



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

GIULIANA GIOVINAZZO ANSELMO

AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM
***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* MEDIADA POR AZUL DE**
METILENO EM VEÍCULO SURFACTANTE

São Paulo, SP

2020



GIULIANA GIOVINAZZO ANSELMO

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM
Aggregatibacter actinomycetemcomitans MEDIADA POR AZUL DE
METILENO EM VEÍCULO SURFACTANTE**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutora em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates

São Paulo, SP

2020

Anselmo, Giuliana.

Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediada por azul de metileno em veículo surfactante. / Giuliana Giovinzano Anselmo. 2020.

44 f.

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

Orientador (a): Prof. Dr. Renato Araujo Prates.

1. aPDT. 2. Azul de metileno. 3. *Doença Periodontal*. 4. Resistência microbiana. 5. Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT).

I. Prates, Renato Araújo.

II. Título.

CDU 615.831

Universidade Nove de Julho

Sao Paulo, 27 de agosto de 2020.

TERMO DE APROVACAO

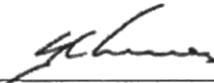
Aluno (a): Giuliana Giovinazzo Anselmo

Titulo da Tese: "Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Aggregatibacter acf/nomycefemcom/fans* mediada por azul de metileno em veiculo surfactante".

Presidente: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



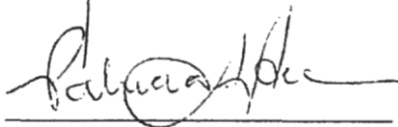
Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROFº. DRº LARA JASISKI MOTTA



Membro: PROFº. DRº. PATRICIA APARECIDA DA ANA



Membro. PROFº. DRº. STELLA REGINA ZAMUNER



AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, por toda a caminhada. À minha filha Bianca, que na inocência dos seus 6 anos me faz aprender a cada dia; como pessoa, mulher e mãe. Aos meus pais, Maria Rita e Luiz; minha base, meu apoio. Ao meu noivo Maurício, por toda paciência, parceria, amor e amizade.

Aos meus grandes amigos Pedro Henrique Cabral, Márcia Cabral e Luiz, família que a vida me proporcionou escolher, por toda ajuda e parceria.

À minha querida amiga, dupla de faculdade, parceira de equipe, Camila Godoy por ter apresentado o mundo acadêmico e apoiado na caminhada de Mestrado e Doutorado.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Renato Araujo Prates, por todo apoio, ajuda e conhecimento. Foi um ótimo orientador e parceiro. Fico muito honrada em tê-lo como mestre.

Agradeço a todos os meus colegas da UNINOVE por colaborar comigo e me apoiar.

Universidade Nove de Julho por proporcionar um curso tão qualificado, com excelentes professores e conteúdos

Ao programa de Pós-Graduação em Biofotônica

À CAPES

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo uso do espectrofotômetro (FAPESP 16/03037-0 - Projeto coordenado pela Profa. Christiane Pavani).

À Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC (CEM UFABC), às Profa. Dra. Patrícia Da Ana e Profa. Dra. Ilka Tiemy Kato Prates pelo uso das instalações laboratoriais para testes microbiológicos e pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

RESUMO

A doença periodontal é um problema de saúde pública e tem maior incidência na população adulta, podendo levar a perda da dentição. Seu tratamento é a eliminação de patógenos presentes na bolsa periodontal. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) vem sendo estudada como auxiliar neste tratamento, porém no ambiente bucal, os efeitos fotoquímicos encontram desafios como a dimerização do fotossensibilizador (FS). O uso de dodecil sulfato de sódio (SDS) produz a desagregação química do FS e vem se mostrando como alternativa para aPDT. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da aPDT mediada por azul de metileno (AM) em um patógeno periodontal em veículo com SDS. Foi avaliado o comportamento da aPDT mediada por azul de metileno (AM) em solução tamponada com fosfato (PBS) e em veículo surfactante (SDS) à 0,25%. Para tanto, inóculo de cepa pura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 foi crescida de estoques em ágar de infusão de cérebro e coração (BHI) à 37°C em atmosfera de microaerofilia. A aPDT foi realizada com laser diodo (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm, potência de saída de 100 mW, irradiação do poço de 250 mW/cm², energia de 6,18 e 30 J correspondente aos tempos de 60, 180 e 300s e exposição radiante de 15, 45, 75 J/cm², respectivamente. Foi avaliado a morte microbiana por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC); a incorporação de FS pelas bactérias foi avaliada por espectroscopia de absorção óptica do sobrenadante; bem como a morfologia de micro-organismos foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados indicaram que a aPDT com AM em PBS levou à redução 4,8 logs (ordens de grandeza) de morte bacteriana, porém, a associação com SDS diminuiu o efeito da aPDT consideravelmente para 1,45 logs. A presença de SDS 0,25% nesta bactéria provocou uma redução de 80% na incorporação de AM, e as imagens de MEV indicam que aglomerados de substâncias extracelulares são formadas em contato com SDS. Concluí-se que a aPDT em SDS a 0,25% impediu a ação fotodinâmica em *A. actinomycetemcomitans*; o mesmo em contato com este periodontopatógeno, impediu a entrada do FS na bactéria.

Palavras-chave: aPDT, azul de metileno, *doença periodontal*, Resistência microbiana, Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT).

ABSTRACT

Periodontal disease is a public health problem and has a higher incidence in the adult population, which can lead to loss of teeth. Its treatment is the elimination of pathogens present in the periodontal pocket. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been studied as an aid in this treatment, but in the oral environment, the photochemical effects encounter challenges such as dimming the photosensitizer (FS). The use of sodium dodecyl sulfate (SDS) produces the chemical breakdown of FS and has been shown as an alternative to PDT. The aim of this study was to investigate the effect of aPDT mediated by methylene blue (AM) on a periodontal pathogen in a vehicle with SDS. The behavior of aPDT mediated by methylene blue (AM) in phosphate buffered solution (PBS) and 0.25% surfactant vehicle (SDS) was evaluated. For this purpose, inoculum of pure strain of *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 was grown from stocks in brain and heart infusion agar (BHI) at 37 ° C in a microaerophilic environment. The aPDT was performed with a diode laser (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brazil) with a wavelength of 660 nm, output power of 100 mW, well irradiation of 250 mW / cm², energy of 6.18 and 30 J corresponding to the times of 60, 180 and 300s and radiant exposure of 15, 45, 75 J / cm², respectively. Microbial death was evaluated by counting colony-forming units (CFU); the incorporation of FS by the bacteria was evaluated by optical absorption spectroscopy of the supernatant; as well as the morphology of microorganisms was investigated by scanning electron microscopy (SEM). The results indicated that aPDT with AM in PBS reduced 4.8 logs of bacterial death, however, the association with SDS reduced the effect of aPDT considerably, by 1.45 logs. The presence of 0.25% SDS in this bacterium caused an 80% reduction in the incorporation of AM, and the SEM images indicate that clusters of extracellular substances are formed in contact with SDS. It was concluded that aPDT in 0.25% SDS was ineffective in *A. actinomycetemcomitans*; the same in contact with this periodontopathogen, prevented the entry of FS in the bacteria.

Key words: Surfactant vehicle, SDS, microbial resistance, periodontopathogens, photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), periodontal disease

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 –Figura modificada de (Chapple et al., 2018)(1)_____13
- Figura 2 - Representação do diagrama de Jablonski. O fotossensibilizador (FS) absorve um fóton de luz e passa do estado fundamental singlete para o estado excitado singlete. Nesse estado o FS pode regressar para o estado fundamental por emissão de fluorescência_____17
- Figura 3: Representação dos inóculos experimentais em relação ao fotossensibilizador usado nos experimentos. E0 representa a solução mãe de FS (100 vezes concentrado); E1 representa a suspensão microbiana testada; E2 representa a suspensão microbiana corada com FS – Fonte: Bianca A. Godoy-Miranda_____21
- Figura 4 Fluxograma dos grupos experimentais. (PBS) representa solução salina tamponada com fosfato, (SDS) representa dodecil sulfato de sódio a 0,25%,(L) representa o grupo laser com irradiação de 5 min, (FS) representa o grupo fotossensibilizador que não recebe irradiação, (aPDT1) representa o grupo quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana com irradiação de 1 min, (aPDT3) representa o grupo quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana com irradiação de 3 min, (aPDT5) o grupo quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana com irradiação de 5 min._____23
- Figura 5 Representação esquemática das placas de 96 poços, onde a primeira (superior) representa a homogeneização dos inóculos com AM+PBS(em azul) e AM+SDS(em verde); e irradiação dos grupos, e na placa de 96 poços inferior representa da diluição seriada (de 10^{-1} a 10^{-6}) dos grupos experimentais. FONTE: Bianca A. Godoy-Miranda_____23
- Figura 6 Média e desvio padrão de Log_{10} (UFC/mL) dos grupos de testados com aPDT em *A. actinomycetemcomitans* nos diferentes meios. (*) representa diferença estatísticas entre os grupos em PBS e SDS._____27
- Figura 7 Média e desvio padrão de contagem de log_{10} (UFC/mL) em contato com SDS a 0,25% por até 10 min. O grupo controle não apresenta contato com SDS_____28
- Figura 8 Espectro de absorção de sobrenadante com e sem contato com micro-organismos. No eixo Y são apresentados valores de absorbância (UA) e no eixo-X o comprimento de onda em (nm)_____29
- Figura 9 Média e desvio padrão da porcentagem de incorporação de AM por *A. actinomycetemcomitans* com AM em PBS (barra em azul) e AM em SDS (barra em verde). Os dois grupos apresentam diferenças estatisticamente significantes e o grupo AM mostrou uma incorporação maior de fotossensibilizador._____30
- Figura 10 Eletromicrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. actinomycetemcomitans*. A figura A apresenta amostra do grupo controle em PBS, enquanto a B são células submetidos à aPDT na presença de AM em PBS. A figura C representa o grupo controle com SDS (note que as células se apresentam envolvidas por aglomerados de material extracelular). A figura D representa o grupo aPDT com SDS; onde observa-se células bacterianas íntegras com aglomerados no espaço extracelular._____31

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 Dosimetria da fonte de luz laser que será utilizada nos experimentos</i>	<u>22</u>
<i>Tabela 2 Grupos experimentais</i>	<u>23</u>
<i>Tabela 3 – Valores médios de Log10 (UFC/mL) e desvio padrão (DP) dos dados de contagem microbiana nos grupos testados. Os valores de p apresentados são referentes à comparação do grupo com seu respectivo controle sem irradiação ou FS (Controle). Os grupos foram considerados diferentes quando $p < 0,05$.</i>	<u>27</u>

