



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA  
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LUCIANA TOLEDO COSTA SALVIATTO**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA CURVA  
DE MORTE DE *Aggregatibacter actinomycetenum*  
INDUZIDA PELA TERAPIA ANTIMICROBIANA COM LUZ AZUL**

**São Paulo**

**2021**



**LUCIANA TOLEDO COSTA SALVIATTO**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA CURVA  
DE MORTE DE *Aggregatibacter actinomycetencomitans*  
INDUZIDA PELA TERAPIA ANTIMICROBIANA COM LUZ AZUL**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Mestre em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador Prof: Dr. Alessandro Melo Deana  
Co-orientador Prof: Dr. Renato Araujo Prates

**São Paulo**

**2021**

Salviatto, Luciana Toledo Costa.

Estudo da influência do meio de cultura na curva de morte de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induzida pela terapia antimicrobiana com luz azul. / Luciana Toledo Costa Salviatto. 2021. 55 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandro Melo Deana

1. Fotossensibilizadores endógenos. 2. Terapia antimicrobiana com luz azul. 3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. 4. Periodontite. 5. Porfirinas. 6. LED.

I. Deana, Alessandro Melo. II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 10 de dezembro de 2021.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Luciana Toledo Costa Salviatto

Título da Dissertação: "A influência do meio de cultura na terapia antimicrobiana com luz azul (aBLT) na bactéria periodontopatógena *aggregatibacter actinomycetencomitans*".

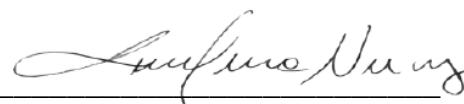
Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DEANA



Membro: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup>. SILVIA CRISTINA NUÑEZ



## **Dedicatória**

Dedicado aos meus pais Ivanir e Neusa.

Obrigada pelas melhores heranças que poderiam me dar: perseverança e honestidade.

Dedico também à minha família: meu marido André e às minhas filhas Clara, Marina e Helena.

Obrigada pela compreensão nos momentos em que estive ausente e pelo apoio que nunca deixaram faltar. Vocês são a razão de tudo.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Alessandro Melo Deana pela paciência e orientação.

Ao co-orientador Renato Araújo Prates pelos ensinamentos no laboratório de microbiologia e pela amizade construída.

À Prof. Dra. Christiane Pavani pela participação na banca de qualificação e de defesa, bem como nos experimentos no laboratório da UNINOVE.

À Prof. Dra. Silvia Nuñez pela participação na banca de defesa.

À Profa. Dra. Anna Carolina Ratto e à Profa. Dra. Ilka Kato na participação como suplentes na defesa.

À Universidade Nove de Julho pela oportunidade de estar em um curso de tamanha excelência, cercada de tanto conhecimento e pela bolsa de estudos ofertada.

Aos meus colegas da UNINOVE: Juliana Ricci Hironaka, Cláudio Kassa, Bianca Godoy, Marina, Tânia, Dominique e Pâmela pela parceria, pelas horas de estudo e pelos preciosos momentos de risada e distração.

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram nos experimentos.

Aos funcionários do laboratório de microbiologia da UNINOVE, em especial à Núbia pela constante disposição em me ajudar.

À CAPES pelo financiamento da bolsa para a pesquisa.

## Resumo

A doença periodontal (DP) é uma doença crônica inflamatória altamente prevalente ao redor do mundo, podendo atingir cerca de 10% da população adulta, causada pelo biofilme bacteriano. A terapia antimicrobiana com luz azul (aBLT) baseia-se na interação da luz com fotossensibilizadores endógenos produzidos pelos micro-organismos como as porfirinas livres de metal e flavinas, na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte celular. O objetivo do presente estudo é avaliar o potencial de morte bacteriana induzida pela aBLT e a influência dos meios de cultura BHI (brain heart infusion) e ágar sangue na curva de morte da bactéria periodonto patógena *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Para este trabalho, utilizou-se um LED emitindo em 403 nm  $\pm$  15 com a potência de 1W, irradiância de 588,2 mW/cm<sup>2</sup>, e tempos de irradiação de 0,1,5,10,30 e 60 minutos em 2 diferentes grupos: *A. actinomycetemcomitans* cultivado em BHI e *A. actinomycetemcomitans* em ágar sangue. As placas foram incubadas em microaerofilia, em estufa bacteriológica, com temperatura regulada em 37° C por um período de 48h para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e realizados em triplicata. Espectroscopia e microscopia de fluorescência também foram realizadas para investigar a presença de fotossensibilizadores no interior dos micro-organismos. Resultados: Não houve diferença estatística na fração de sobrevivência das colônias quando *A. actinomycetemcomitans* foi cultivado em diferentes meios de cultura ( $p > 0,05$ ), porém quando o tempo de irradiação atingiu 30 minutos (1,058 J / cm<sup>2</sup>), foi observada redução biológica e estatística dos microrganismos em ambos os meios ( $p < 0,05$ ). O espectro de absorção e a análise por microscopia de fluorescência sugerem a presença de porfirinas endógenas no interior dessas bactérias, independentemente do meio de cultura.

