dados morfologia e desempenho do VE estão dispostos na Tabela 1. As áreas diastólicas e sistólicas finais isoladas ou indexadas pela massa corporal não diferiram entre os grupos experimentais. Circunstância congênere foi verificada para os dados de frequência cardíaca, FAC, ondas E e A e razão

E/A. As duas concentrações de *P. gingivalis* resultaram em valores menores do TRIV em comparação ao grupo SHAM.

Tabela 1. Dados ecocardiográficos do ventrículo esquerdo.

	SHAM (n=11)	1x10⁸ (n=11)	3x10⁸ (n=11)
AdVE (cm ²)	0,33±0,07	0,34±0,04	0,36±0,08
AsVE (cm ²)	0,12±0,02	0,13±0,03	0,12±0,02
AdVE/MC (cm ² /g)	0,0014±0,0003	0,0015±0,0002	0,0013±0,0003
AsVE/MC (cm ² /g)	0,00051±0,00012	0,00057±0,00013	0,00046±0,00013
FC (bpm)	261±36	229±57	227±59
FAC (%)	63±4	60±9	64±7
Onda E (cm/s)	88±12	82±18	80±11
Onda A (cm/s)	36±11	34±4	41±8
Razão E/A	2,6±1	2,7±1,3	2±0,6
TRIV (ms)	22±2	16±2*	17±2*

AdVE, área diastólica final do VE; AsVE, área sistólica final do VE; FC, frequência cardíaca; FAC, variação fracional da área; MC, massa corporal; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico; *p<0,05 vs. grupo SHAM.

4.3. Hemodinâmica do VE

Dados provenientes das análises hemodinâmicas do VE estão dispostos na Figura 3. A frequência cardíaca (Figura 3A) e a pressão sistólica do VE (Figura 3B) não diferiram significativamente entre os grupos experimentais. Todavia, os dois grupos inoculados com concentrações distintas de *P. gingivalis* exibiram valores significativamente maiores da pressão diastólica final do VE comparados ao grupo SHAM (Figura 3C). A análise dos dados hemodinâmicos revela um padrão de disfunção ventricular dependente da carga bacteriana inoculada. Assim, os valores da +dP/dt (Figura 3D) e -dP/dt (Figura 3E) foram significativamente menores nos animais sujeitos a *P. gingivalis* somente quando inoculados com a maior carga bacteriana.

Figura 3. Hemodinâmica do ventrículo esquerdo (VE). (A) FC, frequência cardíaca; (B) PVE, pressão sistólica; (C), PD₂, pressão diastólica final; primeira derivada temporal da pressão positiva (D) e negativa (E). O tamanho amostral para cada grupo experimental é ilustrado dentro das respectivas barras. O nível de significância para cada comparação é representado acima das barras.

4.4. Necrose miocárdica

A Figura 4 ilustra os valores médios da atividade sérica da CK-MB em condições basais e 60 minutos após cada inoculação de *P. gingivalis*. Houve aumento significativo na atividade enzimática somente após inoculação da maior carga bacteriana. Diferença significantes foram caracterizadas somente após a segunda inoculação.

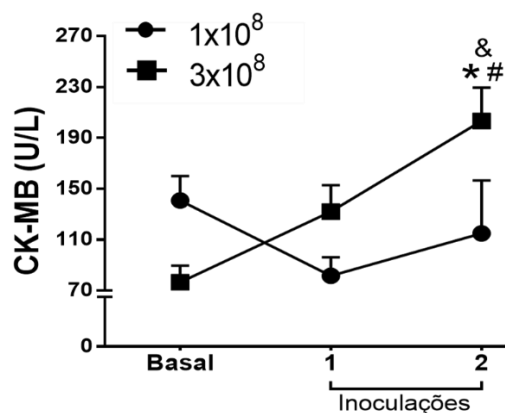


Figura 4. Atividade sérica da isoforma MB da creatinoquinase (CK-MB) em ratos em condições basais e após a inoculação de 1×10^8 (n=7) e 3×10^8 (n=8) de *P. gingivalis*. As análises foram conduzidas em amostras coletadas após 60 minutos para cada inoculação. *p<0,0001 vs. Basal; #p<0,01 vs. vs. Inoculação 1; &p<0,05 vs. 1×10^8 .

4.5. Variáveis biométricas

A Tabela 2 ilustra os dados biométricas obtidos ao final do seguimento de 28 dias de estudo. A massa corporal foi significativamente maior nos animais que receberam 3×10^8 de *P. gingivalis* em comparação aos grupos SHAM e 1×10^8 . A *P. gingivalis* despertou aumento na massa cardíaca isolada somente nos animais submetidos a inoculação de 3×10^8 , que diferiram dos demais grupos experimentais. Todavia, quando a massa cardíaca foi indexada pela massa corporal, as diferenças significantes entre os grupos experimentais desapareceram. Os valores de massa do ventrículo direito e VE foram semelhantes entre os grupos experimentais. A inoculação de *P. gingivalis* resultou em aumento no teor de água pulmonar somente nos animais inoculados com 3×10^8 .

Tabela 2. Dados biométricos.

	SHAM (n=11)	1x10⁸ (n=11)	3x10⁸ (n=11)
MC (g)	237±23	228±18	268±14 ^{*#}
Peso cardíaco (mg)	751±103	687±72	827±85 ^{*#}
Peso do VE (mg)	543±100	539±66	611±52
Peso do VD (mg)	172±49	147±10	216±108
Peso cardíaco/MC (mg/g)	3±0,4	3±0,2	3,1±0,2
Peso do VE/MC (mg/g)	2,3±0,4	2,4±0,2	2,3±0,2
Peso do VD/MC (mg/g)	0,72±0,2	0,65±0,04	0,79±0,38
H ₂ O pulmonar (%)	78,6±1,4	79,9±0,8	81,3±2,4 [*]

MC, massa corporal; VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito. ^{*}p<0,05 vs. grupo SHAM; [#]p<0,05 vs. grupo SHAM.

4.6. Dados histológicos

Análises das imagens de cortes do miocárdio coradas com hematoxilina-eosina e documentadas em microscopia de luz corroboraram os achados de atividade plasmática da CK-MB ao indicarem a existência de dano miocárdico

nos animais do grupo 3×10^8 . Como ilustrado na Figura 5, documentou-se presença de miocitólise delimitada por tecido de granulação, cardiomiócitos sem estriações e fibras musculares com citoplasma em tumefação.

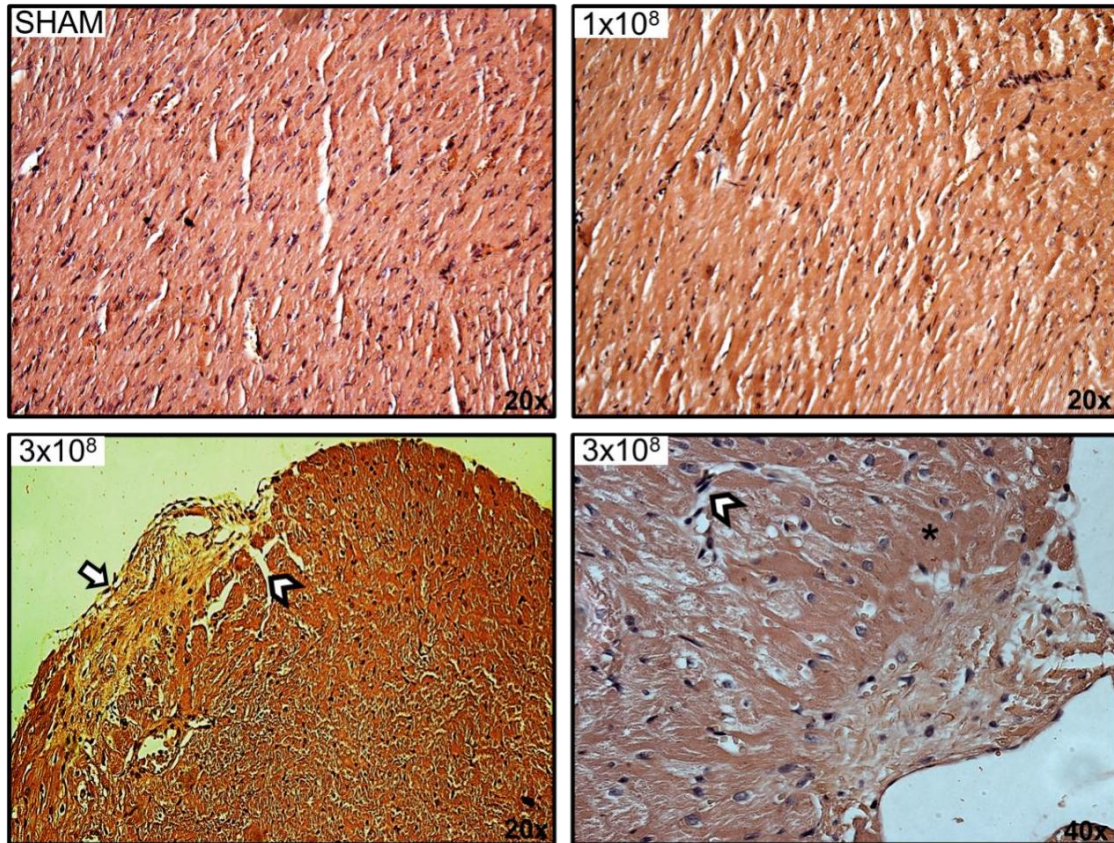


Figura 5. Micrografias representativas dos grupos experimentais obtidas em coloração com hematoxilina/eosina. Nota-se a presença de miocitólise delimitada por tecido de granulação (S), cardiomiócitos sem estriações (*) e fibras musculares com citoplasma em tumefação (T). As fotomicrografias foram registradas com ampliações de 20 x e 40 x, conforme reportado na borda inferior direita de cada painel.

O conteúdo de colágeno no miocárdio foi examinado em cortes montados sobre as lâminas coradas pelo método de tricromo de Masson (Figura 6). A concentração de colágeno nos animais submetidos à menor carga bacteriana não foi estatisticamente diferente das mensurações adquiridas em regiões equivalentes no grupo SHAM. Contudo, ratas sujeitadas à carga de *P. gingivalis* de 3×10^8 exibiram fibrose miocárdica patente, em que os valores de teor do colágeno foram significativamente superiores em comparação aos registrados para os grupos SHAM e 1×10^8 .

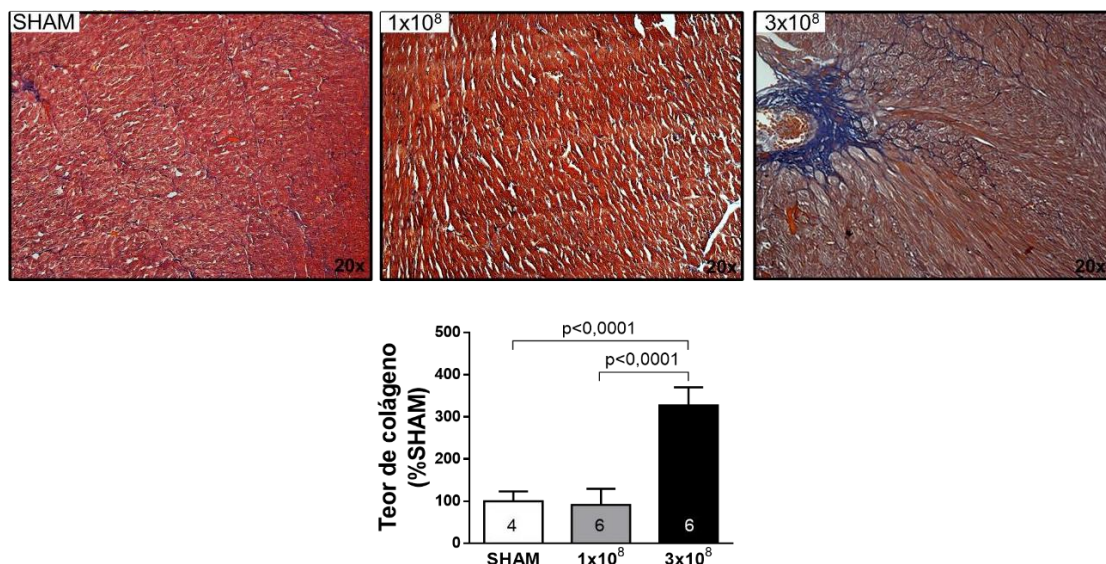


Figura 6. No topo da figura são ilustradas micrografias representativas da marcação para colágeno no miocárdio (área azuladas) de cada grupo experimental. As imagens foram registradas com aumento de 20x. O gráfico representa a quantificação do teor de colágeno. O tamanho amostral para cada grupo experimental é ilustrado dentro das respectivas barras. O nível de significância para cada comparação é representado acima das barras.