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AM	Azul de metileno
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
ATCC	Coleção de micro-organismos Norte americana
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
DP	Doença periodontal
FS	Fotossensibilizador
LED	Diodo emissor de luz
Log	Logaritmo
O ₂	Oxigênio
PACT	Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i>
ROS	<i>Oxygen-reactive species</i>
S ₀	Excitado singlete fundamental
S ₁	Estado excitado singlete
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	Dodecil sulfato sódio
T ₁	Estado tripleto
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
Lista de Ilustrações	8
Lista de tabelas	9
Lista de Abreviaturas	10
1. Contextualização	12
1.1 A DOENÇA PERIODONTAL	12
1.2 A CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS PERIODONTAIS	14
1.3. TRATAMENTO DA PERIODONTITE	15
1.4. Terapia fotodinâmica antimicrobiana	16
1.5 Azul de Metileno em Veículo Surfactante	18
2. Objetivos.....	20
2.1 Objetivos gerais	20
2.2- Objetivos específicos:.....	20
3. Métodos	21
3.1 Preparo do inóculo e corante fotossensível	21
3.2 Avaliação microbiológica	22
3.3 Fonte de irradiação.....	22
3.1 Grupos amostrais	22
3.5 Incorporação de fotossensibilizador	24
3.6 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	24
3.7 Análise estatística	25
4 Resultados	26
Discussão	32
Conclusão	36
Referências bibliográficas.....	37
Apêndice 1- Dados e comparações estatísticas dos experimentos de inativação microbiana	41
Anexo 1 – Produção científica durante o período	44

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 A DOENÇA PERIODONTAL

Antes de se definir a doença periodontal deve-se ter uma definição do que é a saúde de uma maneira geral. Saúde é um estado de completo bem-estar social, físico e mental e não somente a ausência de doença ou enfermidade. Com embasamento nessa definição da Organização Mundial de saúde (OMS, 1948) de Chapple e colaboradores em 2018 (1), concluíram que a saúde periodontal deve ser definida como um estado isento de inflamação nos tecidos periodontais de proteção e sustentação. A periodontite é uma doença inflamatória de origem bacteriana. A presença da doença periodontal; como a gengivite e periodontite; acontecem pela presença do fator de risco: o biofilme. Além disso, a saúde periodontal clínica abrange a vigilância imunológica fisiológica envolvendo níveis de marcadores biológicos e inflamatórios compatíveis com a homeostase. (1).

Existe um estágio de inflamação gengival que é condizente com a saúde periodontal clínica, conhecido como lesão inicial periodontal, onde não se apresentam sinais clínicos da doença, porém já existem alterações histológicas, com reação imunológica, manifestando-se como um infiltrado predominantemente de neutrófilos, que é consistente à saúde gengival clínica, isto é, sem sinais de inflamação e sangramento gengival (1,2).

A saúde gengival clínica após o tratamento da gengivite em um periodonto intacto caracteriza-se pela ausência de sangramento à sondagem, eritema e edema e sem perda do periodonto de sustentação (osso alveolar, ligamento periodontal e cemento radicular). A saúde gengival clínica em um periodonto reduzido é caracterizada por ausência de sangramento à sondagem e bolsas periodontais, porém com uma perda de inserção, normalmente encontrada na periodontite tratada com sucesso, porém, estes indivíduos ainda permanecerão com risco aumentado de progressão recorrente de periodontite (3).

A transição da saúde periodontal para a gengivite (doença periodontal que acomete o periodonto de proteção: gengiva), ainda é reversível; após a remoção do cálculo associado ao biofilme com o tratamento periodontal convencional (raspagem e alisamento radicular) que tem como objetivo a interrupção da progressão da doença periodontal. A transição para uma periodontite, já resulta em perda do periodonto de sustentação: osso alveolar, ligamento periodontal e cemento radicular; caracterizada

pela migração apical do epitélio juncional (epitélio juncional faz adesão à superfície dental pelos hemidesmossomos mantendo a integridade do sulco clínico); que é irreversível. A terapêutica periodontal ideal pode restaurar a saúde gengival em um periodonto reduzido (periodonto que já apresenta perda de inserção, mas não apresenta doença ativa), e pode reduzir a inflamação em bolsas periodontais profundas, com controle microbiano eficiente e inclusão do paciente em programas de manutenção e suporte de terapia periodontal conforme pode ser visualizado na Figura 1.

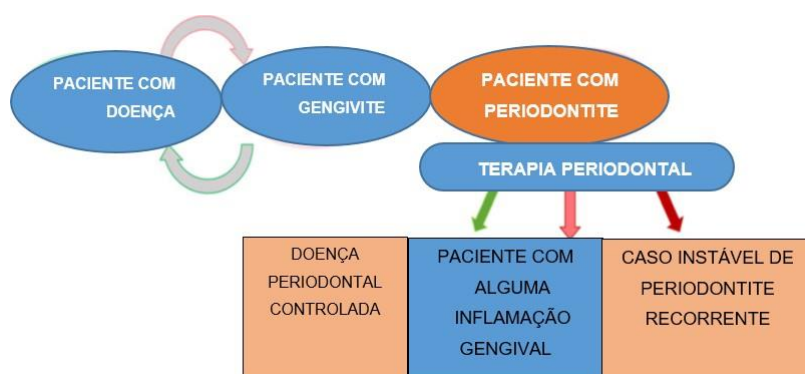


Figura 1 – Figura modificada de (Chapple et al., 2018)(1)

A periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos de proteção e suporte dos dentes, sendo induzida por micro-organismos específicos e influenciada pela resposta imunoinflamatória do hospedeiro. O objetivo do tratamento periodontal é eliminar depósitos bacterianos removendo o biofilme supra e subgengival e, consequentemente, reduzindo a resposta inflamatória excessiva. Esse tratamento é realizado por métodos mecânicos de raspagem e alisamento radicular, que resultam em melhora clínica significativa na maioria dos casos. No entanto, pode ser necessário usar antibióticos, especialmente em infecções periodontais mais graves (2). O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos pode causar efeitos adversos e levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Assim, há interesse global no desenvolvimento de outras formas de tratamento, e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) surge como uma alternativa ao uso de antimicrobianos (4,5).

1.2 A CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS PERIODONTAIS

A periodontite é caracterizada por uma associação microbiológica com inflamação; que resulta em perda do periodonto de inserção. A patogênese da doença tem sido caracterizada em suas principais vias moleculares levando a ativação de proteinases do hospedeiro que permitem a perda das fibras do ligamento periodontal marginal, com a migração apical do epitélio juncional, o que permite a disseminação apical de bactérias com o biofilme ao longo da superfície radicular. A formação de biofilme bacteriano desencadeia a inflamação gengival; na periodontite se caracteriza com a progressão da doença. A coagregação bacteriana ao biofilme, juntamente com a resposta imunoinflamatória do indivíduo acarretando a destruição não somente dos tecidos de proteção, mas também para os tecidos de sustentação. Evidências atuais apoiam influências de doenças multifatoriais, como o tabagismo, em múltiplas respostas imunoinflamatórias que alteram o biofilme, tornando-o disbiótico; alterando o microbioma em resposta à produtos de degradação inflamatória e tecidual, os quais enriquecem algumas espécies bacterianas presentes no biofilme; dentro da bolsa e sulco gengival. Nas últimas décadas, as tentativas de classificações da periodontite, apresentaram diferentes versões, em casos variados, que representam diferentes doenças ou apenas variações de uma única doença e associado ao acúmulo e persistência do biofilme (2,6–8).

O biofilme se forma em superfícies lisas não descamativas, por fases de adesão, coagregação/colonização e maturação; formando populações microbianas matriciais, aderentes entre si e / ou a superfícies ou interfaces (3). A capacidade de se conectar e se fixar em uma superfície, é a estratégia fundamental de sobrevivência para a maioria dos organismos procarióticos. A compreensão dos biofilmes foi avançando ao longo das últimas décadas pela aplicação de novas técnicas de detecção e visualização não invasivas (por exemplo, microscopia confocal de varredura a laser), mostrando que biofilmes são altamente estruturados com canais que atravessam a sua profundidade, formando sistemas circulatórios primitivos chamados canais de água (9).

As espécies estão organizadas espacialmente e funcionalmente, e muitos biofilmes naturais têm uma alta microbiota diversificada. A expressão gênica pode se alterar acentuadamente quando as células formam um biofilme, resultando em muitos organismos tendo um fenótipo radicalmente diferente após a adesão em uma

superfície, e estão envolvidos em uma ampla gama de interações metabólicas e moleculares. As bactérias em biofilmes são mais tolerantes aos agentes antimicrobianos e mais resistentes (10).

Segundo a nova classificação das doenças periodontais, a Periodontite é caracterizada pela perda de inserção, ou seja, há reabsorção do osso alveolar, perda das fibras do ligamento periodontal e colonização microbiana na superfície radicular. O principal fator responsável pela Periodontite é a associação entre bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas no interior da bolsa periodontal. Também apresenta inflamação no tecido conjuntivo gengival, com predomínio de plasmócitos e linfócitos, ocorrendo o aumento das citocinas pró-inflamatórias no local, contribuindo para a destruição e desorganização tecidual. Assim, nutrição do epitélio gengival também fica comprometida, pois é garantida pelo tecido conjuntivo. Desta forma, células do epitélio juncional se proliferam e migram em direção apical, principal característica da formação de bolsas periodontais (2).