Palavras-chave: Fotossensibilizadores endógenos; terapia antimicrobiana com luz azul; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Periodontite; Porfirinas; LED

## Abstract

Periodontal disease (PD) is a highly prevalent chronic inflammatory disease around the world, affecting approximately 10% of the adult population, caused by bacterial biofilm. Antimicrobial therapy with blue light (aBLT) is based on the interaction of light with endogenous photosensitizers produced by microorganisms, such as metal-free porphyrins and flavins, in the generation of reactive oxygen species (ROS) and cell elimination. The goal of this work is to evaluate the potential of bacterial death by aBLT and the influence of BHI (brain heart infusion) culture media and blood agar on the death curve of the periodontopathic bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. For this work, we used LED emitting at  $403\text{nm} \pm 15$  with 1W of radiant power, the irradiance of  $588,2 \text{ mW} / \text{cm}^2$ , and irradiation duration of 0, 1, 5, 10, 30 and 60 minutes in 2 different groups: *A. actinomycetemcomitans* cultivated in BHI and *A. actinomycetemcomitans* in blood agar. The plates were incubated in microaerophilia, in a bacteriological greenhouse, with a temperature regulated at  $37^\circ \text{C}$  during a period of 48h to count the colony-forming units (CFU / mL) and performed in triplicate. Spectroscopy and fluorescence microscopy were also carried out to investigate the presence of photosensitizers inside the microorganisms. Results: There was no statistical difference in the survival fraction of the colonies when *A. actinomycetemcomitans* was cultivated in different culture media ( $p > 0,05$ ), however when the irradiation time reached 30 minutes ( $1.058 \text{ J/cm}^2$ ), a biological and statistical reduction of microorganisms in both media was observed ( $p < 0,05$ ). The absorption spectrum and the analysis of fluorescence microscopy give indications of the presence of endogenous porphyrins inside these bacteria, regardless of the culture media.

Keywords: Endogenous photosensitizers, antimicrobial blue light, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Periodontitis; Porphyrin; LED



## Lista de Figuras

Figura 1: Representação diagramática da estrutura do biofilme bacteriano extraído de um exame de microscopia de CSL de biofilme de espécies mistas. Fonte: Costerton et al., 1994. ....	18
Figura 2: Diagrama da associação entre micro-organismos em amostras de biofilme subgingival. Fonte: Socranky et al., 1998. ....	19
Figura 3: Figura representativa dos sistemas de aquisição de heme por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos. Fonte: Anzaldi; Skaar, 2010. ....	22
Figura 4: Esquematização da Biossíntese da heme em bactérias. Anzaldi; Skaar, 2010. ....	24
Figura 5: Cromatograma HPLC-MS / MS de porfirinas extraídas de <i>A. actinomycetencomitans</i> . Partes do cromatograma nas caixas estão aumentadas para melhor visualização. Nota-se a presença de Uroporfirina (UP=184 ng/g), Heptacarboxilporfirina (7P = 28 ng/g), Coproporfirina I (CPI=ng/g), Coproporfirina III (CP III=20ng/g) e Protoporfirina IX (PPIX=286 ng/g). Fonte: Fyrestam et al., 2015. ....	26
Figura 6: ilustração esquemática dos mecanismos da aPDT pelo Diagrama de Jablonsky. Fonte: adaptado de <a href="https://i.ytimg.com/vi/5F5rvakvwIk/hqdefault.jpg">https://i.ytimg.com/vi/5F5rvakvwIk/hqdefault.jpg</a> . ....	30
Figura 7: Irradiação com a luz azul produzindo o efeito antimicrobiano via protoporfirina IX. (PpIX) em <i>A. actinomycetencomitans</i> . Fonte: autor. ....	32
Figura 8: Espectro de emissão do Led de 403 nm. Fonte: autor. ....	36
Figura 9: Fluxograma dos grupos experimentais. Fonte: autor. ....	38
Figura 10: foto do LED azul de 403nm $\pm$ 15. Fonte: autor. ....	38
Figura 11: Placa de diluição de 96 poços. Fonte: autor. ....	39
Figura 12: Placas de a) BHI e b) ágar sangue contendo <i>A. actinomycetencomitans</i> após a irradiação com luz azul e o crescimento em estufa a 37°C por 24h. Fonte: autor. ....	40
Figura 13: Microscópio de fluorescência ZOETM, BIO-RAD Laboratories. Fonte: autor. ....	41