4.7. Fragmentação de DNA internucleossomal

A Figura 7 representa a fragmentação de DNA analisada com emprego de gel de agarose. O padrão em “escada” foi intensificado somente com maiores quantidades de *P. gingivalis*, situação que vigorou no grupo 3x10⁸.

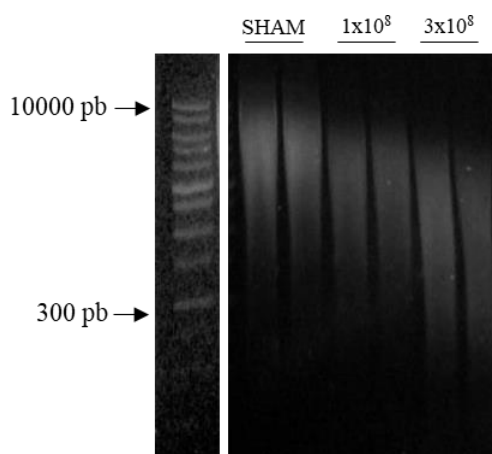


Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose que caracteriza a fragmentação em escada do DNA. Pares de base são indicados pelas setas à esquerda. Notar que nas amostras do grupo 3x10⁸ a fragmentação do DNA está intensificada. Experimentos representativos de duas amostras de miocárdio por grupo.

4.8. Imuno-histoquímica

A quantificação do teor de macrófagos no miocárdio do grupo 1x10⁸ não

foi estatisticamente diferente das mensurações adquiridas no grupo SHAM (Figura 8). Contudo, a expressão de macrófagos no miocárdio do grupo 3×10^8 foi significativamente maior em comparação aos grupos SHAM e 1×10^8 .

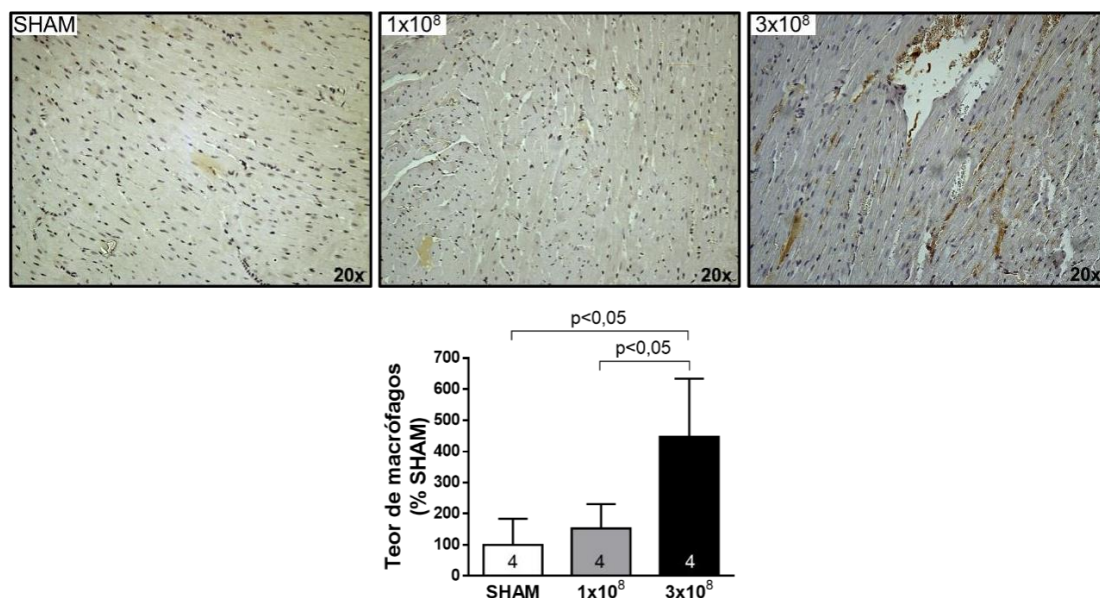


Figura 8. Micrografias representativas dos grupos experimentais obtidas pela imunomarcção para macrófagos (painel superior). Regiões positivas apresentam coloração acastanhada. As imagens foram registradas com aumento de 20x. O gráfico representa a quantificação do teor de macrófagos. O tamanho amostral para cada grupo experimental é ilustrado dentro das respectivas barras. O nível de significância para cada comparação é representado acima das barras.

4.9. Lipoperoxidação

A expressão de MDA no miocárdio foi significativamente aumentada nos animais submetidos a *P. gingivalis* e aumento na lipoperoxidação foi independente da concentração de bactérias inoculadas (Figura 9).

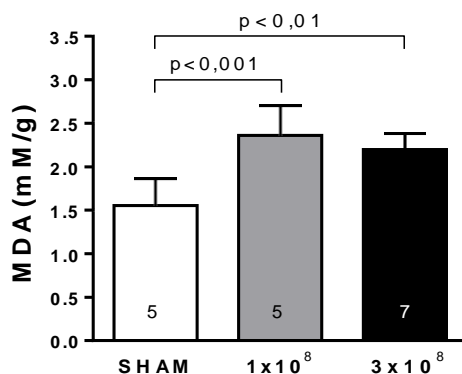


Figura 9. Expressão de malondialdeído (MDA) no miocárdio de ratos SHAM e submetidas a inoculação de 1×10^8 e 3×10^8 de *P. gingivalis*, respectivamente. O tamanho amostral para cada grupo experimental é ilustrado dentro das respectivas barras. O nível de significância para cada comparação é representado acima das

barras.

4.10. Proteínas oxidadas

Dados da expressão de proteínas oxidadas no miocárdio são ilustrados na Figura 10. Houve maiores níveis de oxidação proteica nos dois grupos inoculados com *P. gingivalis*.

Figura 10. Teor de proteínas oxidadas no miocárdio de ratas SHAM e submetidas a inoculação de 1×10^8 e 3×10^8 UFC/ml de *P. gingivalis*, respectivamente. O tamanho amostral para cada grupo experimental é ilustrado dentro das respectivas barras. O nível de significância para cada comparação é representado acima das barras.

DISCUSSÃO

A miocardite é uma doença caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório associada com morte dos cardiomiócitos não ligada ao insulto isquêmico (ARETZ, 1987). A miocardite secundária a infecção pode ser atribuída a fungos, bactérias, protozoários e vírus (LEONE; PIERONI; RAPEZZI; OLIVOTTO, 2019; LU; SUN; LIU; ZHENG *et al.*, 2015; YOON; VAIL; KLEINMAN; LENTO *et al.*, 2015). A respeito da etiologia bacteriana da miocardite, documenta-se como agentes causadores a brucella, chlamydia, clostridium, corynebacterium diphtheria, francisella tularensis, haemophilus influenzae, gonococcus, legionella spp, meningococcus, mycobacteria, mycoplasma pneumoniae, neisseria meningitis, pneumococcus, salmonella, staphylococcus, streptococcus, tularemia, tetanus, syphilis e vibrio cholera (KINDERMANN; BARTH; MAHFOUD; UKENA *et al.*, 2012; LEONE; PIERONI; RAPEZZI; OLIVOTTO, 2019; MONTERA; MESQUITA; COLAFRANCESCHI; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SAGAR; LIU; COOPER, 2012).

Essa tese de doutorado foi conduzida para examinar se a bactéria *P. gingivalis* poderia causar miocardite e consequente remodelamento cardíaco em ratas saudáveis. Os animais que foram infectados por via venosa evoluíram com congestão pulmonar, disfunção VE sistólica e diastólica, necrose, apoptose, fibrose, aumento do estresse oxidativo e maior infiltrado de macrófagos no miocárdio. Esses achados foram evidentes em ratas sujeitadas a maior carga bacteriana.

A primeira resposta à infecção caracterizou-se pelo aumento na temperatura retal, que foi mensurada no quinto minuto após a inoculação das bactérias. Esse achado era previsível na medida que os pirogênicos derivados das bactérias podem atuar no hipotálamo para aumentar o ponto fixo da temperatura corporal (PRAJITHA; ATHIRA; MOHANAN, 2018).

Atentando para a literatura, não é incomum identificar, ao menos, uma espécie bacteriana oral em amostras de valvas cardíacas e aneurismas de aorta (NAKANO; NEMOTO; NOMURA; INABA *et al.*, 2009; OKUDA; KATO; ISHIHARA, 2004). Dentre os diferentes patógenos bucais, a *P. gingivalis* desperta interesse devido à sua atuação chave em mediar os efeitos da doença periodontal no sistema cardiovasculares (AOYAMA; KOBAYASHI; HANATANI; ASHIGAKI *et al.*, 2019; ARMINGOHAR; JORGENSEN;

KRISTOFFERSEN; ABESHA-BELAY *et al.*, 2014; HAJISHENGALLIS; LAMONT; GRAVES, 2015; HOLMLUND; HEDIN; PUSSINEN; LERNER *et al.*, 2011; KEBSCHULL; DEMMER; PAPAPANOU, 2010; PADILLA; LOBOS; HUBERT; GONZALEZ *et al.*, 2006). De fato, há dados ilustrando associação positiva entre bacteremia sistêmica por *P. gingivalis* e risco de infarto do miocárdio (HOLMLUND; HEDIN; PUSSINEN; LERNER *et al.*, 2011; LYSEK; SZAFRANIEC; POLAK; JANKOWSKI *et al.*, 2018; PUSSINEN; ALFTHAN; TUOMILEHTO; ASIKAINEN *et al.*, 2004). Outros estudos indicam que a *P. gingivalis* também pode intensificar o remodelamento miocárdico em condições de doença cardíaca pré-estabelecida (DELEON-PENNELL; DE CASTRO BRAS; IYER; BRATTON *et al.*, 2014; SATO; SUZUKI; AOYAMA; WATANABE *et al.*, 2017).

Nesse projeto de pesquisa, a proposta consistiu em avaliarmos se a inoculação intravenosa de *P. gingivalis* poderia despertar anormalidades morfofuncionais cardíacas em ratas saudáveis. Essa questão foi pouco explorada na literatura, com registro de somente um estudo (KANEKO; SUZUKI; AOYAMA; WATANABE *et al.*, 2017). Os autores não identificaram diferenças significantes na fração de encurtamento e na massa do VE entre os animais SHAM e inoculados com 10^8 UFC/mL de *P. gingivalis*. Em nossas condições experimentais, ao exame ecocardiográfico, a única modificação documentada compreendeu a redução do TRIV. Embora não existem estudos que investigaram o remodelamento atrial consequente a contaminação por *P. gingivalis*, é possível supor que o átrio esquerdo possa ser afetado pela bacteremia. Essa condição poderia, por exemplo, elevar a pressão no átrio esquerdo, precipitando a abertura da valva mitral (APPLETON; HATLE; POPP, 1988; GRAZIOSI, 1998) e resultar em valores menores do TRIV nos animais submetidos a *P. gingivalis*. A análise da dimensão do átrio esquerdo poderia apoiar essa hipótese, todavia, em nosso delineamento experimental, imagens da cavidade atrial não foram registradas em fita.