1.3. TRATAMENTO DA PERIODONTITE

Embora alguns levantamentos epidemiológicos mostraram um declínio na prevalência de formas mais graves de doenças periodontais, outras pesquisas, usando um diagnóstico mais rigoroso em critérios, indicam que ainda existe a prevalência das formas mais leves e moderadas das doenças periodontais. No tratamento destes casos; os procedimentos envolvem etapas de diagnóstico, e posteriormente a remoção do biofilme e cálculo associado à biofilme seguido por controle e manutenção; com o controle dos agentes etiológicos e fatores de risco, Baseado em desfechos clínicos com abordagens de tratamento não cirúrgico ; com a raspagem e alisamento corono-radicular com instrumentos manuais e ultrassônicos, que além da remoção de depósitos de biofilme, contribui para redução e modificação dos periodontopatógenos colonizadores do biofilme. Vale ressaltar que a adesão e contribuição do paciente é de extrema importância no controle da estabilidade de saúde nos tecidos periodontais. A interrupção da progressão da doença periodontal está intimamente correlacionada com o controle do biofilme com a remoção mecânica diária (controle mecânico do biofilme por correta remoção à escovação), este então não irá acumular e dificultará a coagregação e colonização de espécies mais periodontopatogênicas, não induzindo resposta inflamatória relacionada a doença periodontal. O uso dos lasers para o tratamento periodontal em terapias não invasivas,

como um tratamento coadjuvante à terapia mecânica de remoção dos depósitos de biofilme, vem apresentando evidências para a eficácia destas abordagens, (11).

Frequentemente, a infecção por periodontopatógenos não é extinta somente pela raspagem e alisamento corono-radicular: terapia periodontal não cirúrgica para controle e interrupção da progressão da doença periodontal. A presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, micro-organismos com alto fator de virulência e grande capacidade de invasão tecidual são presentes nas doenças periodontais. Essas bactérias quando estão presentes em locais de difícil acesso para a remoção dos depósitos bacterianos, principalmente em bolsas periodontais mais profundas, a persistência desses patógenos na superfície radicular podem originar uma recolonização, mesmo em sítios já instrumentados, que levam a um resultado negativo na reavaliação e recidiva da doença periodontal. (12).

1.4. Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*) envolve o uso de um fotossensibilizador (FS) que é ativado pela luz em um comprimento de onda ressonante. Esses fenômenos povoam o estado tripleto do fotossensibilizador (FS), que neste momento pode transferir energia para o oxigênio do meio e resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como oxigênio singleto, ânion superóxido, radical hidroxila e hidrogênio. Esses EROs podem danificar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (11,12). A aPDT é uma modalidade não invasiva de tratamento e pode ser usado como adjuvante no tratamento da periodontite. Para o tratamento periodontal, o FS liga-se às células do biofilme bucal e, quando ativado pela luz, promove a desorganização física do biofilme e a morte de micro-organismos pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros fatores, como a presença de um alto nível de atividade metabólica (13) onde pode ser representado pelo diagrama de Jablonski na Figura 2.



Figura 2 - Representação do diagrama de Jablonski. O fotossensibilizador (FS) absorve um fóton de luz e passa do estado fundamental singlete para o estado excitado singlete. Nesse estado o FS pode regressar para o estado fundamental por emissão de fluorescência

Os efeitos da aPDT na doença periodontal foram investigados como um tratamento adjuvante da periodontite e uma classe de fotossensibilizadores frequentemente utilizados; os corantes azuis da família das fenotiazinas, entre os quais: azul de toluidina e o azul de metileno. As fenotiazinas são moléculas tricíclicas planas que possuem um átomo de nitrogênio quaternário e possuem fototoxicidade eficiente contra vários micro-organismos. Atualmente, as fenotiazinas representam os únicos fotossensibilizadores empregados clinicamente no tratamento antimicrobiano. Em um estudo *in vitro* realizado por Alvarenga e colaboradores em 2015 (13) a aPDT mediado por 100 μM de azul de metileno e irradiação a laser emitindo 660 nm com 100 mW de potência em um biofilme *in vitro* de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, um patógeno fortemente associado à doença periodontal. Três tempos de irradiação de 1, 3 e 5 min foram testados. Os resultados do estudo indicam que o tempo de irradiação impacta na morte celular, e o melhor resultado foi encontrado após 5 min de irradiação, no qual uma redução bacteriana de 99,85% foi alcançada (12,13).

Apesar dos bons resultados da aPDT *in vitro* (4,13) e do modelo animal (14), o uso da aPDT como um complemento ao tratamento periodontal em estudos clínicos tem se mostrado menos significativo. Essa falta de consenso clínico pode ser atribuída a características físicas, químicas e biológicas relacionadas ao uso clínico da aPDT. Os parâmetros de irradiação e o comportamento do fotossensibilizador no meio bucal

são extremamente importantes para se obter efeitos fotoquímicos e consequente morte microbiana. É importante notar que a toxicidade celular ocorre somente quando o espectro de absorção do FS e a radiação emitida são compatíveis. O comprimento de onda e a intensidade da luz, o tempo de exposição e a capacidade de absorção do FS determinam os resultados. A eficácia do tratamento depende da otimização de um grande número de parâmetros (15), portanto, é necessário estudar novos fotossensibilizadores com maior estabilidade para melhor dosimetria, pensando em mimetizar com a clínica do tratamento periodontal não cirúrgico.

1.5 Azul de Metileno em Veículo Surfactante

Os corantes metacromáticos são capazes de controlar sua agregação ocorrendo uma mudança na sua coloração. Os mais utilizados na odontologia são os corantes básicos ou catiônicos, sendo eles o azul de toluidina e o azul de metileno. A metacromasia é um fenômeno pelo qual um corante pode absorver luz em diferentes comprimentos de onda, dependendo de sua concentração e meio ambiente. O corante, que exhibe esse fenômeno sem alterar sua estrutura química, é dito ser metacromático. Quando os tecidos são corados com uma solução corante básica concentrada, as moléculas do corante ligadas são suficientemente próximas para formar agregados diméricos e poliméricos. Em uma solução diluída as fenotiazinas são monoméricos e exibem uma cor azul. Em uma solução concentrada ou hipertônica, as moléculas do corante polimerizaram e exibem a metacromasia, ocorrendo uma mudança de cor (16).

Autores sugerem que o uso do azul de metileno (AM) em uma solução de etanol ou de ureia são mais efetivos na morte microbiana do que quando dissolvidos em água. Foi constatado que a utilização de outras moléculas, como dodecil sulfato de sódio (SDS) pode controlar a agregação do AM, resultando em um aumento na quantidade de monômeros e uma diminuição de dímeros na solução, através de um aumento na interação eletrostática e hidrofóbica entre as suas moléculas. A aplicação do AM em uma solução de SDS (veículo surfactante) em uma concentração de 0,25%, apresentou uma redução microbiana aumentada quando utilizado na aPDT contra a *Candida albicans* comparado com a utilização do AM sem SDS. Este estudo constatou que na forma de monômeros, o AM era mais efetivo como fotossensibilizador e que as reações do Tipo II (através do oxigênio singlete) foram os mecanismos fotoquímicos que induziram *C. albicans* a uma morte mais eficientemente (17–19).

Em um estudo *in vitro* realizado; foi utilizado o SDS vinculado ao fotossensibilizador azul de metileno com o intuito de aumentar a morte microbiana de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* quando comparado com o azul de metileno em PBS, pois este veículo possui um efeito de dissolução de parede bacteriana e é capaz de diminuir a agregação molecular do fotossensibilizador, aumentando a quantidade de monômeros e diminuindo a quantidade de dímeros, onde foi encontrado a melhor eficácia da aPDT somente em *P. gingivalis*, quando associado FS ao veículo surfactante SDS, surgindo a hipótese de que a presença de SDS a 0,25% pode levar a respostas diferentes, dependendo do comportamento metabólico de cada espécie microbiana(20).

Diante desses achados, é necessário o desenvolvimento de formulações para aplicações clínicas que podem controlar a agregação de AM e, conseqüentemente, melhorar protocolos clínicos tornando-os mais eficientes (17).

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais:

O objetivo deste estudo é investigar o efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) mediada por azul de metileno na inativação de microorganismos periodontopatogênicos *in vitro* mimetizando o tratamento clínico não cirúrgico da doença periodontal.

2.2- Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antimicrobiana em bactéria periodontopatogênica na presença e ausência de SDS;
- Avaliar o efeito do SDS na incorporação de azul de metileno pela célula de *A. actinomycescomitans*;
- Avaliar morfológicamente a ultraestrutura de *A. actinomycescomitans* submetidos à aPDT na presença ou ausência de SDS.

3. MÉTODOS

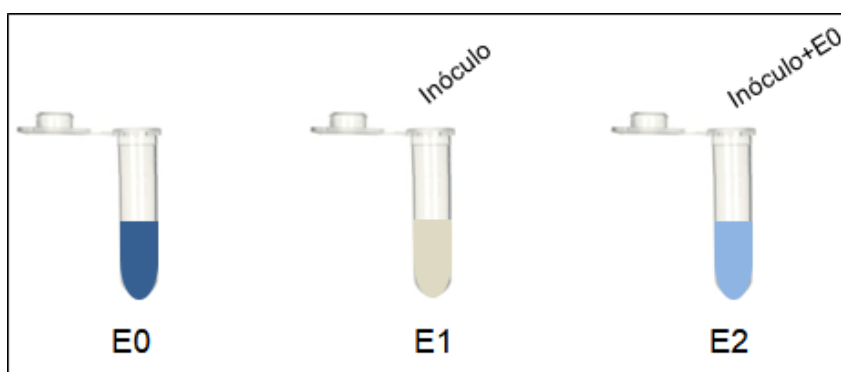
Foram obtidas cepas padrão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523) cultivadas em microaerofilia e em meio caldo infusão de cérebro e coração (BHI- Neogen-Acumedica, Michigan) e incubadas a 37°C por um período de 48 h. Para o crescimento bacteriano, foi utilizada uma estufa bacteriológica e a atmosfera de 5-10% CO₂ e foi induzida pela técnica da chama de vela. Uma vela foi fixada na parede inferior de um recipiente hermeticamente fechado e a vela foi então acesa. A chama foi observada até sua extinção. O mecanismo de funcionamento deste sistema consiste na queima do oxigênio (O₂) pela chama, transformando em dióxido de carbono (CO₂).

3.1 Preparo do inóculo e corante fotossensível

Um tubo falcon (F0) contendo a suspensão bacteriana foi levado a centrífuga por 3min em 2800 RPM. Em seguida foi retirado o líquido sobrenadante e então adicionado 8mL de solução salina fosfatada tamponada estéril (PBS) em pH 7,2, foi colocado em vórtex para homogeneização do conteúdo. Num outro tubo falcon (F1) foi adicionado 8mL de PBS e 500 µL do conteúdo de F0 para que haja menor concentração de bactérias que, por sua vez, permitirá maior controle do experimento e as suspensões de células resultaram em uma concentração de aproximadamente 2x10⁸ UFC/mL (escala 2 de Macfarland). O tubo foi levado ao vórtex por 10 s para suspensão bacteriana ficar homogênea.