Figura 14: Gráfico de absorvância do lisado de *A. actinomycetencomitans* nos meios de cultura BHI e ágar sangue. Fonte: autor. .... 42

Figura 15: Gráfico de fração de sobrevivência com relação ao tempo de irradiação do *A. actinomycetencomitans* com o LED emitindo em 403 nm. Letras diferentes representam diferença significativa. Fonte: autor..... 43

Figura 16: Imagens da microscopia em campo claro (a) e de fluorescência vermelha (b) das colônias de *A. actinomycetencomitans* cultivadas em ágar sangue com aumento de 175x. Fonte: autor..... 45

Figura 17: Imagens da Microscopia em campo claro (a) e de fluorescência vermelha (b) das colônias de *A. actinomycetencomitans* cultivadas em BHI com aumento de 175x. Fonte: autor. .... 45

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Estudos que utilizaram a terapia antimicrobiana com luz azul no micro-organismo <i>A.actinomyctencomitans</i> em estado planctônico. Fonte: autor. ....	33
Tabela 2: Características da fonte de luz e parâmetros utilizados. Fonte: autor. ....	36
Tabela 3: Análise da fração de sobrevivência do micro-organismo <i>A. actinomyctencomitans</i> nos diferentes meios de cultura após exposição a terapia antimicrobiana com luz azul. (Bonferroni). Fonte: autor. ....	44

## Lista de abreviaturas

ALA	Ácido aminolevulínico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>A. actinomycetencomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetencomitans</i>
aBLT	Terapia antimicrobiana com luz azul
BHI	Brain heart infusion
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
ATCC	Coleção de micro-organismos Norte Americana
CP I	Coproporfirina I
CP III	Coproporfirina III
LED	Diodo emissor de luz
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
SDS	Dodecil sulfato sódio
EUA	Estados Unidos da América
°C	Graus Celsius
NaOH	Hidróxido de sódio
h	Horas
J	Joule
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
log	Logaritmo
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatts por centímetro quadrado
min	Minutos
M	Molar
nm	Nanômetros
ROS	Espécie reativa de oxigênio
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
PpIX	Protoporfirina IX
RPM	Rotações por minuto
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
RTX	Toxina de repetição
CDT	Toxina distensora citoletal
TSBV	Tripona de soja
UV	Ultravioleta
UFC	Unidades formadoras de colônia
W	Watt

**SUMÁRIO****Sumário**

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	14
1.1. Bactéria Aggregatibacter Actinomycetencomitans .....	20
1.2. Tratamento Convencional .....	28
1.3. Terapia antimicrobiana com luz azul (aBLT) .....	29
.....	30
1.4. Estado da arte.....	34
1.5. Justificativa.....	34
2. OBJETIVOS .....	35
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos .....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. Fonte de Luz .....	36
3.2. Preparação do inóculo .....	37
3.3. Grupos amostrais e Terapia antimicrobiana com luz azul.....	37
3.4. Espectroscopia.....	39
3.5. Análise microbiológica .....	40
3.6. Microscopia de Fluorescência.....	40
3.7. Análise estatística .....	41
4. RESULTADOS.....	42
5. DISCUSSÃO .....	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	49
7. TRABALHOS FUTUROS .....	50
Referências .....	51