A ausência de alterações na morfologia e desempenho sistólico do VE ao ecocardiograma pode ser atribuída a especificidade do método. Achados ecocardiográficos na miocardite são inespecíficos e sua utilização tem valor no diagnóstico diferencial da miocardite com outras patologias (BLAUWET; COOPER, 2010; MONTERA; MESQUITA; COLAFRANCESCHI; OLIVEIRA *et*

al., 2013). Esse inconveniente conduziu à análise das pressões intraventriculares por meio de cateter de pressão Millar, o que confere maior precisão na avaliação do desempenho ventricular. Como caracterizado na Figura 3, ratas do grupo 3×10^8 exibiram maior pressão de enchimento e disfunção sistólica e diastólica do VE.

O teor de água aumentado nos animais inoculados com a maior concentração de bactérias caracterizou a presença de congestão venosa pulmonar no modelo. A primeira condição que fundamenta esse achado provém dos indicadores de desempenho diastólico. Os animais do grupo 3×10^8 exibiram $-dP/dt$ menor e PD_2 maior em comparação com ratas SHAM. É aceito que disfunções diastólicas que cursam com aumento da pressão de enchimento do VE causam transiente do líquido plasmático dos capilares pulmonares para os espaços intersticiais e alvéolos (MIGLIORANZA; PICANO; BADANO; SANT'ANNA *et al.*, 2017; ROSCANI; MATSUBARA; MATSUBARA, 2010). Deve-se mencionar que o grupo 1×10^8 também apresentou valores de PD_2 superiores ao grupo SHAM e que não repercutiu em congestão pulmonar. A explicação mais razoável reside na magnitude de aumento da PD_2 , que não foi muito maior nos animais 1×10^8 ($7,5 \pm 2,5$; mmHg) em comparação ao grupo SHAM ($4,6 \pm 2$; mmHg), mas dobrou nas ratas 3×10^8 ($9,9 \pm 3,1$; mmHg). Não há informações precedentes sobre os valores de PD_2 no modelo de miocardite induzida pela *P. gingivalis*. Todavia, em modelos de insuficiência cardíaca, valores altos de PD_2 são margeados como acima de 12 mmHg (SARAIVA; KANASHIRO-TAKEUCHI; ANTONIO; CAMPOS *et al.*, 2007; TUCCI, 2011). Outro aspecto a se considerar é o fato da *P. gingivalis* induzir lesão pulmonar associada com resposta inflamatória (BENEDYK; MYDEL; DELALEU; PLAZA *et al.*, 2016; CHEN; ZHOU; YI; LI *et al.*, 2018). É possível que o aumento no teor de água também ocorreu em resposta a maior lesão e inflamação pulmonares nos animais submetidos a carga de 3×10^8 em comparação àqueles animais inoculados com concentração menor de *P. gingivalis*.

Em relação as informações de biometria cardíaca, ficou assinalada a inexistência de hipertrofia miocárdica após a inoculação com *P. gingivalis*, o que corrobora achados prévios em camundongos (KANEKO; SUZUKI; AOYAMA; WATANABE *et al.*, 2017) – os autores não encontraram aumento na razão massa cardíaca e peso corporal. Admitindo que aumentos na massa

miocárdica expressem a existência de crescimento celular, é possível assumir posição contrária às observações clínicas que associam doenças periodontais com hipertrofia miocárdica (ANGELI; VERDECCHIA; PELLEGRINO; PELLEGRINO *et al.*, 2003; FRANEK; NAPORA; BLACH; BUDLEWSKI *et al.*, 2010; SHIMAZAKI; SAITO; KIYOHARA; KATO *et al.*, 2004). Evidentemente que essa conclusão é razoável ao assumir a *P. gingivalis* como mediadora dos efeitos cardíacos consequentes a doença periodontal. É válido, ainda, referir que os estudos clínicos que associam periodontite com o aumento anormal da massa miocárdica são assolados por limitações no delineamento experimental e no diagnóstico da hipertrofia VE e da periodontite (SUZUKI; SATO; KANEKO; YOSHIDA *et al.*, 2017).

O método empregado no estudo possibilitou identificar dados que tornam admissível considerar a *P. gingivalis* como indutora de lesão miocárdica. Para tal, nos valem da mensuração da atividade plasmática da CK-MB, enzima que, quando elevada, indica a existência de necrose miocárdica (BLOMBERG; KIMBER; BURKE, 1975; FAN; MA; XIA; SUN *et al.*, 2017). O dano celular foi evidente somente nas ratas inoculadas com o maior teor bacteriano, informação que foi confirmada em cortes histológicos do miocárdio. Utilizando marcação por tricromo de Masson, ficou caracterizado aumento no teor de colágeno, com áreas de intensidade fibrose subendocárdica. Existe artigo na literatura no qual a microestrutura miocárdica também foi examinada após inoculação de *P. gingivalis* em camundongos (AKAMATSU; YAMAMOTO; YAMAMOTO; OSEKO *et al.*, 2011). Empregando desenho experimental congênere ao nosso, os autores analisaram as modificações histológicas no miocárdio, um, três, cinco e quatorze dias após duas inoculações de 2×10^8 UFC/mL de *P. gingivalis*. Verificaram que, a partir de cinco dias, até quatorze dias, houve clara infiltração de células inflamatórias e fibroblastos, achados que possuíam similaridade à histopatologia do infarto do miocárdio. Admitindo a existência de associação entre aumento de colágeno e disfunção diastólica (BURLEW; WEBER, 2002; HESS; RITTER; SCHNEIDER; GRIMM *et al.*, 1984), é possível entender porque a disfunção diastólica do VE foi mais evidente nos animais do grupo 3×10^8 , em que a expressão do colágeno foi significativamente superior ao dos demais grupos experimentais.

Circunstância análoga à necrose miocárdica foi verificada para a morte celular por apoptose, com padrão em escada de fragmentos de DNA evidente em ratas do grupo 3×10^8 . Os primeiros indícios que *P. gingivalis* poderia induzir apoptose de cardiomiócitos provém de experimentos *in vitro*, em que células H9c2 incubadas com meio condicionado de *P. gingivalis* exibiram fragmentação de DNA e condensação nuclear (LEE; CHANG; KUO; YING *et al.*, 2006; LEE; WU; CHANG; CHANG *et al.*, 2006; WU; YEH; KUO; HUANG *et al.*, 2008). A interpretação dos nossos achados de maior apoptose e, sua repercussão no remodelamento cardíaco induzido pela *P. gingivalis*, é de difícil compreensão porque os estudos prévios foram direcionados, em sua maioria, à examinar a apoptose na miocardite infecciosa de origem viral e parasitaria (ALTER; JOBMANN; MEYER; PANKUWEIT *et al.*, 2001; ELLIS; DI SALVO, 2007; SARASTE; AROLA; VUORINEN; KYTO *et al.*, 2003; TOSTES; BERTULUCCI ROCHA-RODRIGUES; DE ARAUJO PEREIRA; RODRIGUES, 2005; YAMADA; MATSUMORI; WANG; OHASHI *et al.*, 1999; YU; REN; ZHANG; QIAO *et al.*, 2017). Nessas condições, há informação suficiente que confere destaque à morte celular programada em mediar a injúria celular e a transição das miocardiopatias do estado hipertrófico para insuficiência cardíaca (ABBATE; SINAGRA; BUSSANI; HOKE *et al.*, 2009; DEBIASI; ROBINSON; SHERRY; BOUCHARD *et al.*, 2004; KYTO; SARASTE; SAUKKO; HENN *et al.*, 2004; LI; LIU; ZHAO; CHEN *et al.*, 2019; YU; LONG; LI; LIANG *et al.*, 2016).

É de se assinalar aspectos inerentes ao método de detecção da apoptose no miocárdio. O DNA fragmentado, caracterizado em gel de agarose com emprego de *SYBR-safe* foi o método de escolha. A marcação com *SYBR-safe* foi preferida àquela que utiliza brometo de etídio por ter mais sensibilidade, menor fluorescência inespecífica de fundo e ser desprovida de potencial cardiogênico. Salienta-se, ainda, o corriqueiro emprego do método na literatura para identificação da apoptose em diferentes tipos celulares (BAHI; ZHANG; LLOVERA; BALLESTER *et al.*, 2006; MARTINEAU; WHYTE; GREER, 2008; OFFER; AMES; BAILEY; SABENS *et al.*, 2007; REICH; PUCKEY; CHEETHAM; HARRIS *et al.*, 2006). A alternativa à técnica de *SYBR-safe* seria o método conhecido como “terminal de desoxinucleotidil transferase dUTP (TUNEL)” (KYRYLKOVA; KYRYACHENKO; LEID; KIOUSSI, 2012; MAJTNEROVA; ROUSAR, 2018). Julgamos a técnica de detecção de

fragmentos de DNA por *SYBR-safe* mais apropriada porque o TUNEL possui limitações, como por exemplo, a rotulação inadequada de células necróticas como apoptóticas (GRASL-KRAUPP; RUTTKAY-NEDECKY; KOUDELKA; BUKOWSKA *et al.*, 1995; OHNO; TAKEMURA; OHNO; MISAO *et al.*, 1998; YAOITA; OGAWA; MAEHARA; MARUYAMA, 2000).

Ainda não existe informação definitiva sobre os mecanismos patofisiológicos determinantes do remodelamento cardíaco induzido pela *P. gingivalis*. Há diversos fatores de virulência da *P. gingivalis* que podem afetar diretamente o miocárdio, com a atuação de LPS da membrana bacteriana assumindo papel de destaque (CURTIS; KURAMITSU; LANTZ; MACRINA *et al.*, 1999; MCDONALD; GRINMAN; CARTHY; WALLEY, 2000). A base para esse fundamento provém de condições experimentais que se valeram do emprego de LPS e ilustraram a presença de necrose, apoptose, fibrose e disfunção ventricular (AUKRUST; GULLESTAD; UELAND; DAMAS *et al.*, 2005; DELEON-PENNELL; IYER; ERO; CATES *et al.*, 2017; GONCALVES; GUARIDO; ASSREUY; DA SILVA-SANTOS, 2014; LORIGADOS; ARIGA; BATISTA; VELASCO *et al.*, 2015; SORIANO; GUIDO; BARBEIRO; CALDINI *et al.*, 2014; XIANCHU; LAN; MING; YANZHI, 2018; ZHANG; QI; WANG; XU *et al.*, 2019).

É bem fundamentado que os efeitos deletérios dos LPS são mediados pelo aumento da inflamação e do estresse oxidativo (BULLON; CORDERO; QUILES; MORILLO *et al.*, 2011; LI; GOU; YU; JI *et al.*, 2019). Assim, é razoável pensar que nossos achados de aumento na lipoperoxidação, na oxidação de proteínas e no teor de macrófagos no miocárdio de ratas inoculadas com *P. gingivalis* derivem, ao menos em parte, da ação dos LPS.

De real importância é o estresse oxidativo e a inflamação que se estabelecem a longo prazo porque podem agir sinergicamente para induzir remodelamento cardíaco via alterações conformacionais em proteínas, ativação de vias de sinalização indutoras de hipertrofia e morte celular, fibrose intersticial, disfunção mitocondrial e isquemia (DHIMAN; GARG, 2011; ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011; NISHIDA; OTSU, 2006; SALOMON; JIROUSEK; GHOSH; SHARMA, 1987; TADA; SUZUKI, 2016; TAYLOR, 2008).. Consequentemente é previsível que esse cenário cooperativo tenha atuado

para despertar remodelamento cardíaco adverso em nossos animais inoculados com *P. gingivalis*.