Foi utilizado como fotossensibilizador azul de metileno na concentração final de 100 µM.

Figura 3: Representação dos inóculos experimentais em relação ao fotossensibilizador usado nos experimentos. E0 representa a solução mãe de FS (100 vezes concentrado); E1 representa a suspensão microbiana testada; E2 representa a suspensão microbiana corada com FS – Fonte: Bianca A. Godoy-Miranda



3.2 Avaliação microbiológica

As amostras foram utilizadas para determinação das UFC's (Unidades Formadoras de Colônia). Cada tubo com 1 mL BHI foi agitado em vórtex e passou por diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-6} vezes à concentração original ilustrado na Figura 5. Alíquotas de 10 μ L em 6 diluições foram semeadas em forma de estrias sobre superfície de Brain Heart infusion Agar (BHI ágar) em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C por um período de até 48-72 horas em condições de anaerobiose para avaliação de bactérias totais recuperadas. Após este período foi realizada a contagem das UFC's e os dados foram submetidos à análise estatística.

3.3 Fonte de irradiação

A fonte de luz utilizada foi *laser* de diodo (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) nos parâmetros descritos a seguir:

Tabela 1 Dosimetria da fonte de luz laser que será utilizada nos experimentos

Parâmetros	Laser
Comprimento de onda (nm)	660 \pm 2
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante (mW)	100
Área do feixe (cm ²)	0,4
Diâmetro do feixe (cm)	2,24
Irradiância (mW/cm ²)	250
Tempo de exposição (s)	60, 180, 300
Tempo de pré-irradiação (s)	60
Exposição radiante (J/cm ²)	15,45,75
Energia radiante (J)	6, 18, 30

3.1 Grupos amostrais

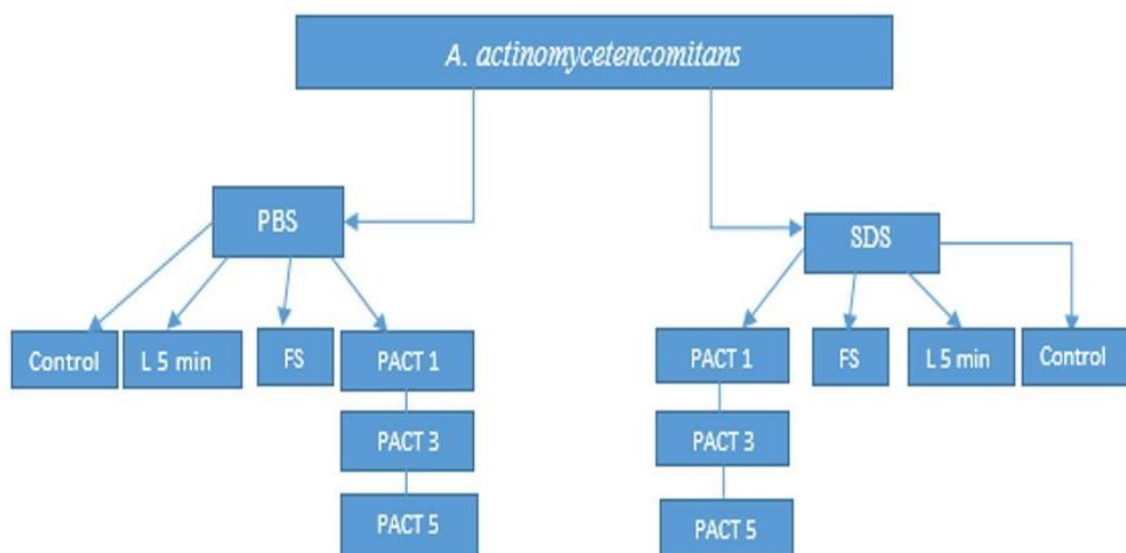
Amostras de inóculos de *A. actinomycetemcomitans* com e sem SDS (dodecil sulfato de sódio) foram usados em cada um dos grupos, sendo eles o grupo controle (C); grupo luz (L) que corresponde a irradiação máxima de laser por 5 minutos; grupo fotossensibilizador (FS) sem irradiação; e os grupos aPDT com diferentes tempos de irradiação (aPDT1) com 1 minuto de irradiação; (aPDT3) com 3 minutos de irradiação e (aPDT5) com 5 minutos de irradiação (de acordo com Tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2 Grupos experimentais

Sigla	Grupo	Descrição
C	Controle	Micro-organismos em PBS pelo tempo total do experimento.
L	Luz	Micro-organismos em PBS irradiados por 5 min
FS	Fotossensibilizador	Micro-organismos em PBS e FS sem irradiação
aPDT1	aPDT 1 min	Micro-organismos corados com FS durante 1 min e posteriormente irradiados pelo tempo indicado de 1, 3 ou 5 min.
aPDT3	aPDT 3 min	
aPDT5	aPDT 5 min	

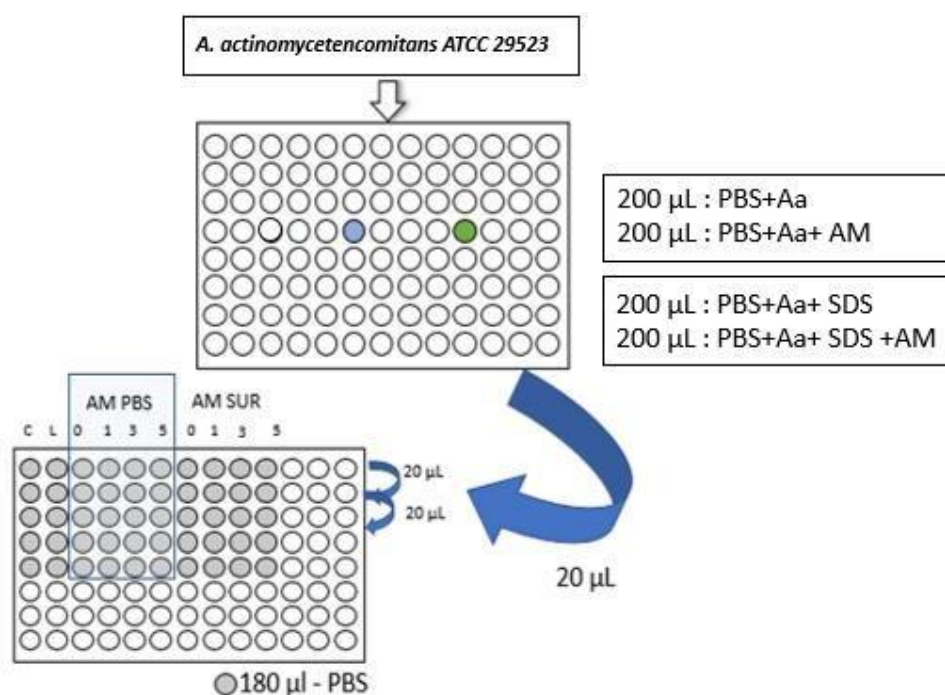
O inóculo de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 foi utilizado em dois grupos experimentais, o grupo PBS e o grupo SDS. Dentro destes grupos, temos 6 subgrupos, o grupo controle, grupo laser (irradiação com laser durante 5 min), grupo fotossensibilizador (FS) sem irradiação, e grupo aPDT com FS e irradiações de 1, 3 e 5 min.(17).

Figura 4 Fluxograma dos grupos experimentais. (PBS) representa solução salina tamponada com fosfato, (SDS) representa dodecil sulfato de sódio a 0,25%,(L) representa o grupo laser com irradiação de 5 min, (FS) representa o grupo fotossensibilizador que não recebe irradiação, (aPDT1) representa o grupo quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana com irradiação de 1 min, (aPDT3) representa o grupo quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana com irradiação de 3 min, (aPDT5) o grupo quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana com irradiação de 5 min.



Esse experimento foi realizado 3 vezes para *A. actinomycetemcomitans*.

Figura 5 Representação esquemática das placas de 96 poços, onde a primeira (superior) representa a homogeneização dos inóculos com AM+PBS(em azul) e AM+SDS(em verde); e irradiação dos grupos, e na placa de 96 poços inferior representa da diluição seriada (de 10^{-1} a 10^{-6}) dos grupos experimentais. FONTE: Bianca A. Godoy-Miranda



3.5 Incorporação de fotossensibilizador

Após os períodos de incubação com o fotossensibilizador, as amostras de *A. actinomycetemcomitans* foram centrifugadas (4000 x) e o sobrenadante foi utilizado para leitura em espectroscopia óptica para quantificação da porcentagem de incorporação do fotossensibilizador. Foi lido espectro eletromagnético com intervalos de 1 em 1 nm no intervalo de 500 a 800 nm. As amostras originais que entraram em contato com as bactérias foram diluídas na proporção ¼ em SDS 0,5% para calibração e leitura no espectrofotômetro (UV-800, SHIMADZU). O SDS neste caso auxilia na monomerização do AM para manter a quantificação com acurácia em 660 nm. Para quantificação da porcentagem de incorporação, os valores de absorção em 660 nm foram gravados e subtraídos da absorção de uma amostra nas mesmas condições, porém sem bactérias (grupo controle). Com a diferença entre amostra e controle foi calculado a porcentagem de incorporação de AM em cada grupo.

3.6 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Em uma membrana de silicone de 1mm de diâmetro, foi cultivado *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 por 48 horas em meio BHI, em 37° C.

Após o crescimento do inóculo, as membranas foram colocadas em uma placa de 24 poços, em cada grupo (Controle, PDT, Controle em meio SDS e PDT em meio

SDS), lavando previamente 2x em 2 ml de PBS. Nos dois grupos PDT, foi irradiado por tempo máximo de 5 minutos. Para fixação, foi colocado em 900 mL de PBS e 100 mL de Solução de Glutaraldeído a 2,5% (Greentec, lote: 5106) por 1 hora e após em Álcool 70% (Álcool etílico absoluto, Synth –lote. 161665/P.A.-A.C.S.- CH₃CH₂OH) por mais 1 hora.(21,22)

Para realização do MEV (MEV FEI Quanta 250), o inóculo em membrana foi fixado ao stub e foi metalizado (Sputtering Leica ACE200).

3.7 Análise estatística

Foi verificada a distribuição dos dados dentro de cada grupo e a homogeneidade das variâncias. De posse desta informação, o teste estatístico mais adequado em cada experimento foi utilizado.