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Desde os primórdios da história da civilização, as doenças gengivais e periodontais afligem os seres humanos. Estudos de paleontologia indicaram através da presença de doença periodontal destrutiva evidenciada pela perda óssea, que civilizações como as do antigo Egito e América pré-colombiana, foram afetados por esta doença. Trabalhos médicos das antigas Índia e China, possuem importantes apontamentos sobre os problemas bucais e periodontais bem como a importância da higiene bucal (NEWMAN, MICHAEL G; TAKEI, HENRY H; KLOKKEVOLD, PERRY R; CARRANZA, 2016).

No mundo clássico o cálculo dental já era descrito como responsável pela inflamação gengival e raspadores ou pequenas limas, eram indicadas para a limpeza dos dentes diariamente. Porém, foi a partir do século XVIII que a odontologia moderna se desenvolveu, essencialmente na França e na Inglaterra. Pierre Fauchard, nascido na Bretanha em 1678, é considerado o pai da profissão de cirurgião-dentista e em seu livro, *O Cirurgião-Dentista*, ele descreve em detalhes os instrumentos periodontais e a técnica de raspagem. Já no século XIX, nos Estados Unidos, John W. Riggs (1811 – 1885) foi a principal autoridade em periodontia e a periodontite chegou a ser conhecida como “doença de Riggs”. Aparentemente ele foi o primeiro dentista que dedicou sua prática clínica exclusivamente a periodontia, podendo ser considerado o primeiro especialista nesta área (NEWMAN, MICHAEL G; TAKEI, HENRY H; KLOKKEVOLD, PERRY R; CARRANZA, 2016).

A partir da segunda metade do século XIX acontecimentos como o descobrimento da anestesia por Horace Wells (1813 – 1848), de Hartford, Connecticut, e por Willian Morton (1819 – 1895), Boston, Massachusetts em que 1846, iniciaram o que passou a chamar-se de *medicina moderna* e que incluiu a Odontologia. O que veio seguir foi o desenvolvimento da anestesia local; a teoria da doença pelo germe, por Louis Pasteur (1822 -1895) e finalmente a descoberta das radiografias, pelo físico alemão Wilhelm Röntgen (1845 – 1923), esta última de crucial importância para a Periodontia e outras áreas da Medicina. Foi também no século XIX que a doença periodontal foi relacionada a presença de bactérias e os princípios de bacteriologia moderna foram introduzidos na Odontologia pelo cirurgião-dentista Willoughby D. Miller (1853 – 1907). Miller

acreditava que a doença periodontal não era causada por bactérias específicas e sim por uma coleção de bactérias localizadas na boca. Esta teoria ficou conhecida como a *hipótese da placa não específica* (NEWMAN, MICHAEL G; TAKEI, HENRY H; KLOKKEVOLD, PERRY R; CARRANZA, 2016).

Løe et al., (1965), comprovaram que quando os procedimentos de higienização oral são removidos, rapidamente ocorre o acúmulo de detritos orais e a composição da flora bucal muda predominantemente de micro-organismos Gram-positivos (cocos e bastonetes) para uma flora proeminentemente Gram-negativa (p.ex. espiroquetas, cocos Gram-negativos, bactérias filamentosas). Após um período que variou entre 10 a 21 dias, todos os indivíduos envolvidos no estudo desenvolveram alterações clínicas e na contagem microscópica de leucócitos, não deixando dúvidas de que as bactérias da placa são essenciais no desenvolvimento da inflamação gengival (LOE; THEILADE; JENSEN, 1965).

Nos anos que viriam a seguir, a ciência então, considerava que a simples presença da placa bacteriana e a deficiência na higiene oral eram as principais causas do desenvolvimento da doença periodontal (LOE; THEILADE; JENSEN, 1965; SOCRANSKY, 1970). Porém, estes achados já davam pistas aos pesquisadores sobre as diferenças no padrão de resposta individuais, denominado na época de “resistência do hospedeiro”. Começou-se a indagar o porquê de certos indivíduos, mesmo mantendo um pobre padrão de higienização oral, não desenvolverem a doença de forma mais avançada, sendo que outros, apesar de boas condições de higiene e colaboração no tratamento da doença, continuavam a sofrer com a destruição periodontal (NEWMAN, MICHAEL G; TAKEI, HENRY H; KLOKKEVOLD, PERRY R; CARRANZA, 2016).