CONCLUSÃO

Esse estudo ilustra que a *P. gingivalis* pode induzir remodelamento cardíaco análogo à miocardite em ratas. Os efeitos adversos da *P. gingivalis* no miocárdio foram mais evidentes com a intensificação da carga bacteriana. Ratas inoculadas com 3×10^8 UFC/mL evoluíram com disfunção sistólica e diastólica do VE, necrose, apoptose e fibrose miocárdica. Esses achados foram acompanhados de aumento do estresse oxidativo e infiltrado inflamatório de macrófagos no miocárdio.

5. REFERÊNCIAS

- ABBATE, A.; SINAGRA, G.; BUSSANI, R.; HOKE, N. N. *et al.* Apoptosis in patients with acute myocarditis. **Am J Cardiol**, 104, n. 7, p. 995-1000, Oct 1 2009.
- ABREU, M. T.; VORA, P.; FAURE, E.; THOMAS, L. S. *et al.* Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. **J Immunol**, 167, n. 3, p. 1609-1616, Aug 1 2001.
- AKAMATSU, Y.; YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; OSEKO, F. *et al.* Porphyromonas gingivalis induces myocarditis and/or myocardial infarction in mice and IL-17A is involved in pathogenesis of these diseases. **Arch Oral Biol**, 56, n. 11, p. 1290-1298, Nov 2011.
- ALTER, P.; JOBMANN, M.; MEYER, E.; PANKUWEIT, S. *et al.* Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy: does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? An endomyocardial biopsy study. **Cardiovasc Pathol**, 10, n. 5, p. 229-234, Sep-Oct 2001.
- ANGELI, F.; VERDECCHIA, P.; PELLEGRINO, C.; PELLEGRINO, R. G. *et al.* Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. **Hypertension**, 41, n. 3, p. 488-492, Mar 2003.
- AOYAMA, N.; KOBAYASHI, N.; HANATANI, T.; ASHIGAKI, N. *et al.* Periodontal condition in Japanese coronary heart disease patients: A comparison between coronary and non-coronary heart diseases. **J Periodontal Res**, 54, n. 3, p. 259-265, Jun 2019.
- AOYAMA, N.; KURE, K.; MINABE, M.; IZUMI, Y. Increased Heart Failure Prevalence in Patients with a High Antibody Level Against Periodontal Pathogen. **Int Heart J**, 60, n. 5, p. 1142-1146, Sep 27 2019.
- APPLETON, C. P.; HATLE, L. K.; POPP, R. L. Demonstration of restrictive ventricular physiology by Doppler echocardiography. **J Am Coll Cardiol**, 11, n. 4, p. 757-768, Apr 1988.
- ARETZ, H. T. Myocarditis: the Dallas criteria. **Hum Pathol**, 18, n. 6, p. 619-624, Jun 1987.
- ARMINGOHAR, Z.; JORGENSEN, J. J.; KRISTOFFERSEN, A. K.; ABESHA-BELAY, E. *et al.* Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and

aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis. **J Oral Microbiol**, 6, 2014.

ASHIGAKI, N.; SUZUKI, J.; OGAWA, M.; WATANABE, R. *et al.* Periodontal bacteria aggravate experimental autoimmune myocarditis in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 304, n. 5, p. H740-748, Mar 1 2013.

AUKRUST, P.; GULLESTAD, L.; UELAND, T.; DAMAS, J. K. *et al.* Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. **Ann Med**, 37, n. 2, p. 74-85, 2005.

AZEVEDO, P. S.; POLEGATO, B. F.; MINICUCCI, M. F.; PAIVA, S. A. *et al.* Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Arq Bras Cardiol**, 106, n. 1, p. 62-69, Jan 2016.

BAHI, N.; ZHANG, J.; LLOVERA, M.; BALLESTER, M. *et al.* Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. **J Biol Chem**, 281, n. 32, p. 22943-22952, Aug 11 2006.

BAINBRIDGE, B. W.; DARVEAU, R. P. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. **Acta Odontol Scand**, 59, n. 3, p. 131-138, Jun 2001.

BENEDYK, M.; MYDEL, P. M.; DELALEU, N.; PLAZA, K. *et al.* Gingipains: Critical Factors in the Development of Aspiration Pneumonia Caused by Porphyromonas gingivalis. **J Innate Immun**, 8, n. 2, p. 185-198, 2016.

BLAUWET, L. A.; COOPER, L. T. Myocarditis. **Prog Cardiovasc Dis**, 52, n. 4, p. 274-288, Jan-Feb 2010.

BLOMBERG, D. J.; KIMBER, W. D.; BURKE, M. D. Creatine kinase isoenzymes. Predictive value in the early diagnosis of acute myocardial infarction. **Am J Med**, 59, n. 4, p. 464-469, Oct 1975.

BRODALA, N.; MERRICKS, E. P.; BELLINGER, D. A.; DAMRONGSRI, D. *et al.* Porphyromonas gingivalis bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25, n. 7, p. 1446-1451, Jul 2005.

BULLON, P.; CORDERO, M. D.; QUILES, J. L.; MORILLO, J. M. *et al.* Mitochondrial dysfunction promoted by Porphyromonas gingivalis li

popolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. **Free Radic Biol Med**, 50, n. 10, p. 1336-1343, May 15 2011.

BURLEW, B. S.; WEBER, K. T. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. **Herz**, 27, n. 2, p. 92-98, Mar 2002.

CHEN, M. C.; CHEN, C. J.; YANG, C. H.; WU, C. J. *et al.* Interleukin-18: a strong predictor of the extent of coronary artery disease in patients with unstable angina. **Heart Vessels**, 22, n. 6, p. 371-375, Nov 2007.

CHEN, Y.; ZHOU, R.; YI, Z.; LI, Y. *et al.* Porphyromonas gingivalis induced inflammatory responses and promoted apoptosis in lung epithelial cells infected with H1N1 via the Bcl2/Bax/Caspase3 signaling pathway. **Mol Med Rep**, 18, n. 1, p. 97-104, Jul 2018.

CURTIS, M. A.; KURAMITSU, H. K.; LANTZ, M.; MACRINA, F. L. *et al.* Molecular genetics and nomenclature of proteases of Porphyromonas gingivalis. **J Periodontal Res**, 34, n. 8, p. 464-472, Nov 1999.

DE OLIVEIRA, H. A.; ANTONIO, E. L.; ARSA, G.; SANTANA, E. T. *et al.* Photobiomodulation Leads to Reduced Oxidative Stress in Rats Submitted to High-Intensity Resistive Exercise. **Oxid Med Cell Longev**, 2018, p. 5763256, 2018.

DE SOUZA VIEIRA, S.; ANTONIO, E. L.; DE MELO, B. L.; PORTES, L. A. *et al.* Exercise Training Potentiates The Cardioprotective Effects of Stem Cells Post-infarction. **Heart Lung Circ**, 28, n. 2, p. 263-271, Feb 2019.

DEBIASI, R. L.; ROBINSON, B. A.; SHERRY, B.; BOUCHARD, R. *et al.* Caspase inhibition protects against reovirus-induced myocardial injury in vitro and in vivo. **J Virol**, 78, n. 20, p. 11040-11050, Oct 2004.

DELEON-PENNELL, K. Y.; DE CASTRO BRAS, L. E.; IYER, R. P.; BRATTON, D. R. *et al.* P. gingivalis lipopolysaccharide intensifies inflammation post-myocardial infarction through matrix metalloproteinase-9. **J Mol Cell Cardiol**, 76, p. 218-226, Nov 2014.

DELEON-PENNELL, K. Y.; IYER, R. P.; ERO, O. K.; CATES, C. A. *et al.* Periodontal-induced chronic inflammation triggers macrophage secretion of Ccl12 to inhibit fibroblast-mediated cardiac wound healing. **JCI Insight**, 2, n. 18, Sep 21 2017.

DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates Trypanosoma cruzi-induced myocarditis during Chagas disease. **J Pathol**, 225, n. 4, p. 583-

596, Dec 2011.

DOS SANTOS, S. S.; DE OLIVEIRA, H. A.; ANTONIO, E. L.; TEIXEIRA, I. L. A. *et al.* Low-level laser therapy prevents muscle oxidative stress in rats subjected to high-intensity resistance exercise in a dose-dependent manner. **Lasers Med Sci**, Jan 10 2020.

ELLIS, C. R.; DI SALVO, T. Myocarditis: basic and clinical aspects. **Cardiol Rev**, 15, n. 4, p. 170-177, Jul-Aug 2007.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **N Engl J Med**, 364, n. 7, p. 656-665, Feb 17 2011.

FAN, J.; MA, J.; XIA, N.; SUN, L. *et al.* Clinical Value of Combined Detection of CK-MB, MYO, cTnI and Plasma NT-proBNP in Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. **Clin Lab**, 63, n. 3, p. 427-433, Mar 1 2017.

FRANEK, E.; NAPORA, M.; BLACH, A.; BUDLEWSKI, T. *et al.* Blood pressure and left ventricular mass in subjects with type 2 diabetes and gingivitis or chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, 37, n. 10, p. 875-880, Oct 2010.

FRIEDEWALD, V. E.; KORNMAN, K. S.; BECK, J. D.; GENCO, R. *et al.* The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. **Am J Cardiol**, 104, n. 1, p. 59-68, Jul 1 2009.

GAUDILLIERE, D. K.; CULOS, A.; DJEBALI, K.; TSAI, A. S. *et al.* Systemic Immunologic Consequences of Chronic Periodontitis. **J Dent Res**, 98, n. 9, p. 985-993, Aug 2019.

GONCALVES, R. P.; GUARIDO, K. L.; ASSREUY, J.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Gender-specific differences in the in situ cardiac function of endotoxemic rats detected by pressure-volume catheter. **Shock**, 42, n. 5, p. 415-423, Nov 2014.

GRANDINETTI, V.; CARLOS, F. P.; ANTONIO, E. L.; DE OLIVEIRA, H. A. *et al.* Photobiomodulation therapy combined with carvedilol attenuates post-infarction heart failure by suppressing excessive inflammation and oxidative stress in rats. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 9425, Jul 1 2019.

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K. *et al.* In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. **Hepatology**, 21, n. 5, p. 1465-1468, May 1995.

GRAZIOSI, P. Análise ecocardiográfica da função diastólica do ventrículo

esquerdo na hipertensão arterial. **HiperAtivo** 5, n. 2, p. 14, 1998.

GUTIERREZ-VENEGAS, G.; TORRAS-CEBALLOS, A.; GOMEZ-MORA, J. A.; FERNANDEZ-ROJAS, B. Luteolin, quercetin, genistein and quercetagenin inhibit the effects of lipopolysaccharide obtained from *Porphyromonas gingivalis* in H9c2 cardiomyoblasts. **Cell Mol Biol Lett**, 22, p. 19, 2017.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J.; GRAVES, D. T. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. **Virulence**, 6, n. 3, p. 229-235, 2015.

HESS, O. M.; RITTER, M.; SCHNEIDER, J.; GRIMM, J. *et al.* Diastolic stiffness and myocardial structure in aortic valve disease before and after valve replacement. **Circulation**, 69, n. 5, p. 855-865, May 1984.

HOLMLUND, A.; HEDIN, M.; PUSSINEN, P. J.; LERNER, U. H. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* (Pg) a possible link between impaired oral health and acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**, 148, n. 2, p. 148-153, Apr 14 2011.

KANEKO, M.; SUZUKI, J. I.; AOYAMA, N.; WATANABE, R. *et al.* Toll-like receptor-2 has a critical role in periodontal pathogen-induced myocardial fibrosis in the pressure-overloaded murine hearts. **Hypertens Res**, 40, n. 2, p. 110-116, Feb 2017.