Para a quantificação de inativação microbiana pela contagem de UFC/mL o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado e posteriormente empregou-se Anova de uma via. Para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste de Tukey. Grupos foram considerados diferentes quando $p < 0,05$.

A incorporação de fotossensibilizadores foi quantificada com a diferença da absorção em 660 nm das amostras de azul de metileno, AM em SDS, bactérias em AM, e bactérias em AM com SDS. Foi calculada a porcentagem de incorporação dividindo a diferença de absorção pelo valor do seu controle. Os dados foram coletados em triplicata e a normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S). Como os dados apresentaram distribuição normal, o Teste-t para par de médias foi utilizado, considerando-se diferenças significantes entre os grupos se $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

As análises de morte microbiana evidenciaram que os grupos controle, irradiação laser e AM sem irradiação apresentaram crescimento microbiano similar entre eles ($p>0,05$) e o grupo controle apresentou média de 8,29 \log_{10} (UFC/mL). Esses achados mostram ausência de efeito apenas da irradiação ou de incubação de AM no escuro por até 10 min. No decorrer do texto, os grupos onde foi aplicada aPDT serão comparados ao grupo controle sempre que o valor de (p) for indicado. No entanto, o comportamento estatístico dos dados mostrou que sempre que um grupo aPDT foi diferente do controle, ele também apresentava diferenças similares ao grupo irradiação laser e ao grupo AM sem irradiação.

Ao iniciar a irradiação das bactérias coradas, foi possível observar redução de 1,7 logs após 1 min (aPDT AM 1min = 6,6 \log_{10} UFC/mL) ($p=6,36 \times 10^{-5}$). Em continuidade com a irradiação, o grupo 3 min apresentou redução microbiana de 3,48 logs ($p=2,72 \times 10^{-8}$) e o grupo 5 min 4,76 logs ($p=3,94 \times 10^{-8}$). É válido ressaltar que o tempo de irradiação foi importante para aumento da morte microbiana. O grupo irradiado por 1 min apresentou menor morte do que o irradiado por 3 min ($p=2 \times 10^{-5}$) e o grupo 3 min também apresentou menor morte do que o irradiado por 5 min ($p=0,004$). As comparações podem ser observadas na Tabela 3.

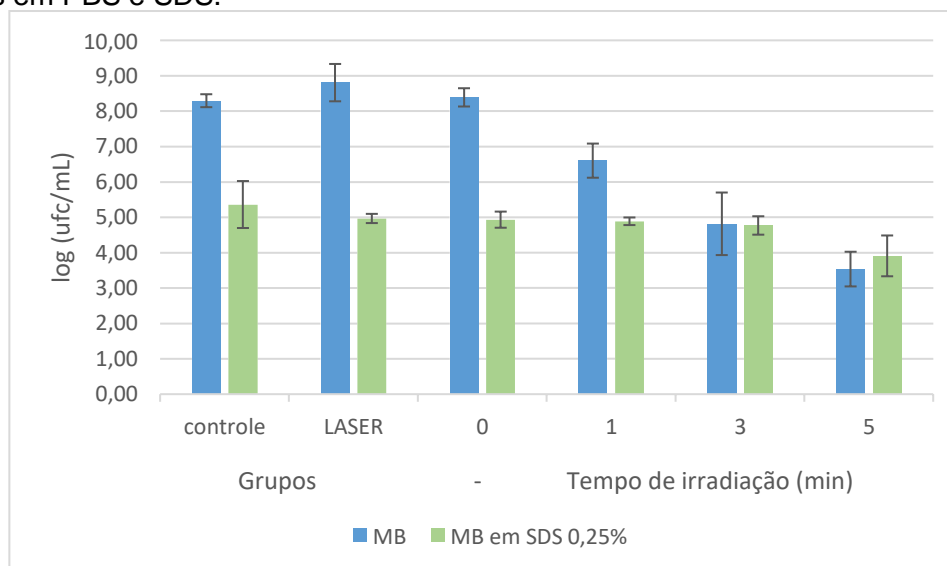
Com outra perspectiva, os grupos testados com veículo de SDS 0,25% em PBS apresentaram toxicidade expressiva em relação ao grupo sem SDS. Os controles sem irradiação ou FS mostraram que apenas o SDS em contato com as *A. actinomycetemcomitans* reduziu a viabilidade celular em 2,94 logs ($p=2,2 \times 10^{-8}$). Os grupos controle, laser e AM sem irradiação não apresentaram redução entre si ($p>0,05$). Contudo, a presença de SDS diminuiu o efeito fotodinâmico neste micro-organismo. As amostras irradiadas por 1 e 3 minutos também não apresentaram diferenças entre si ou para o grupo controle ($p>0,05$). Apenas o grupo com 5 minutos de irradiação apresentou uma discreta alteração no número de micro-organismos, com redução de 1,45 logs em relação ao controle ($p=0,0008$). Contudo, o grupo aPDT SDS 5 min não apresentou diferenças estatísticas para 1 ou 3 min de irradiação. Os dados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios de Log₁₀ (UFC/mL) e desvio padrão (DP) dos dados de contagem microbiana nos grupos testados. Os valores de p apresentados são referentes à comparação do grupo com seu respectivo controle sem irradiação ou FS (Controle). Os grupos foram considerados diferentes quando p<0,05.

	Grupos em PBS				Grupos em PBS-SDS 0,25%			
	MÉDIA	±DP	Logs de redução	p. Vs Ctrl	MÉDIA	±DP	Logs de redução	p. Vs Ctrl
Controle	8,29	0,18	0,0	-	5,36	0,54	0,00	-
Laser	8,53	0,27	-0,2	0,99	4,97	0,11	0,39	0,96
0	8,39	0,26	-0,1	1,00	4,93	0,19	0,42	0,94
1	6,60	0,48	1,7	6,38x10 ⁻⁵	4,89	0,09	0,47	0,89
3	4,81	0,88	3,5	2,71x10 ⁻⁸	4,77	0,21	0,59	0,67
5	3,54	0,49	4,8	3,94x10 ⁻⁸	3,91	0,47	1,45	0,0008

Para uma visão mais ilustrada e didática dos dados apresentados, elaboramos uma apresentação gráfica dos experimentos que pode ser observada na Figura 6. No eixo Y podemos identificar a quantidade de bactérias sobreviventes em log₁₀ (UFC/mL).

Figura 6 Média e desvio padrão de Log₁₀ (UFC/mL) dos grupos de testados com aPDT em *A. actinomycetemcomitans* nos diferentes meios. (*) representa diferença estatísticas entre os grupos em PBS e SDS.

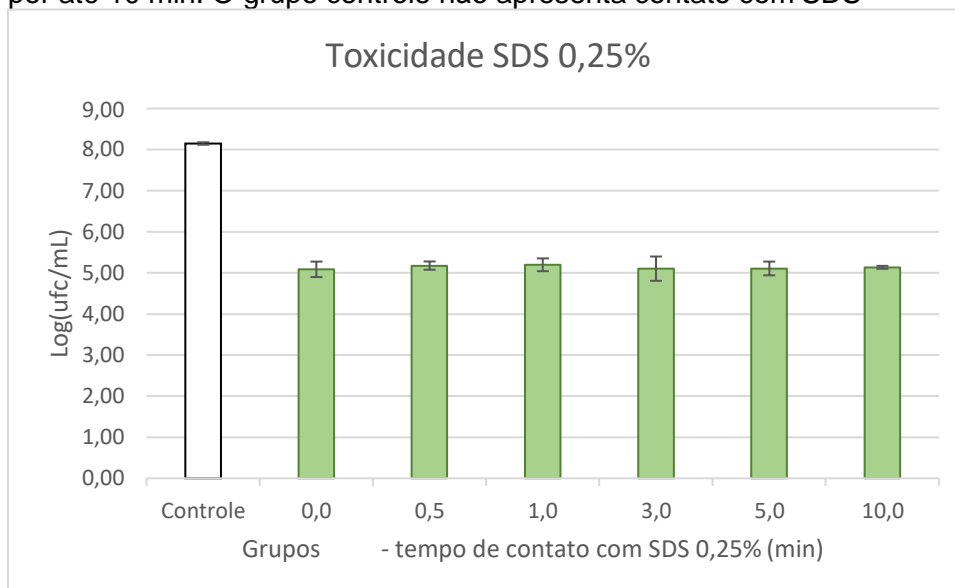


Na comparação da quantidade de UFC no grupo controle do grupo AM em PBS e o grupo controle do AM em SDS, houve uma citotoxicidade do SDS, porém a presença deste surfactante diminuiu consideravelmente a ação da aPDT.

Para uma avaliação mais detalhada da toxicidade de SDS em *A. actinomycetemcomitans*, a contagem de UFCs foi realizada com células em contato com SDS e comparadas com o grupo controle. O contato imediato da suspensão