A doença periodontal é uma doença destrutiva dos tecidos gengivais e de suporte dos dentes (osso e ligamentos periodontais) e é induzida pelo biofilme dental. Apesar do biofilme exercer um importante papel na etiologia da doença periodontal, a patogênese de doenças complexas como a periodontite é mediada pela resposta inflamatória e imunológica do indivíduo frente as bactérias do biofilme (CEKICI et al., 2014; HASAN; PALMER, 2014).

A imunidade periodontal, que contempla respostas celulares (aonde as moléculas de reconhecimento ficam aderidas às membranas dos linfócitos T) e humorais (Imunoglobulinas) inatas e adaptativas, colocadas em conjunto com a microbiota local residente, visam controlar os micro-organismos patógenos

invasores. Porém bactérias periodonto patógenas e vírus como o Citomegalovírus humanos e o vírus Epstein-Barr com seus mecanismos de defesa interrompem as reações imunológicas do hospedeiro. A detecção e a quantificação de bactérias periodonto patógenas são de extrema importância na identificação de indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento da doença periodontal, mas a busca por encontrar fatores etiológicos adicionais é ampla e alguns vírus do grupo da herpes tem se mostrado presentes e associados com maiores prevalências das bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (SHARMA et al., 2015; SLOTS, 2017).

A placa dentária permanece estável por um longo período devido a homeostase microbiana, porém a interrupção desta homeostase gera um desequilíbrio da microbiota subgingival, o aumento no número de espécies periodontopatógenas em locais que começam a sofrer da doença (FONTANA et al., 2015; SOCRANSKY, SIGMUND S., HAFFAJEE, 2005). Em indivíduos susceptíveis, a resposta inflamatória aguda falha no processo de defesa do organismo. Em indivíduos mais velhos a inflamação crônica, de longa duração, pode levar a indução de células T ou B, estresse oxidativo e senescência celular, danos ao DNA levando a imunodeficiência e a infecções secundárias (SLOTS, 2017).

As células epiteliais que cobrem a mucosa oral estão frequentemente expostas aos ataques bacterianos e sua função é impedir que esses patógenos alcancem tecidos mais profundos. A interação entre essas células e as bactérias periodontais é fator determinante para o sucesso ou fracasso da colonização e na manutenção da saúde ou progressão da doença no hospedeiro. Essa interação, quando em equilíbrio, pode resultar em uma coabitação estável. Caso, por exemplo, ocorra um aumento na carga bacteriana ou um desequilíbrio no mecanismo de resposta imunológica, a doença periodontal pode ser iniciada (AMANO, 2007; LAMONT, 2010). Estimulada pela ação das bactérias da placa e mediada por neutrófilos e por inflamação crônica, inicia-se a degradação da matriz extracelular e a reabsorção óssea. O sistema imunológico na intenção de proteger, causa os danos teciduais responsáveis pela manifestação clínica da doença (FONTANA et al., 2015; NEWMAN, MICHAEL G; TAKEI, HENRY H; KLOKKEVOLD, PERRY R; CARRANZA, 2016).