KEBSCHULL, M.; DEMMER, R. T.; PAPAPANOU, P. N. "Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. **J Dent Res**, 89, n. 9, p. 879-902, Sep 2010.

KINANE, D. F.; RIGGIO, M. P.; WALKER, K. F.; MACKENZIE, D. *et al.* Bacteraemia following periodontal procedures. **J Clin Periodontol**, 32, n. 7, p. 708-713, Jul 2005.

KINDERMANN, I.; BARTH, C.; MAHFOUD, F.; UKENA, C. *et al.* Update on myocarditis. **J Am Coll Cardiol**, 59, n. 9, p. 779-792, Feb 28 2012.

KYRYLKOVA, K.; KYRYACHENKO, S.; LEID, M.; KIOUSSI, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. **Methods Mol Biol**, 887, p. 41-47, 2012.

KYTO, V.; SARASTE, A.; SAUKKO, P.; HENN, V. *et al.* Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis. **Am J Cardiol**, 94, n. 6, p. 746-750, Sep 15 2004.

LEE, S. D.; CHANG, S. H.; KUO, W. H.; YING, T. H. *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase kinase in *Porphyromonas gingivalis*-induced myocardial cell hypertrophy and apoptosis. **Eur J Oral Sci**, 114, n. 2, p. 154-159, Apr 2006.

LEE, S. D.; KUO, W. W.; LIN, D. Y.; CHEN, T. H. *et al.* Role of calcineurin in Porphyromonas gingivalis-induced myocardial cell hypertrophy and apoptosis. **J Biomed Sci**, 13, n. 2, p. 251-260, Mar 2006.

LEE, S. D.; WU, C. C.; CHANG, Y. C.; CHANG, S. H. *et al.* Porphyromonas gingivalis-induced cellular hypertrophy and MMP-9 activity via different signaling pathways in H9c2 cardiomyoblast cells. **J Periodontol**, 77, n. 4, p. 684-691, Apr 2006.

LEONE, O.; PIERONI, M.; RAPEZZI, C.; OLIVOTTO, I. The spectrum of myocarditis: from pathology to the clinics. **Virchows Arch**, 475, n. 3, p. 279-301, Sep 2019.

LEVY, R. F.; SERRA, A. J.; ANTONIO, E. L.; DOS SANTOS, L. *et al.* Cardiac morphofunctional characteristics of transgenic rats with overexpression of the bradykinin B1 receptor in the endothelium. **Physiol Res**, 66, n. 6, p. 925-932, Dec 20 2017.

LI, L.; MESSAS, E.; BATISTA, E. L., Jr.; LEVINE, R. A. *et al.* Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. **Circulation**, 105, n. 7, p. 861-867, Feb 19 2002.

LI, M.; GOU, Y.; YU, H.; JI, T. *et al.* Mechanism of Metformin on LPS-Induced Bacterial Myocarditis. **Dose Response**, 17, n. 2, p. 1559325819847409, Apr-Jun 2019.

LI, W.; LIU, M.; ZHAO, C.; CHEN, C. *et al.* MiR-1/133 attenuates cardiomyocyte apoptosis and electrical remodeling in mice with viral myocarditis. **Cardiol J**, Apr 17 2019.

LOCKHART, P. B.; BOLGER, A. F.; PAPAPANOU, P. N.; OSINBOWALE, O. *et al.* Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, 125, n. 20, p. 2520-2544, May 22 2012.

LORIGADOS, C. B.; ARIGA, S. K.; BATISTA, T. R.; VELASCO, I. T. *et al.* Endotoxaemic myocardial dysfunction: the role of coronary driving pressure in subendocardial perfusion. **Crit Care Resusc**, 17, n. 1, p. 12-22, Mar 2015.

LU, L.; SUN, R.; LIU, M.; ZHENG, Y. *et al.* The Inflammatory Heart Diseases: Causes, Symptoms, and Treatments. **Cell Biochem Biophys**, 72, n. 3, p. 851-855, Jul 2015.

LYSEK, R. P.; SZAFRANIEC, K.; POLAK, M.; JANKOWSKI, P. *et al.* Relationship between past myocardial infarction, periodontal disease and Porphyromonas gingivalis serum antibodies: A case-control study. **Cardiol J**, 25, n. 3, p. 386-392, 2018.

MAJTNEROVA, P.; ROUSAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Mol Biol Rep**, 45, n. 5, p. 1469-1478, Oct 2018.

MANCHINI, M. T.; ANTONIO, E. L.; SILVA JUNIOR, J. A.; DE CARVALHO, P. T. *et al.* Low-Level Laser Application in the Early Myocardial Infarction Stage Has No Beneficial Role in Heart Failure. **Front Physiol**, 8, p. 23, 2017.

MARTINEAU, C.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. Development of a SYBR safe technique for the sensitive detection of DNA in cesium chloride density gradients for stable isotope probing assays. **J Microbiol Methods**, 73, n. 2, p. 199-202, May 2008.

MCDONALD, T. E.; GRINMAN, M. N.; CARTHY, C. M.; WALLEY, K. R. Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 279, n. 5, p. H2053-2061, Nov 2000.

MIGLIORANZA, M. H.; PICANO, E.; BADANO, L. P.; SANT'ANNA, R. *et al.* Pulmonary congestion evaluated by lung ultrasound predicts decompensation in heart failure outpatients. **Int J Cardiol**, 240, p. 271-278, Aug 1 2017.

MONTERA, M. W.; MESQUITA, E. T.; COLAFRANCESCHI, A. S.; OLIVEIRA, A. C., Jr. *et al.* I Brazilian guidelines on myocarditis and pericarditis. **Arq Bras Cardiol**, 100, n. 4 Suppl 1, p. 1-36, 2013.

MULLER-WERDAN, U.; SCHUMANN, H.; LOPPNOW, H.; FUCHS, R. *et al.* Endotoxin and tumor necrosis factor alpha exert a similar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. **J Mol Cell Cardiol**, 30, n. 5, p. 1027-1036, May 1998.

MURPHY, A. M.; DALY, C. G.; MITCHELL, D. H.; STEWART, D. *et al.* Chewing fails to induce oral bacteraemia in patients with periodontal disease. **J Clin Periodontol**, 33, n. 10, p. 730-736, Oct 2006.

MUSTAPHA, I. Z.; DEBREY, S.; OLADUBU, M.; UGARTE, R. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, 78, n. 12, p. 2289-2302, Dec 2007.

MYERS, K. J.; MURTHY, S.; FLANIGAN, A.; WITCHELL, D. R. *et al.* Antisense

oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor-alpha in two murine models of colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, 304, n. 1, p. 411-424, Jan 2003.

NAKANO, K.; NEMOTO, H.; NOMURA, R.; INABA, H. *et al.* Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. **Oral Microbiol Immunol**, 24, n. 1, p. 64-68, Feb 2009.

NAKAYAMA, K. Porphyromonas gingivalis cell-induced hemagglutination and platelet aggregation. **Periodontol 2000**, 54, n. 1, p. 45-52, Oct 2010.

NISHIDA, K.; OTSU, K. The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in cardiomyocyte apoptosis. **Antioxid Redox Signal**, 8, n. 9-10, p. 1729-1736, Sep-Oct 2006.

O'BRIEN-SIMPSON, N. M.; VEITH, P. D.; DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Antigens of bacteria associated with periodontitis. **Periodontol 2000**, 35, p. 101-134, 2004.

OFFER, T.; AMES, B. N.; BAILEY, S. W.; SABENS, E. A. *et al.* 5-Methyltetrahydrofolate inhibits photosensitization reactions and strand breaks in DNA. **FASEB J**, 21, n. 9, p. 2101-2107, Jul 2007.

OHNO, M.; TAKEMURA, G.; OHNO, A.; MISAO, J. *et al.* "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. **Circulation**, 98, n. 14, p. 1422-1430, Oct 6 1998.

OKUDA, K.; KATO, T.; ISHIHARA, K. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. **Oral Dis**, 10, n. 1, p. 5-12, Jan 2004.

PADILLA, C.; LOBOS, O.; HUBERT, E.; GONZALEZ, C. *et al.* Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, 41, n. 4, p. 350-353, Aug 2006.

PETERSEN, P. E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S. *et al.* The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ**, 83, n. 9, p. 661-669, Sep 2005.

PICOLLO, C. T.; SANTOS, A. A. D.; ANTONIO, E. L.; SILVA, J. M. A. *et al.* Digitoxin Attenuates Heart Failure, Reduces Myocardial Hypertrophy, and Preserves the Calcium-Binding Proteins in Infarcted Rats. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, p. 1074248419887708, Nov 12 2019.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, 366, n. 9499, p. 1809-1820, Nov 19 2005.

POVEDA-RODA, R.; JIMENEZ, Y.; CARBONELL, E.; GAVALDA, C. *et al.* Bacteremia originating in the oral cavity. A review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 13, n. 6, p. E355-362, Jun 1 2008.

PRAJITHA, N.; ATHIRA, S. S.; MOHANAN, P. V. Pyrogens, a polypeptide produces fever by metabolic changes in hypothalamus: Mechanisms and detections. **Immunol Lett**, 204, p. 38-46, Dec 2018.

PUSSINEN, P. J.; ALFTHAN, G.; TUOMILEHTO, J.; ASIKAINEN, S. *et al.* High serum antibody levels to Porphyromonas gingivalis predict myocardial infarction. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, 11, n. 5, p. 408-411, Oct 2004.

REICH, S.; PUCKEY, L. H.; CHEETHAM, C. L.; HARRIS, R. *et al.* Combinatorial Domain Hunting: An effective approach for the identification of soluble protein domains adaptable to high-throughput applications. **Protein Sci**, 15, n. 10, p. 2356-2365, Oct 2006.

ROSCANI, M. G.; MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B. Heart failure with normal ejection fraction. **Arq Bras Cardiol**, 94, n. 5, p. 652-660, 694-702, May 2010.

SAGAR, S.; LIU, P. P.; COOPER, L. T., Jr. Myocarditis. **Lancet**, 379, n. 9817, p. 738-747, Feb 25 2012.

SALOMON, R. G.; JIROUSEK, M. R.; GHOSH, S.; SHARMA, R. B. Prostaglandin endoperoxides 21. Covalent binding of levuglandin E2 with proteins. **Prostaglandins**, 34, n. 5, p. 643-656, Nov 1987.

SARAIVA, R. M.; KANASHIRO-TAKEUCHI, R. M.; ANTONIO, E. L.; CAMPOS, O. *et al.* Rats with high left ventricular end-diastolic pressure can be identified by Doppler echocardiography one week after myocardial infarction. **Braz J Med Biol Res**, 40, n. 11, p. 1557-1565, Nov 2007.

SARASTE, A.; AROLA, A.; VUORINEN, T.; KYTO, V. *et al.* Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. **Cardiovasc Pathol**, 12, n. 5, p. 255-262, Sep-Oct 2003.

SATO, H.; SUZUKI, J. I.; AOYAMA, N.; WATANABE, R. *et al.* A Periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis deteriorates Isoproterenol-Induced myocardial remodeling in mice. **Hypertens Res**, 40, n. 1, p. 35-40, Jan 2017.

SATO, S.; SOLANAS, G.; PEIXOTO, F. O.; BEE, L. *et al.* Circadian Reprogramming in the Liver Identifies Metabolic Pathways of Aging. **Cell**, 170, n. 4, p. 664-677 e611, Aug 10 2017.

SEKINISHI, A.; SUZUKI, J.; AOYAMA, N.; OGAWA, M. *et al.* Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* deteriorates pressure overload-induced myocardial hypertrophy in mice. **Int Heart J**, 53, n. 5, p. 324-330, 2012.

SENTILHES, C.; MICHAUD, J.; MIDA, P. [Infectious foci of dental origin. Presentation of a diagnostic form]. **Rev Odontostomatol (Paris)**, 18, n. 1, p. 63-67, Jan-Feb 1989.