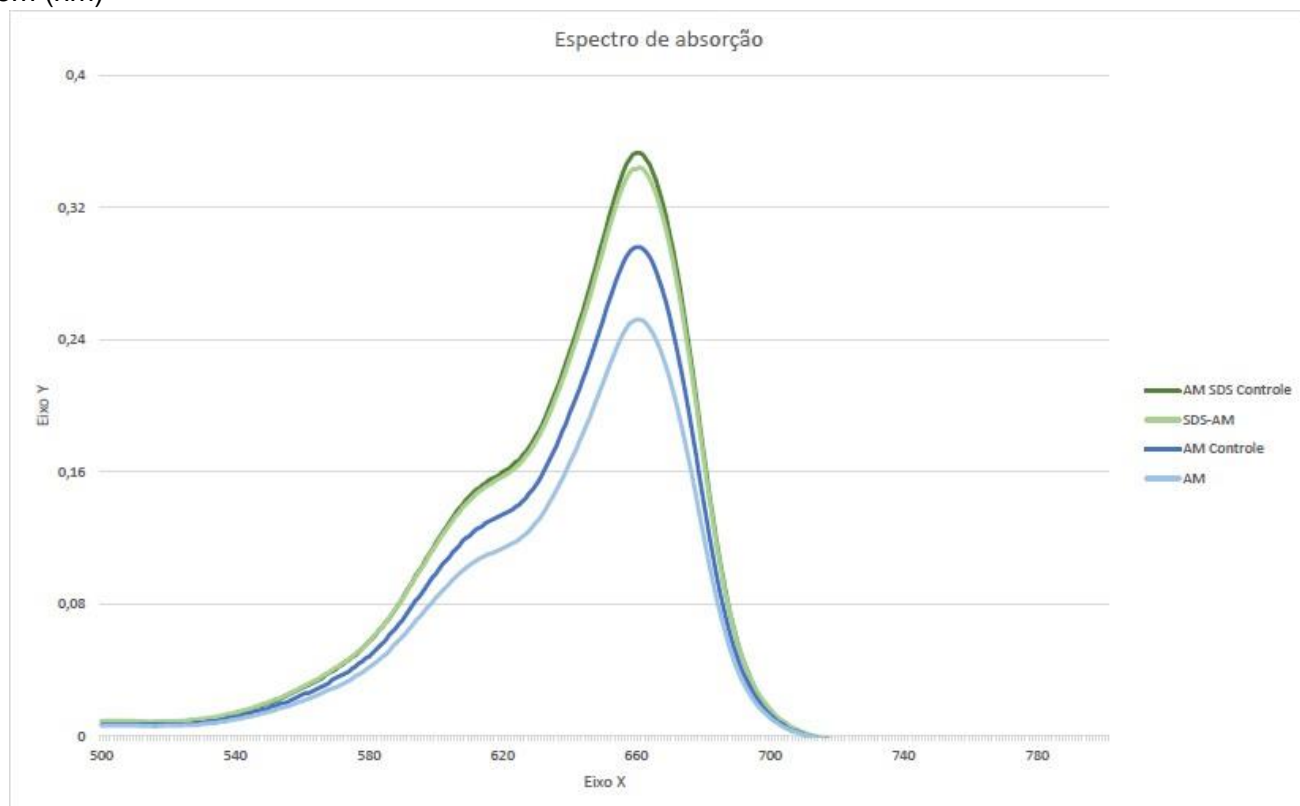
bacteriana com o SDS produziu redução de 3 logs de *A. actinomycetemcomitans*, porém, com o passar do tempo em até 10 min de contato, não foi observado um incremento de morte microbiana Figura 7.

Figura 7 Média e desvio padrão de contagem de \log_{10} (UFC/mL) em contato com SDS a 0,25% por até 10 min. O grupo controle não apresenta contato com SDS



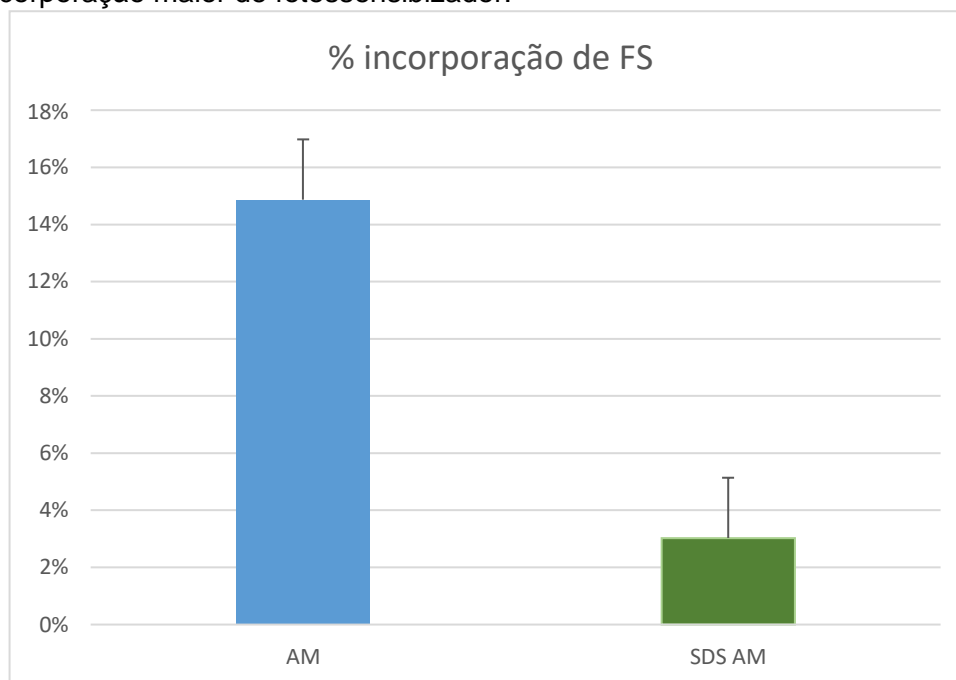
A incorporação do azul de metileno foi quantificada em avaliações por espectroscopia de absorção óptica do sobrenadante de líquido que entrou em contato com as bactérias. Podemos observar no eixo Y absorvância em unidades arbitrárias (ua) das amostras preparadas para calcular a incorporação. A linha em verde clara representa a média dos espectros grupo ao qual as bactérias entraram em contato com SDS, enquanto na linha verde escuro representa a concentração inicial de azul de metileno em SDS sem as bactérias. A diferença entre os dados representa a incorporação do AM pelas bactérias. Pode se observar que o grupo com SDS apresenta pequena variação na absorvância, o que denota uma condição de pouca perda de FS para as bactérias. Por outro lado, os grupos em cor azul, apresentaram acentuada diferença no pico de absorção em 660 nm Figura 8.

Figura 8 Espectro de absorção de sobrenadante com e sem contato com micro-organismos. No eixo Y são apresentados valores de absorbância (UA) e no eixo-X o comprimento de onda em (nm)



Para quantificação da incorporação, os dados de absorção em 660 nm foram avaliados. Após leitura dos espectros produzidos pelo azul de metileno em PBS e azul de metileno em veículo de SDS 0,25% podemos observar um comportamento diferente entre os dois grupos. A porcentagem de incorporação de FS pelo *pellet* bacteriano mostrou que o grupo AM em PBS incorporou 14,86% do FS, enquanto uma incorporação significativamente menor aconteceu na presença de SDS 3,02% ($p=0,038$) Figura 9. É importante observar que existe uma diferença de aproximadamente 80% entre os dois grupos, sugerindo uma menor entrada de FS no grupo tratado com SDS.

Figura 9 Média e desvio padrão da porcentagem de incorporação de AM por *A. actinomycetemcomitans* com AM em PBS (barra em azul) e AM em SDS (barra em verde). Os dois grupos apresentam diferenças estatisticamente significantes e o grupo AM mostrou uma incorporação maior de fotossensibilizador.

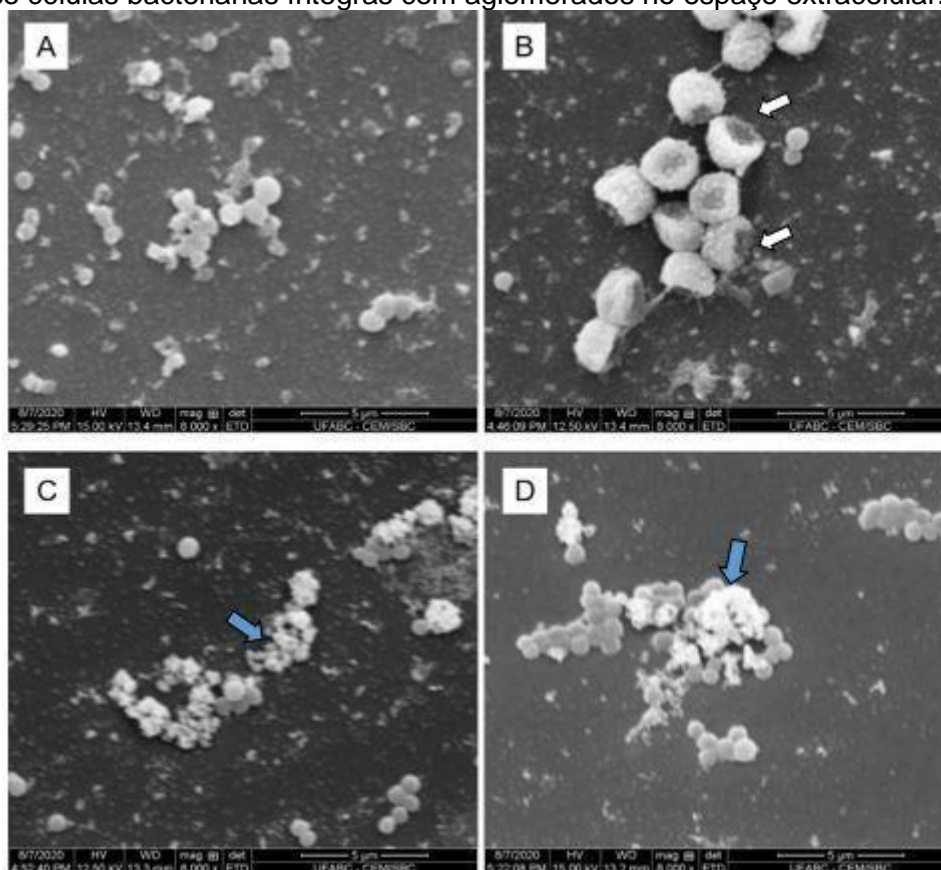


As avaliações realizadas por microscopia eletrônica de varredura evidenciaram *A. actinomycetemcomitans* crescidos aderidos em membrana de silicone. Pode ser observado ausência de estrutura compatível com biofilme, então podemos constatar que as células apesar de aderidas, mantiveram características de células individuais, sem matriz extracelular ou formação de canais de água Figura 10. Na Figura 10 podemos observar: (A), células com aspecto de coco bacilos podem ser identificados no centro da imagem as formas de parede celular externa se apresentam aparentemente íntegras. Na imagem (B) alteração da parede celular de *A. actinomycetemcomitans* após aPDT em veículo PBS. A imagem (C) representa um campo de bactérias não submetidas à aPDT no grupo controle com SDS, podemos observar aglutinação de material extracelular, porém, as bactérias ainda mantêm suas paredes de forma aparentemente íntegra do ponto de vista morfológico; e na imagem (D) observa-se também aglutinação das bactérias com paredes pouco ou não oxidadas e material extracelular. Foi importante observar que nos grupos que tiveram a presença de SDS, as bactérias estavam mais aglutinadas em grupos maiores e com mais células, porém, a forma destas apareceu sem alterações notáveis.

Ao observar no MEV, no grupo PDT, houve uma morte bacteriana comparado ao grupo controle. Nos grupos SDS, não ocorreu morte bacteriana por PDT, e ainda

se observou uma lama, entre as bactérias, aglutinando, sem sinais de morte bacteriana por PDT.