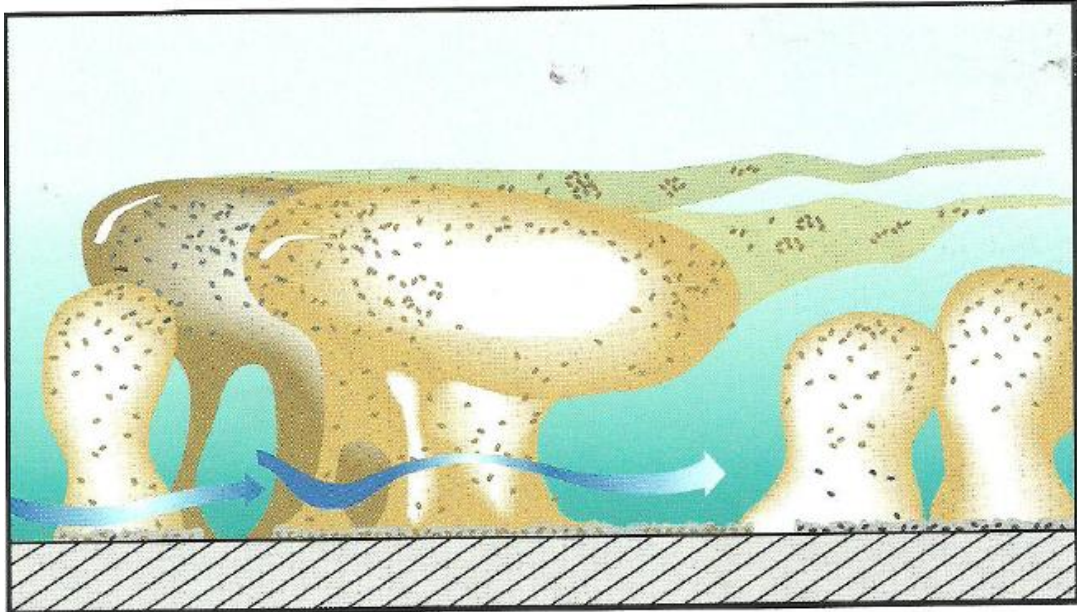


O paradigma aceito a tanto tempo de que, à medida que a doença periodontal se desenvolve, ocorre uma alteração na microbiota oral, inicialmente formada por micro-organismos Gram-positivos aeróbios em uma microbiota Gram-negativa anaeróbia, têm sido questionados por alguns autores. As Bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *T. forsythia* poderiam ser isoladas em biofilmes de pacientes controle saudáveis assim como a bactéria Gram-negativa *Veillonella* em periodontos saudáveis e o *Filifactor alocis* um micro-organismo Gram-positivo, associado a quadros de doença. Contrariando o conceito de que existe uma dominância de bactérias Gram negativas na periodontite, bactérias anaeróbias Gram positivas podem estar em número aumentado em sítios doentes comparativamente a locais saudáveis e em maior número que as bactérias Gram negativas (LAMONT, 2010).

Pesquisas relacionadas ao biofilme, trabalham com o conceito de disbiose ou deslocamento microbiano, aonde a diminuição do número de micro-organismos benéficos levaria a um aumento no número de patógenos. Esta disbiose pode ocorrer por um longo período alterando gradualmente a relação simbiótica entre o hospedeiro e o micro-organismo, podendo levar ao desenvolvimento da doença (NATH; RAVEENDRAN, 2013).

A formação da placa bacteriana ou biofilme, inicia-se com a aderência de bactérias à película adquirida chamados de colonizadores iniciais. Estes, possuem receptores que criam condições para a co-adesão de novas bactérias, denominadas colonizadores secundários, predominantemente Gram-negativos que se organizam em micro colônias. Observa-se o aumento da massa de placa permitindo que micro-organismos sem capacidade de adesão sejam agrupados ao biofilme por um mecanismo de agregação (COSTERTON et al., 1994). A figura 1 apresenta a representação esquemática do biofilme bacteriano maduro descrita por Costerton et al, 1994.