SERRA, A. J.; SANTOS, M. H.; BOCALINI, D. S.; ANTONIO, E. L. *et al.* Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. **J Physiol**, 588, n. Pt 13, p. 2431-2442, Jul 1 2010.

SHARMA, A.; NOVAK, E. K.; SOJAR, H. T.; SWANK, R. T. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. **Oral Microbiol Immunol**, 15, n. 6, p. 393-396, Dec 2000.

SHIMAZAKI, Y.; SAITO, T.; KIYOHARA, Y.; KATO, I. *et al.* Relationship between electrocardiographic abnormalities and periodontal disease: the Hisayama Study. **J Periodontol**, 75, n. 6, p. 791-797, Jun 2004.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, 25, n. 2, p. 134-144, Feb 1998.

SORIANO, F. G.; GUIDO, M. C.; BARBEIRO, H. V.; CALDINI, E. G. *et al.* Endotoxemic myocardial dysfunction: subendocardial collagen deposition related to coronary driving pressure. **Shock**, 42, n. 5, p. 472-479, Nov 2014.

SUZUKI, J. I.; SATO, H.; KANEKO, M.; YOSHIDA, A. *et al.* Periodontitis and myocardial hypertrophy. **Hypertens Res**, 40, n. 4, p. 324-328, Apr 2017.

TADA, Y.; SUZUKI, J. Oxidative stress and myocarditis. **Curr Pharm Des**, 22, n. 4, p. 450-471, 2016.

TAYLOR, C. T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. **J Physiol**, 586, n. 17, p. 4055-4059, Sep 1 2008.

TOMAS, I.; ALVAREZ, M.; LIMERES, J.; POTEL, C. *et al.* Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. **Oral Dis**, 13, n. 1, p. 56-62, Jan 2007.

TOMAS, I.; DIZ, P.; TOBIAS, A.; SCULLY, C. *et al.* Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. **J Clin Periodontol**, 39, n. 3, p. 213-228, Mar 2012.

TORRUNGRUANG, K.; JITPAKDEEBORDIN, S.; CHARATKULANGKUN, O.; GLEEBBUA, Y. Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Treponema denticola / Prevotella intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. **PLoS One**, 10, n. 8, p. e0136646, 2015.

TOSTES, S., Jr.; BERTULUCCI ROCHA-RODRIGUES, D.; DE ARAUJO PEREIRA, G.; RODRIGUES, V., Jr. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. **Int J Cardiol**, 99, n. 2, p. 233-237, Mar 18 2005.

TUCCI, C. P. A. J. S. R. F. L. E. L. A. L. d. S. P. J. F. Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine mixture persist even after the anesthetic stage in rats. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, 64, n. 4, p. 5, 2012.

TUCCI, P. J. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats. **Arq Bras Cardiol**, 96, n. 5, p. 420-424, May 2011.

WU, H. C.; YEH, Y. L.; KUO, W. W.; HUANG, S. K. *et al.* P38 mitogen-activated protein kinase pathways are involved in the hypertrophy and apoptosis of cardiomyocytes induced by Porphyromonas gingivalis conditioned medium. **Cell Biochem Funct**, 26, n. 2, p. 246-255, Mar-Apr 2008.

XIANCHU, L.; LAN, Z.; MING, L.; YANZHI, M. Protective effects of rutin on lipopolysaccharide-induced heart injury in mice. **J Toxicol Sci**, 43, n. 5, p. 329-337, 2018.

YAMADA, T.; MATSUMORI, A.; WANG, W. Z.; OHASHI, N. *et al.* Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. **Heart Vessels**, 14, n. 1, p. 29-37, 1999.

YAOITA, H.; OGAWA, K.; MAEHARA, K.; MARUYAMA, Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, 45, n. 3, p. 630-641, Feb 2000.

YOON, E. C.; VAIL, E.; KLEINMAN, G.; LENTO, P. A. *et al.* Lyme disease: a case report of a 17-year-old male with fatal Lyme carditis. **Cardiovasc Pathol**, 24, n. 5, p. 317-321, Sep-Oct 2015.

YU, K.; REN, Y.; ZHANG, X.; QIAO, T. *et al.* shRNA-mediated NP knockdown inhibits the apoptosis of cardiomyocytes induced by H1N1pdm2009 influenza

virus. **Mol Med Rep**, 16, n. 2, p. 1376-1382, Aug 2017.

YU, M.; LONG, Q.; LI, H. H.; LIANG, W. *et al.* IL-9 Inhibits Viral Replication in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. **Front Immunol**, 7, p. 409, 2016.

ZHANG, S.; QI, W.; WANG, F.; XU, Y. *et al.* [Effects of carbon monoxide release molecule-2 on sepsis-induced myocardial dysfunction in rats]. **Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue**, 31, n. 9, p. 1097-1101, Sep 2019.

ANEXO

Certificado de aprovação do conselho de ética Unifesp



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

em ratos^W, protocolada sob o CEUA nº 4396121018 (ID 008259), sob a responsabilidade de **Daniele Fernanda Peron** e equipe; filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da

utilizing 90 isogenic rats (90 females), protocol number CEUA 4396121018 (ID 008259), under the responsibility of **Daniele Fernanda Peron and team; Andrey Jorge Serra; Alexandre Bergamo Moraes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 03/13/2019.

Origem: [Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME](#)

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Publicação relacionada ao tema da tese



Photodynamic antimicrobial chemotherapy has an overt killing effect on periodontal pathogens? A systematic review of experimental studies

Daniels Peron¹ • Alexandre Bergamo¹ • Renato Prates¹ • Stella Sousa Vieira¹ • Paulo de Tarso Camilla de Carvalho¹ • Andrey Jorge Serra^{1*} @

Received 12 December 2018 / Accepted: 10 May 2019
Springer-Verlag London Ltd, part of Springer Nature 2019

The periodontal disease (PO) etiology is primarily related with several bacterial strains, such as *Porphyromonas gingivalis* (Fig. 1). Nonsurgical root scaling (e.g. antibiotics) may achieve a temporary decrease in the Fig. 1 level, yet it cannot eradicate the microorganism. Moreover, antibiotics can lead to bacterial resistance and undesirable side effects. This systematic review was performed to identify animal data defining antimicrobial photodynamic therapy (PACT) role on experimental PO models in the treatment of *P. gingivalis*. Embase, MEDLINE, and PubMed were examined for studies published from January 1980 to August 2018. MeSH terms and Scopus data were used to find more related keywords. Four studies were selected and reviewed by two independent researchers with a structured tool for rating the methodological quality. The beneficial effect of PACT included reductions in Fig. 1 counts, bleeding on probing, redness, and inflammation on multiple sites (i.e., facial molars, dental implants; subgingival; and mandibular premolars). Although our results suggest that PACT displays antimicrobial action on *P. gingivalis*, thus improving the PO, a uniformity in the PACT protocol and the limited number of studies included lead to consider that the bactericidal efficacy of PACT against periodontal pathogens in PO remains unclear.

Keywords *Porphyromonas gingivalis* • *P. gingivalis* • Photodynamic therapy • Antimicrobial photodynamic therapy • Phototherapy • Photo-motomeddisinfection • Antimicrobial photodynamic chemotherapy

Introduction

Dental biofilm is a main etiological factor for periodontal disease (PO) [1], and it develops over a period of several weeks, initially developing supragingival, with a mature subgingival biofilm that establishes up to 12 weeks [2]. As the biofilm accumulates, there is colonization of several periodontal bacteria (e.g., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Nasobacterium* sp.; *Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella* sp.; *Treponema denticola*, a strict anaerobic bacterium) [3–5]. The bacterial biofilm leads to a wide range of inflammatory responses, including the

activation of leukocytes, neutrophils, and T lymphocytes and the release of antibodies, lipopolysaccharides, and chemical inflammatory mediators that include cytokines and chemokines [6–9]. Chronic periodontitis produces tissue signs such as periodontal pockets, periodontal attachment loss, bleeding, bone loss, resulting ultimately in tooth loss [9–13].

Nonsurgical root scaling may achieve a temporary decrease in the subgingival bacteria levels, yet it cannot eradicate the microorganism. The isolation of these bacteria in unreachable areas, such as furcations or the base of periodontal pockets, probably accounts for the failure of mechanical therapy [4]. Therefore, combination of treatments such as non-invasive periodontal surgery; antibiotics, and good oral hygiene are means to control the bacteria [14]. Conversely, it has been reported that antibiotics can lead to bacterial resistance and undesirable side effects [14, 15]. These limitations have led to the search for new approaches that are effective and easily applied in the treatment of PO. In this regard, photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), which uses a low-level

Andrey Jorge Serra
andreysera@gmail.com

* Programs de Pós-graduação em Biofísica Aplicada e Cramias da Saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brazil
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

light (laser), was introduced as a promising strategy antimicrobial platform to adjunct treat PD. PACT has been a scientific demonstrated effect against microorganism since Raab has published it in 1900; iodine would die following irradiation in combination with acridine dye [16]. The PACT reduces microbes with little effect on keratinocytes, thereby constituting a safe alternative for antimicrobial treatment [17]. The surface of both Gram-positive and Gram-negative bacteria is negatively charged, which makes anionic photosensitizers ineffective [1]. PACT is based on the use of light at a specific wavelength in combination with a photosensitizer (PS); it leads to phototoxic reactions to induce bacterial destruction in a reaction called photodynamic effect. The PACT requires two components (a light source and a photosensitizer photo reactive drug) capable of binding to the targeted cell. The photosensitizer becomes activated by light at a certain wavelength, thereby producing singlet oxygen as well as other reactive agents which are toxic to bacteria [18, 19]. PACT begins when a PS absorbs a resonant photon (visible light or near-infrared) and it may impact the electron orbital by a given energy to PS molecule, which goes to singlet excited form. At this point, PS tends to decay, and it has two ways (i) emitting light by fluorescence or (ii) making an intersystem crossing to a triplet state. The triplet state of PS has a long-time life and it has the opportunity to transfer energy to oxygen on substrate. The PS receives the PS's energy and it becomes toxic to every cell especially to those that have less enzymatic content against reactive oxygen species (ROS). One single molecule of PS may go to this route about 10,000 times until it is destroyed [17]. Mechanism of PACT is showed in Fig. 1.

Although several researchers have found a PACT effect alone or in combination with alternative therapies to reduce bacterial infection [20, 21], there are studies showing null results [22, 23] and even a higher bacterial load [24]. Therefore, the aim of the present study was to systematically review the bactericidal efficacy of PACT in experimental PD models. In this primer, we focus on the PACT action in *P. gingivans* because it is commonly found in PD [4, 13, 14] and accounts for the majority of periodontal tissue damage [25]. Moreover, to our knowledge, there are not many systematic reviews aimed at the antimicrobial PACT against *P. gingivalis*, in which there is data illustrating a positive [26] or negative [27] efficacy.

Materials and methods

Search strategy

The search scheme was carried out in accordance with the Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) guidelines for systematic review. Original research articles published in English on Embase, MEDLINE, and PubMed, from January 1960 to August 2016, were retrieved and evaluated by two independent authors.