Figura 10 Eletromicrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. actinomycetemcomitans*. A figura A apresenta amostra do grupo controle em PBS, enquanto a B são células submetidos à aPDT na presença de AM em PBS. A figura C representa o grupo controle com SDS (note que as células se apresentam envolvidas por aglomerados de material extracelular). A figura D representa o grupo aPDT com SDS; onde observa-se células bacterianas íntegras com aglomerados no espaço extracelular.



DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia *in vitro* da aPDT em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* utilizando AM em veículos que possam influenciar a desagregação do FS e possibilitar uma formulação oral contendo AM, a ser utilizada em procedimentos clínicos de aPDT. Além dessas questões de extrema importância, mimetizando para o tratamento da doença periodontal, a correlação entre dose de irradiação e absorção do fotossensibilizador pelas células alvo é um fator determinante para a eficácia da terapia, uma vez que, dependendo do ambiente físico-químico em que se encontra, o AM pode se agregar e seu estado de agregação (monômeros ou dímeros) modula-se com o tipo de reação fotoquímica que ocorre e modula a eficácia da aPDT (5,12,23).

A terapia periodontal não cirúrgica mais usada é o planejamento e realização dos procedimentos periodontais não cirúrgicos para a remoção mecânica de cálculo dental e biofilme microbiano, afim de reduzir sítios de contaminação na superfície dental, interrompendo desta forma a progressão da doença periodontal, mesmo quando a associação de antibióticos sistêmicos se faz necessária. No entanto, a resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno preocupante e pode ser consequência do uso inadequado (24), ou mesmo de qualquer utilização de antibióticos.

A aPDT pode ser considerada uma alternativa promissora em tratamento coadjuvante à terapia periodontal convencional, e também em questão da inativação eficiente de micro-organismos patogênicos, quando comparado ao uso de antibióticos; isso se deve ao fato da aPDT empregar um fotossensibilizador, que preferencialmente se associa ao micro-organismo, e é então ativado com luz visível de comprimento de onda apropriado para gerar altas concentrações localizadas de EROs. Neste presente estudo, os resultados foram observados em triplicata para a verificação de unidades de colônias bacterianas, observando uma diminuição de 3 logs, quando comparados grupo controle (sem irradiação) e grupo Aa+AM em meio aquoso com irradiação em 5 min; corroborando com os achados de Spagnul de colaboradores em 2015 (25).

Em ensaios clínicos já realizados, onde a aPDT foi usada como coadjuvante ao tratamento periodontal na terapia não cirúrgica, os autores mostraram divergência nos resultados clínicos, principalmente por não existir ainda uma padronização da dosimetria e dos parâmetros de irradiação, além de uma vasta microbiota com grande

diversidade de micro-organismos na formação do biofilme, principalmente em bolsas profundas, onde a patogenicidade dos micro-organismos periodontopatogênicos que formam este biofilme são mais Gram-negativos e anaeróbicos, e fazem parte do chamado complexo vermelho da colonização, indicativo de atividade da doença periodontal (26). Nestes casos, a luz não consegue alcançar o fim das bolsas periodontais, impedindo que ocorra a aPDT por necessitar da combinação adequada de luz e um agente fotossensibilizador (FS). Outro ponto importante é a baixa tensão de oxigênio nestas condições, que limita a ação da aPDT. Este estudo *in vitro*, foi realizado com o intuito de verificar se a alteração da composição do fotossensibilizador fenotiazínico (azul de metileno), alteraria suas características fotoquímicas a ponto de ter um impacto em sua eficiência, e assim, criaria um favorecimento com potencial de benefícios clinicamente relevantes. Neste estudo os parâmetros utilizados foram selecionados a partir de um levantamento bibliográfico e os mais citados na literatura foram os dados utilizados e em estudos pilotos do nosso grupo (16,27).

Além disso, a terapia periodontal não cirúrgica que é a realização da remoção dos depósitos de biofilme, com raspagem e alisamento corono-radicular, tem um efeito limitado na estrutura do biofilme, o qual pode representar um importante reservatório para a reinfecção e recolonização dos nichos subgingivais, causando recidivas e a não interrupção efetiva da progressão da doença pela patogenicidade dos micro-organismos em recolonizar as bolsas periodontais mais profundas (28). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um periodontopatógeno principalmente oportunista residente na microbiota bucal, com fatores de virulência capazes de destruição e invasão tecidual, além de alterar e inativar a resposta imunológica inata e adaptativa, devido a maior produção de leucotoxina, o que indicam um papel importante no desenvolvimento de periodontite de caráter agressivo e rápida destruição do periodonto de suporte (29).

Haag e colaboradores em 2015 (23) demonstram também que existe eficácia de aPDT para *A. actinomycetemcomitans* em meio aquoso, confirmando os resultados obtidos no presente estudo. MB em combinação *A. actinomycetemcomitans* e irradiação resultou numa diminuição estatisticamente significativa de a combinação mais eficiente sendo MB 0,01% com um laser de diodo (665 nm). Em contrapartida, em nosso trabalho, o grupo onde se associa azul de metileno ao veículo surfactante ao inóculo, a aPDT não ocorreu para *A. actinomycetemcomitans*.

Da Colina e colaboradores em 2018 mostraram a eficácia do veículo SDS na inativação de cultura planctônica de *Candida albicans* (17). Em contrapartida, na avaliação microbiológica no nosso experimento, os grupos com SDS apresentaram pouco relevantes de aPDT para *A. actinomycescomitans*.

Paulino e colaboradores em 2016 testaram um veículo surfactante em cultura de *A. actinomycescomitans* e observaram que ao adicionar N- Laurilsarcosinato de sódio até sua concentração final de 1%, as proteínas como a OMP29 presentes na membrana externa da parede celular (membrana externa: responsável pela prevenção da perda de proteínas periplasmáticas e também impedem o acesso de enzimas hidrolíticas ao peptidoglicano) de *A. actinomycescomitans*, e estas proteínas são insolúveis ao detergente, o que corrobora com o resultado observado no presente trabalho, tanto na contagem de UFC, na visualizado ao MEV e na incorporação de AM. Podemos aqui sugerir a hipótese de que a presença de SDS inibe a entrada do fotossensibilizador na bactéria *A. actinomycescomitans*, e por consequência diminui o efeito da aPDT mediada por AM (30).

Os resultados obtidos nos estudos anteriores correspondem com os resultados obtidos neste estudo, pois apesar da presença do SDS potencializar o efeito bactericida em *P. gingivalis*, durante as irradiações com a presença de AM o mesmo, foi tóxico para os grupos controle, laser e 0 (FS sem irradiação) sem apresentar uma explicação plausível para este acontecimento (17). O presente estudo *in vitro* foi realizado com o intuito de verificar se a alteração da composição do fotossensibilizador fenotiazínico (azul de metileno) alteraria suas características fotoquímicas a ponto de ter um impacto em sua eficiência, e assim, criaria um favorecimento com potencial de benefícios clinicamente relevantes. Na espectroscopia realizada neste presente estudo, foi verificado que o *pellet* bacteriano, não absorve o fotossensibilizador AM quando em meio surfactante (SDS), a porcentagem de absorção foi de apenas 3% enquanto o *pellet* bacteriano em PBS absorveu o FS em uma porcentagem de 15%. Especula-se que algumas proteínas específicas na parede celular de algumas bactérias não se solubilizam em adstringentes que é o caso de meio surfactante. Dessa forma existe dificuldade na coloração do FS pela membrana e absorção citoplasmática. Tais resultados não convergem com estudos anteriores que usaram *Candida albicans* nos grupos experimentais. Contudo, pode-se observar maior citotoxicidade nos grupos com a

presença de SDS, essa citotoxicidade não pode ser considerada isoladamente, não existe intenção de associá-la a futuros benefícios aPDT.

A aPDT aparenta ser uma opção promissora para redução na quantidade de micro-organismos periodontopatogênicos em combinação com a terapia periodontal não cirúrgica. Por apresentar controversas na literatura, são necessários mais estudos para responder essas questões quanto a resposta das *A. actinomycetemcomitans*.

CONCLUSÃO

A. actinomycetemcomitans apresentou redução bacteriana proporcional ao tempo de irradiação quando submetida a PDT em solução aquosa. Por outro lado, a aPDT em SDS a 0,25% foi pouco efetiva neste micro-organismos. O SDS proporciona formação de aglomerados de substâncias extracelulares em *A. actinomycetemcomitans* e a presença de SDS impede a entrada de azul de metileno nessa bactéria com consequente diminuição da ação fotodinâmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89(December 2017):S74–84.
2. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):85–96.
3. Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *J Periodontal Implant Sci*. 2014;44(2):79–84.
4. Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, et al. Antimicrobial photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017;19:1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.04.004>
5. Grzech-Leśniak K, Matys J, Dominiak M. Comparison of the clinical and microbiological effects of antibiotic therapy in periodontal pockets following laser treatment: An in vivo study. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(9):1263–70.
6. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89(February):S159–72.
7. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(December 2017):S68–77.
8. Ramseier CA, Mirra D, Schütz C, Sculean A, Lang NP, Walter C, et al. Bleeding on Probing as it relates to smoking status in patients enrolled in supportive periodontal therapy for at least 5 years. *J Clin Periodontol*. 2015;42(2):150–9.
9. Kim EH, Joo JY, Lee YJ, Koh JK, Choi JH, Shin Y, et al. Grading system for periodontitis by analyzing levels of periodontal pathogens in saliva. *PLoS One*. 2018;13(11):1–14.