The keywords from related articles were selected, and MeSH terms and Scopus interventional data lines were used to find more related keywords with close meanings. The entire search strategy used was (*Porphyrinomonas gingivalis* OR *P. gingivans*) AND (photodynamic therapy OR photodynamic OR phototherapy OR photochemotherapy OR photo-

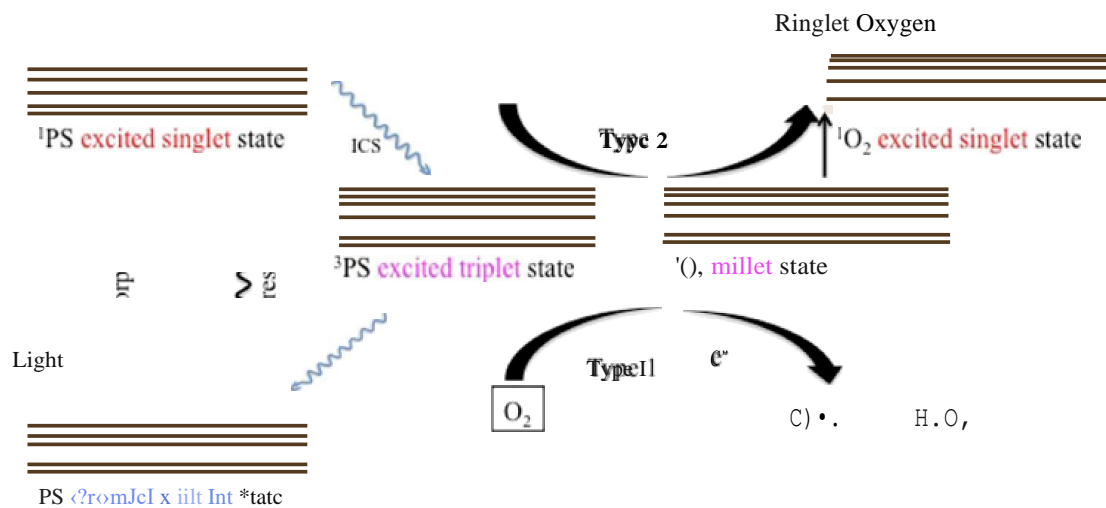


Fig. 1 Jablonski diagram showing the excitation of a photosensitizer molecule for generation of singlet oxygen, superoxide anion (O₂^{•-}), hydroxyl radical (•OH), and hydrogen peroxide (H₂O₂)

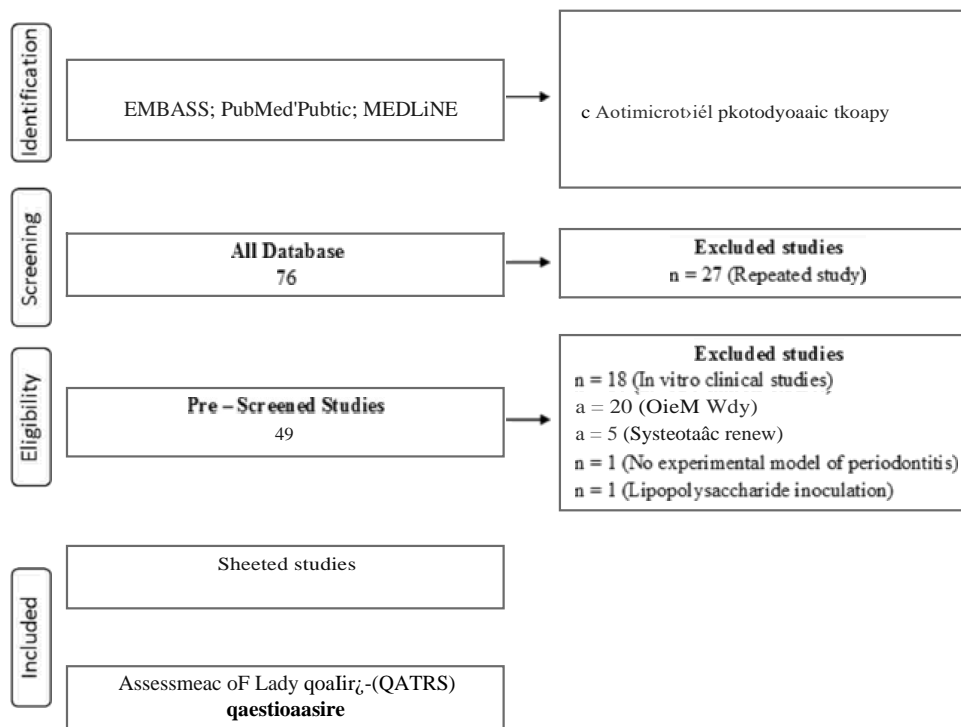


Fig. 1. PRISMA flow diagram of the study selection process.

1 week after a single application of PACT. However after 4 weeks, the authors reported a regrowth of microorganism. A reasonable explanation for this finding is the frequency of the PACT application, in which there are indications that PACT may not be performed weekly [31].

Multiple factors for the bactericidal effect of PACT are proposed. These include DNA breakdown, efflux of potassium ion, abnormalities of sarcolemmal proteins, and interruptions in the cell wall synthesis [26]. Typically the light absorption by the photosensitizer results in excited singlet state and triplet excited state to cause type I and type photo-oxidative reactions. The presence of a mixture of redox and reactive oxygen species, and if sufficient oxidative damage ensues, this will result in target-bacterial death [32–38].

Photosensitizers and light protocol

It is noteworthy that the included studies had substantial heterogeneity in the parameters related to PACT. For example, each study has applied different photosensitizers or different laser irradiation fluences to cause decontamination. Azotene, toluidine blue, chlorophyll E6, BLC 1010, and phenothiazine derivative of methylene blue or toluidine blue are photosensitizers that were included. This criterion was selected because these dyes are the most used for oral PACT [36]. Moreover, methylene

blue and toluidine blue present high effectiveness in both Gram-positive and Gram-negative bacteria [37].

All included studies demonstrated that the combination of dyes and a light source PACT led to lower bacterial proliferation compared with samples of control animals (not treated with PACT). It has been reported that the effectiveness of PACT is greater to control or eliminate oral bacteria in plantar biofilms in biofilms [38]. The probable reasons for the lower effectiveness of PACT in biotopes may be the distinct and protected phenotypes, such as those of dental plaque microorganisms, which are able to adhere to the teeth [39].

The therapeutic light corresponds to a small share of the total electromagnetic radiation with wavelengths from visible to infrared from 300 to 1100 nm [40]. All included studies have applied irradiances with a wavelength of 650 to 652 nm combined with the dye. This wavelength range has been well-reported to be within a suitable "phototherapeutic window" to excite the photosensitizer to produce radicals and/or reactive oxygen species [41]. Further, although a relationship between irradiance and the bactericidal efficacy of PM remains to be established, we have reported very low irradiance values for the four included studies, in which it can limit the clinical translation of the findings. In fact, clinical studies that showed a significant reduction in gingivitis index and a higher range of irradiance [26].

Table 1 Bacterial infection protocols

References	Species	Periodontal procedure	Site	Bacterial load	Bacteria target	Bacterial identification	PCR
[3]	Wistar rat	Ligature	Maxillary	None	<i>A. Actinomyces mucans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i>	PCR	8
[29]	Latrado dog	Ligature induced peri-implantitis	Maxillary	None	<i>P. gingivalis</i> , <i>Prevotella</i> sp	CFU	4
[30]	Beagle dog	None	Subgingival	NR	<i>Fusobacterium</i> sp, <i>Streptococcus beta-hemolyticus</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	PCR	5
[31]	Mongrel dog	Ligature	Mandibular	None	<i>P. gingivalis</i> , <i>Actinomyces mucans</i>	DNase	8

CFU, colony forming units; PCR, polymerase chain reaction; NR, not required

Limitations

There are some limitations that can be raised from our review. First, it is evident from the previous discussion that the differences in laser licence and irradiance and types of photosensitizer would have resulted in a nonstandardized overall dose of PALL in the included studies. Then, studies with standardized inclusion criteria and treatment regimens are recommended in this regard. Moreover, the variance of PALL patterns and the absence of all irradiation data make the comparison between studies complex. Second, the small number of studies included in this systematic review is insufficient to perform a meta-analysis, which could better illustrate the PALL efficacy relevant to clinical observations. Third, there are heterogeneity between the four included studies such as the use of the two animal species (i.e., rat and dog) and three distinct procedures to induce PD (i.e., ligature, peri-implant, or bacterial injection). These observations have important implications to evaluate PALL role, for example, the rate of PD in dogs is high, increases with aging, and hence, the etiopathology is closely associated with humans [42]. Moreover, the occurrence of PD in rats is less frequent than in humans and there is continuous growth and migration of the teeth [43], which might not be subtle for studying the repercussion of the PALL over long periods. In addition, variability in host response to bacterial infection among dog and rat can contribute significantly to the severity of PD and thus, the effect of the PALL. Finally, ligatures or seeding with exogenous pathogens (bacterial inoculation) to induce PD can elicit different disease evolution [44] and therefore a non-singular response to PACT treatment.

Conclusion

Although PART is a promising strategy to eradicate pathogenic microorganisms such as *P. gingivalis*, and this systematic review has shown some benefit concerning the effectiveness of therapy, some limitations show and should be considered so to assume a well-defined bactericidal efficacy of PART against periodontal pathogens in PD. A valuable route could be to establish a well-standardized PALL to be applied homogeneously in future experimental studies. This could result in less heterogeneous data for antimicrobial effectiveness. Notwithstanding, trans-negative bacteria as *P. gingivalis* are far more resistant to PART [43]. The reference search for new approaches (e.g., polymyxin B nonapeptide or ethylene diamine tetraacetic acid) that can permeabilize the outer membrane to allow non-cationic photosensitizer [43] could have better antibacterial results compared with data reported in this review.

Bacterium	aPDT device	Power (mW)	Fluence (J/cm ²)	Spot size (cm ²)	Irradiation time (s)	Target irradiation	Photosensitizer	Result
	Diode	30 mW	W/cm ²	0.028 [§]	Two sites (30 s per site)	Two sites (mesial and distal alveolar wall)	Tohidine blue (100 µg/ml)	↓ <i>P. gingivalis</i> ↓ <i>A. actinomycetemcomitans</i>
	Diode	40 mW	NR	NR	180	Implant surface		↓ <i>P. gingivalis</i> ↓ <i>P. prevotellasp</i> ↓ <i>Fusobacterium -</i> ↓ <i>Streptococcus beta-hemolytic</i>
[30]	Diode	12.7		0.04 (effective area: 0.13 cm ²)	20 s per tooth	Gingival crevice and supragingival	Chlorin 6 and BLC 1010 (10 µM)	↓ Bleeding on probing ↓ Redness ↓ Inflammation ↓ <i>P. gingivalis</i> * ↓ <i>Fusobacterium nucleatum</i> *
	Diode	NR	W/cm ²	0.06	Six sites 10 per site	Mandibular premolars	Phenothiazine chloride	↓ <i>P. gingivalis</i> (1 week) ↑ <i>P. gingivalis</i> (4 weeks) ↓ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ↓ Inflammation

NR: Not reported; ↑, ↓, ↑: increase;

aPDT: application of BLC 1010 and Chlorin 6

* Effect with application of BLC 1010

§ Parameters were calculated based on data of original included studies

scnoaleaptano be aze gnteEul to the National Cowil for 3cintific and Tedizologiczl Develo/xnmt— CNT'g'gzantzo. 305527/2017-7d. The study a'as supported in part by São Paulo Research Foundation — FAT'ESP {gmtnt zo. 201&0d865*7}. Jhe Smiting hadzo zoleizi the study Figrr data colleaiu azid analysis, decision to publish, orgzegamtion of the man lpl. The authors aze gnteheil to Gisele Dalbm for gzoFwiozi ally editing thispay

Find Ing Info ination This work: was fuaded ia part by the Brazilian National Council for Scientific and Technofog ical Developmmit — CN Fry (grant 305,52 7/2017*7 j md Coordination for the Improvement of High Edmation Pnsonrel — CAPES (grant 178,2P*3j).

Compliance with ethial standard

GoFRki cW LFDmeM WeaudhondedBuedh8teyhaveno conMitof interest.

Bfocal a Jul Not app léabls

DbdaiW Jhe conturr is solely the zes crsibility of the authors azid dces not wessazily zejxesezit the official viea's of the Sending

References

- Oruba Z, Labuz P, Macyk W, Chomyszyn •Gaje'sha M (2015) Antimicrobial photodynamic thaa « discrt'ezj/ originating barn the gze•antibiotic em in a novel periodontal thea . Photodiagzi Photodyn Ther 12:612—618. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt&15.10.007>
- Lnvegrove IM (2td4) Omtal plujue revisited: bacteria asciated with ;micdorrtal dix. J N Z. Sec Periodonto 187:7—21
- Theodoro EH, Pires JR, Fernandes LA, Guaibnm Jña ior EC, Lorigo M, de Almeida IM, Garcia VG (2015 j Effect of aritimérobial plmtcdyriamic thnapy on periodortaii infected tcoth self:ets ia rats. Lasers Med Sci 30ñ77—683. <https://doi.org/10.1007/s1003•013•1400•8>
- Carvalho C, Cabrai CI (2m 7j Role of Porphyrinros g irig imlis ia periodontal disease Rev Port Estomato Cir Maxifom 48:167—17 1. [https://doi.org/10.1016/S1646•2890\(07\)70136•X](https://doi.org/10.1016/S1646•2890(07)70136•X)
- Papepsnou FN2002) PopWshñeudlnofmirobiE•robgy in periodontal health and disease. Ann Periodontol 7:54—61. <https://doi.org/10.1902/aima1sJO02.7.1.54>
- Grays DT, Ccchraa D (2003j The contribution of iaterieul: ia•1 and tumor necrosis factor to pert odontal tissue e destruction. J Pericdonto 1 74:391—401. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>
- Taubman MA, Vaiverde P, Han X, Kau'ai T (2m 5j fmmur•e response: the key to bone resorption in periodontal disease. J Periodoritol 76 ñO33—2041. <https://doi.org/10.1902/jop &05.76.11•SJO33>
- Kirirney JS, Rammier CA, Giaarm bife WV (2m 7j Orai ffuid based biomarl:as ofaiveolar bone kss ia periodontitis Ann N Y Acad Sci 10'B:230—2351. <https://doi.org/10.1196/annals.1384.028>
- Kinase DF, Statlmpoaiou PG, Papapar*ñ PN (2017j Pwic<k>ntal disease. Nat Rev Dis Primers 3:170â8. <https://doi.org/10.1038/mdp&17d8>
10. Mayer C, Moritz R, Kirschner C, Borhard W, Maibaum R, Wiager•dw J, Flemming HC (1999) The role of intmmfecuiar iatmactions: stulies on rindel systemrn for bateriai biofilms. Int J Biol Maromol 26:3— 16. [https://doi.org/10.1016/S0141•8130\(99\)000574](https://doi.org/10.1016/S0141•8130(99)000574)
- Dmfirm A, Lee S, Mailhot J, HeTfi AF (2013) Prircipfes of Jmi•odontology. Periodontal 61:16—53. <https://doi.org/10.1111 lay.1600•0757.2011.00397•>>
- Meulman T, Peruzzo DC, Stipp RN, Gonç•aivm PF, Saifum EA, Casati MZ, Gone alves R B, Noc iti FH Jr (201 1} fmpact of Porphyromori g irig imlis imcuiation on ligandue induced afveoln•bor•e less. A pilot entry ia rats. J Pericdorrtai Res 46U9—636. [vdo i. n o. i111 by.1600•076SP 11.01385>](https://doi.org/10.1111 by.1600•076SP 11.01385>)
- Tuite•McDoririell M, Griffni AL, Mcmchberger ML, Dalton RE, Fuerst PA, Leys EJ (1997) Concordance of Porphyromonas giagivaiis colonization ia familim. J G ia Mionbiol 35:455-461
14. Slois J, Jognism MG (20(D) Ellie ierit aatimérobial treatmit in periodontal maiaitniarice care J Am Dent Asmc 131: 1293- 1304. <https://doi.org/10.1421Vjulaaicfve&00.0383>
15. Baym M, Smne UK, Kislmiyri R (2016) Mn itidrug evo futioruuy strateg ies to revs aritib ioté resistance. Sc ieme 351m43292. <https://doi.org/10.1126/scimce.a.vf3292>
16. Raab O (1900) Ubw die w in:nag tiuoresziemider stoffe auf Z Biol 39:524—546
17. Zeina B, Gzeezanan J, Coz-z-y D, Puz-cell (2QI2j totoxic effects of aritimionbiai photcdyiumic therapy on knatiacyctm ia vitro. Br J D mntol 146:568- 573. <https://doi.org/10.1046/j.1365•2133.2002.04623>>
18. Kimerik N, Nat:mishi H, MacRobert AJ, Hnideson B, Speight P, Wilson M (2003) tn vivo killirig of Porphyromona g irig imlis by toluidir•e b fue•mediated photosemitimtion ia an animai medei. Antimérob Agnits Chemother 47:932—940. <https://doi.org/10.1128/AAC.47d.932•940 W3>
19. Wainwright M, Maisch T, Noneil S, P K, Almeida A, Tegm G P, Hamblin MR (2017j Photoaritimérobial•are we afraid of the light* Lancet Infect Dis 17:e49—e55. [https://doi.org/10.1016/S1473•3099\(16\)31268-7](https://doi.org/10.1016/S1473•3099(16)31268-7)
20. Corrêa MG, Oliveira Df-I, Int i Cf-I, Pibeiro FV, Pimerrtel SP, Cirarm FR, Cmaria RC (2016) S1mrt•term mionbio'k'kal effects of photodynamic therapy in non-surgical periodontal treatment of rmiduai packets: asplé•mouth RCT. Surg Med 48:944—950. <https://doi.org/10.1002/kmW449>
- Bkarig E, Tafebi Ardekani MR, Rajabzadeb M, Sarmadi G, Biraag R, Gutb•echtN (2017j EWuatiozi ofefFecti of photodyziamic heap with loa•level diaJe Luar izi nozstzrglml teatruit of pwi•i larititis. J Lasiss Med Sci 8 :136- 142. <http://doi.org/10.15171/jfj1ms&17a5>
- Beret:ci T, Meseii SE, Noyan U, Kuru BE, Kimi k (2018j Efficay ofuljuactive phomlyiumé therapy ia the oeatment ofgermlized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. Lasts Surg Med. <https://doi.org/10.1002/kmK010>
- Grzech •L&niaic K, Matys J, Dominial: M (2018) Co arimm of the clinical andmikzobiological tfeEas ofAntibiotic thea izi }ezie•odontal pckels folloaring tzeatmenc an izi vñ^o study. Adv Cl in Exp Med 27:1263— 1270. <https://doi.org/10.17219/aeon/70413>
24. Talebi M, Taliee IL, fiAo)fiñeâfi fiA, fiAefizñeuâfi 'ml, Tozshabi fiA (2016) Miczobiological elKmcý ofFpbotcdjrmamic tbezagy as azi Otto noo surgical geriaJautal oeatrent: aclizilml trial.J Med ski 7:126-130. <https://doi.org/10.15171/jlmsJ016.21>
25. SechaKka M, Potnnpa J (2017j Manipulation of rnmnophils by Porphyromonas ging ivaiis in the development of Jmicdntitis. Front Cell tritest M érobiol 7:197. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00197>
26. Akram Z, Al•ShareeF SA, Dacod U, Asiri FY, Shah AH, AlQahtani MA, Vohra F, Javed F (2016) Batericidai efficacy of phomdyna•ie dmapy against periodorttai padmgcin ia periodorttai dix: a systmriatic review'. Phommed Surg 34:137— 149. <https://doi.org/10.1089/phob15.4076>
27. Finga RS, Antunm LAA, Fontes KBFDC, Kikhfer EC, torio NLPP, Autumns LS (2018j fs antimicrobial photodyriamé thnapy elective

- for microbial bio-reduction in peri-implantitis treatment? A systematic review and analysis. *PMID* <https://doi.org/10.1111/ply.12901>
28. M Saidi SP, Sea AJ, Stacker TG, Sirm MCB, Skis San View K'IA, kcal-Jmia EC, Prokic M, Vasaxsswto A, Sarkos SS, Cawvalho PTC (2017) Effects of photodynamic therapy on oxidative stress in muscle in animal models: a systematic review. *Oxidative Met Cell Longev* 2017:5273403. <https://doi.org/10.1155/AM17/5273403>
 29. Hayek RR, Arajo NS, Gasparian A, et al. (2015) Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* 76:1275-1281. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.1275>
 30. Sigusch BW, Pzxr A, Aflsukt V, Glckmeine E (2015) Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs in the periodontium of dogs. *Journal of Periodontology* 76:1111-1117. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.1111>
 31. de Oliveira RR, Jg Novar AB, et al. (2015) The effect of photodynamic therapy on the microbial profile in the dog's oral cavity. *Journal of Periodontology* 76:359-365. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.359>
 32. Takasaki M, Aoki A, Mnutani K, Scbvr zF, Srulean A, Wang CY, Koshy G, Ranazxs G, Isfikaara I, lazui Y (2015) Photodynamic therapy in the treatment of periodontitis: a systematic review. *Journal of Periodontology* 76:1111-1117. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.1111>
 33. LuEsiuie Z (2013) Photodynamic therapy: a review of neon and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicine* 39:1137-1140
 34. Demidova TN, Hamblin MR (2007) Photodynamic therapy of periodontitis. *Journal of Periodontology* 78:245-254. <https://doi.org/10.1177/0394632007303401>
 35. Mabch T (2007) Azci-microbial dynamic therapy: use of the laser? *Loss Med Sci* 22:63-91. <https://doi.org/10.1007/s10079-007-0001-0>
 36. Soukos NS, Geo JM (2011) Photodynamic therapy in the treatment of bacterial biofilms. *Periodontology* 55:143-166. <https://doi.org/10.1111/j.1525-0219.2011.01344.x>
 37. Ucheva MN, Techut WC, Bid MA (2011) Conquering the mediolene blue and tolukline blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Med Surg* 29:165-173. <https://doi.org/10.1002/lsm.1105>
 38. Goulad C, Luigruid S, Camiel E, Clmuvam S (2010) The Yersinia pestis chromosome and its virulence factors. *Bacteriol Rev* 74:367-377. <https://doi.org/10.1128/0.1128.T8.1D336-10>
 39. Fontana CR, Abwmdty A D, Som S, Ruggiwo K, Dmctie S, Marxarzonio RC, Bxssim CI, Kurt R, Gmci JM, Tour AC, Sukm NS (2019) The anti-infective effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 16:600-665. <https://doi.org/10.1016/j.pdt.2019.07.001>
 40. AndzrsJJ, Bcx eRC, Woobry SQ, Vas de Mero'e WP (1993) Low power laser radiation in the treatment of rat furunculosis. *Lasers Surg Med J* 13:72-78. <https://doi.org/10.1002/lsm.1900130113>
 41. So Wh'LMari isses JPA, we GenertkUC (1987) Laser treatment of periodontitis. *Journal of Periodontology* 58:149-167. [https://doi.org/10.1016/0016-0122\(87\)8123-4](https://doi.org/10.1016/0016-0122(87)8123-4)
 42. Aastnrxn R, Graf-de Beer M, Schroeder HE (1975) Clinical and histologic demonstration of bacterial growth in dog's periodontal pocket. *Journal of Periodontology* 46:37-47. [https://doi.org/10.1016/0016-0122\(75\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0016-0122(75)90040-0)
 43. OzHS, Pull DA (2011) The effect of photodynamic therapy on the bacterial biofilm in the periodontal pocket. *Journal of Periodontology* 82:1155-1161. <https://doi.org/10.1016/j.jperiod.2011.07.001>
 44. Spaazdio FF, Htang YY, Hamblin MR (2013) Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2:109-120. <https://doi.org/10.1089/1574891.X11308999D12>
- Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Premiação em congresso