10. Marsh PD. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol*. 2005;32(SUPPL. 6):7–15.
11. Ryder MI, Armitage GC. Minimally invasive periodontal therapy for general practitioners. *Periodontol 2000*. 2016;71(1):7–9.
12. Carvalho VF, Lubisco MA, Alves VTE, Gonçalves CCJS, Conde MC, Pannuti CM, Georgetti MAP DMG. TERAPIA FOTODINÂMICA EM PERIODONTIA CLÍNICA- Photodynamic therapy in periodontics. *Rev Periodontia*. 2010;20:3–76.
13. Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, Kato IT, Suzuki LC, Ribeiro MS, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2015;12(1):131–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.10.002>
14. Belinello-Souza EL, Alvarenga LH, Lima-Leal C, Almeida P, Leite CG, Lima TR, et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment: Experimental model. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017;18:275–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.03.008>
15. Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro F V., Casarin RCV, Cirano FR, Saraceni CHC, et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: A randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2013;28(1):317–24.
16. Alvarenga LH, Gomes AC, Carribeiro P, Godoy-Miranda B, Noschese G, Simões Ribeiro M, et al. Parameters for antimicrobial photodynamic therapy on periodontal pocket—Randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2019;27(August 2018):132–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.035>
17. Da Collina GA, Freire F, Santos TP da C, Sobrinho NG, Aquino S, Prates RA, et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat Candida albicans infections using photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2018;17(10):1355–64.
18. Nuñez SC, Yoshimura TM, Ribeiro MS, Junqueira HC, Maciel C, Coutinho-Neto MD, et al. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015;150:31–7.
19. Hosseini N, Yazdanpanah S, Saki M, Rezazadeh F, Ghapanchi J, Zomorodian

- K. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer. *J Dent (Shiraz, Iran)*. 2016;17(4):354–60.
20. Tortamano ACAC, Anselmo GG, Kassa CT, Godoy-Miranda B, Pavani C, Kato IT, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle on periodontopathogens. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;
 21. Cheng CF, Wu KM, Chen YT, Hung SL. Bacterial adhesion to antibiotic-loaded guided tissue regeneration membranes - A scanning electron microscopy study. *J Formos Med Assoc [Internet]*. 2015;114(1):35–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2013.07.010>
 22. Velliyagounder K, Ganeshnarayan K, Velusamy SK, Fine DH. In vitro efficacy of diallyl sulfides against the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2397–407.
 23. Haag PA, Steiger-Ronay V, Schmidlin PR. The in Vitro antimicrobial efficacy of PDT against periodontopathogenic bacteria. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):27327–38.
 24. Valle LA, Lopes MMR, Zangrando MSR, Sant'Ana ACP, Greggi SLA, de Rezende MLR, et al. Blue photosensitizers for aPDT eliminate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in the absence of light: An in vitro study. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]*. 2019;194(March):56–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.03.005>
 25. Spagnul C, Turner LC, Boyle RW. Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]*. 2015;150:11–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.021>
 26. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000*. 2006;42(1):219–58.
 27. Carvalho VF, Andrade PVC, Rodrigues MF, Hirata MH, Hirata RDC, Pannuti CM, et al. Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal patients: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2015;42(5):440–7.
 28. Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy

- subjects. *J Clin Periodontol*. 2003;30(12):1031–7.
29. Könönen E, Müller HP. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2014;65(1):46–78.
 30. SILVA MP DA. OMP29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: análise filogenética , interação com proteínas de matriz e resposta de células epiteliais. 2016;

APÊNDICE 1- DADOS E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS DOS EXPERIMENTOS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA

Teste de normalidade

<u>Kolmogorov_Smirnov</u>	<u>Valor de p</u>	<u>Decisão no nível (5%)</u>
MB CTRL	0,94864	Normal
MB LASER	1	Normal
MB 0	1	Normal
MB 1	1	Normal
MB 3	0,50519	Normal
MB 5	0,90215	Normal
SDS CTRL	0,78651	Normal
SDS LASER	0,78651	Normal
SDS 0	0,78651	Normal
SDS 1	0,78651	Normal
SDS3	0,78651	Normal
SDS 5	0,78651	Normal

Teste Anova uma via

<u>Grupos</u>	<u>Média</u>	<u>Desvio Padrão</u>	<u>Erro</u>
ctrl	8,29433	1,82E-01	0,0911
L	8,52683	2,70E-01	0,13494
MB0	8,3877	2,12E-01	0,10603
MB1	6,59884	4,82E-01	0,24096
MB3	4,81444	3,82E-01	0,44114
MB5	3,53541	4,91E-01	0,24556
CTRLSDS	5,35784	5,41E-01	0,27064
LSDS	4,965	1,10E-01	0,05485
0 SDS	4,93309	0,18597	0,09299
1 SDS	4,88688	0,0869	0,04345
3 SDS	4,76792	2,12E-01	0,10602
5 SDS	3,90798	0,4711	0,23555

Resumo ANOVA

	<u>DF</u>	<u>Soma dos quadrados</u>	<u>Média dos quadrados</u>	<u>Valor de F</u>	<u>Prob>F</u>
Modelo	11	136,72743	12,42977	73,95304	2,59x10 ⁻²¹
Erro	36	6,05075	0,16808		

Tukey Teste - Comparações das médias				
	Diferença médias	SEM	q Value	Probabilidade
L ctrl	0,2325	0,28989	1,1342	0,99955
MB0 ctrl	0,09336	0,28989	0,45545	1,00E+00
MB0 L	-0,13913	0,28989	0,67875	1,00E+00
MB1 ctrl	-1,69549	0,28989	8,27127	6,38E-05
MB1 L	-1,92799	0,28989	9,40547	5,69E-06
MB1 MB0	-1,78885	0,28989	8,72672	2,41E-05
MB3 ctrl	-3,47989	0,28989	16,97628	2,72E-08
MB3 L	-3,71239	0,28989	18,11048	2,45E-08
MB3 MB0	-3,57326	0,28989	17,43173	2,61E-08
MB3 MB1	-1,7844	0,28989	8,70501	2,53E-05
MB5 ctrl	-4,75892	0,28989	23,21588	3,94E-08
MB5 L	-4,99142	0,28989	24,35008	0,00E+00
MB5 MB0	-4,85228	0,28989	23,67133	0,00E+00
MB5 MB1	-3,06343	0,28989	14,94461	1,78E-08
MB5 MB3	-1,27903	0,28989	6,2396	0,00439
CTRLSDS ctrl	-2,93649	0,28989	14,32536	2,20E-08
CTRLSDS L	-3,16899	0,28989	15,45956	1,45E-08
CTRLSDS MB0	-3,02986	0,28989	14,78082	1,89E-08
CTRLSDS MB1	-1,241	0,28989	6,05409	6,34E-03
CTRLSDS MB3	0,5434	0,28989	2,65092	7,66E-01
CTRLSDS MB5	1,82243	0,28989	8,89052	1,70E-05
LSDS ctrl	-3,32933	0,28989	16,24179	2,88E-08
LSDS L	-3,56183	0,28989	17,376	2,63E-08
LSDS MB0	-3,4227	0,28989	16,69725	2,78E-08
LSDS MB1	-1,63384	0,28989	7,97053	1,21E-04
LSDS MB3	0,15056	0,28989	0,73449	0,99999
LSDS MB5	1,42959	0,28989	6,97408	9,85E-04
LSDS CTRLSDS	-0,39284	0,28989	1,91643	0,96485
0 SDS ctrl	-3,36125	0,28989	16,39747	2,85E-08
0 SDS L	-3,59374	0,28989	17,53167	2,59E-08
0 SDS MB0	-3,45461	0,28989	16,85292	2,74E-08
0 SDS MB1	-1,66575	0,28989	8,1262	8,69E-05
0 SDS MB3	0,11865	0,28989	0,57881	1
0 SDS MB5	1,39768	0,28989	6,81841	0,00136
0 SDS CTRLSDS	-0,42475	0,28989	2,07211	9,41E-01
0 SDS LSDS	-0,03191	0,28989	0,15567	1
1 SDS ctrl	-3,40745	0,28989	16,62288	2,80E-08
1 SDS L	-3,63995	0,28989	17,75708	2,54E-08
1 SDS MB0	-3,50081	0,28989	17,07834	2,69E-08
1 SDS MB1	-1,71196	0,28989	8,35161	5,37E-05
1 SDS MB3	0,07244	0,28989	0,3534	1
1 SDS MB5	1,35147	0,28989	6,593	0,00216

1 SDS CTRLSDS	-0,47096	0,28989	2,29752	0,88853
1 SDS LSDS	-0,07812	0,28989	0,38109	1
1 SDS 0 SDS	-0,04621	0,28989	0,22542	1
3 SDS ctrl	-3,52642	0,28989	17,20324	2,67E-08
3 SDS L	-3,75891	0,28989	18,33744	9,43E-08
3 SDS MB0	-3,61978	0,28989	17,65869	2,56E-08
3 SDS MB1	-1,83093	0,28989	8,93197	1,55E-05
3 SDS MB3	-0,04652	0,28989	0,22696	1
3 SDS MB5	1,2325	0,28989	6,01264	0,00687
3 SDS CTRLSDS	-0,58992	0,28989	2,87788	0,66813
3 SDS LSDS	-0,19708	0,28989	0,96145	0,99991
3 SDS 0 SDS	-0,16517	0,28989	0,80577	0,99998
3 SDS 1 SDS	-0,11896	0,28989	0,58036	1
5 SDS ctrl	-4,38635	0,28989	21,39833	1,84E-06
5 SDS L	-4,61885	0,28989	22,53253	4,07E-08
5 SDS MB0	-4,47971	0,28989	21,85378	4,63E-06
5 SDS MB1	-2,69086	0,28989	13,12706	3,13E-08
5 SDS MB3	-0,90646	0,28989	4,42205	0,11499
5 SDS MB5	0,37257	0,28989	1,81755	0,97591
5 SDS CTRLSDS	-1,44986	0,28989	7,07297	8,02E-04
5 SDS LSDS	-1,05702	0,28989	5,15654	0,03408
5 SDS 0 SDS	-1,02511	0,28989	5,00086	0,04474
5 SDS 1 SDS	-0,9789	0,28989	4,77545	0,0655
5 SDS 3 SDS	-0,85993	0,28989	4,19509	0,16086

ANEXO 1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO

Artigos completos publicados

- Giuliana Giovinazzo Anselmo, Ana Carolina Alves Camargo Tortamano, Marcela Letícia Leal Gonçalves, Adriana Leal-Rossi, Bianca Aparecida Godoy-Miranda, Márcia Regina Cabral Oliveira, Pedro Henrique Cabral Oliveira, Carol Brandt Alves, Sandra Kalil Bussadori, Renato Araujo Prates. Antimicrobial photodynamic chemotherapy mediated by PapaMBlue on chronic periodontal disease: Study protocol for a randomized, blind, controlled trial. *Randomized Controlled Trial Medicine (Baltimore)*. 2020 Feb;99(6):e18854.
- Tortamano ACAC, Anselmo GG, Kassa CT, Godoy-Miranda B, Pavani C, Kato IT, Wainwright M, Prates RA. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle on periodontopathogens. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 May 10:101784.