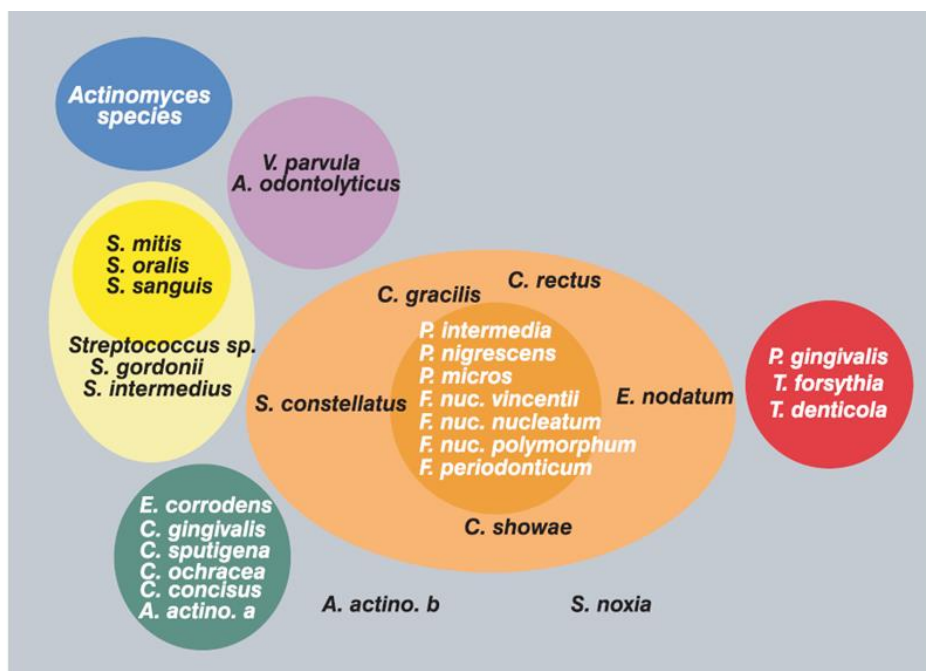
Figura 1: Representação diagramática da estrutura do biofilme bacteriano extraído de um exame de microscopia de CSL de biofilme de espécies mistas. Fonte: Costerton et al., 1994.



Este agrupamento, onde cada espécie interage com parceiros específicos, foi descrito através de cinco complexos bacterianos. Os complexos púrpura, amarelo e verde reúnem espécies presentes na colonização inicial do biofilme. As bactérias do complexo laranja que aderem por co-adesão estão associadas a doença periodontal. Este é composto por bactérias Gram-negativas anaeróbias como a *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *P. micros* e *Fusobacterium nucleatum*. Conforme ocorre a progressão do quadro de doença, observa-se a formação do complexo vermelho, que comporta patógenos periodontais chamados na literatura de patógenos-chave. Entre eles estão a *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticula*.

A *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* não está presente no complexo vermelho, porém, por sobreviver em microaerofilia na região subgingival, atuando na degradação de tecido de suporte, também é considerada uma bactéria peridontopatogena (NATH; RAVEENDRAN, 2013; SCAPOLI et al., 2015; SOCRANSKY et al., 1998). Estes complexos bacterianos foram representados por Socransky et al., 1998 estão na figura 2.

Figura 2: Diagrama da associação entre micro-organismos em amostras de biofilme subgingival. Fonte: Socranky et al., 1998.



A percepção do que é saúde e o que é doença mudou com o passar dos tempos conforme a humanidade adquiriu maiores conhecimentos científicos e de acordo com os nossos juízos de valor culturais, sociais e individual. Para definir um conjunto de doenças periodontais cuja etiologia é de difícil explicação, um caminho interessante pode ser a caracterização do que é saúde periodontal e quais fatores podem realmente afetá-la. Em 2014, a American Health Association aprovou a resolução 97H-2014, aonde afirma que “a saúde oral é uma condição funcional, estrutural, estética, fisiológica e psicossocial de bem estar e é essencial para a saúde geral do indivíduo e da sua qualidade de vida” (BUSET et al., 2016; MARIOTTI; HEFTI, 2015; YOSHIDA et al., 2017).

A doença periodontal é a segunda doença oral em importância e contribui com a carga global de doenças crônicas. A periodontite está associada a infecções extraorais como as endocardites infecciosas. Em 3% dos casos de endocardite, ela aparece associada a presença da bactéria *A. actinomycetemcomitans* e a abscessos em diferentes partes do corpo. Estudos com amostras representativas apontam taxas de prevalência de doença periodontal que podem variar de 5,5% até 85,1% entre indivíduos adultos, a depender dos critérios clínicos de diagnóstico e a severidade da doença periodontal. Em países desenvolvidos como a Suécia, a melhora nas condições

de saúde bucal resultou em um menor número de pessoas desdentadas e consequentemente indivíduos mais velhos com mais dentes. Porém, 10% da população adulta sofre de doença periodontal grave (CIEPLIK et al., 2014; FERREIRA et al., 2017; JANSSON et al., 2014; PETERSEN; OGAWA, 2012).

Pesquisas apontam que quanto maior a extensão e o grau de comprometimento bucal causado pelas doenças periodontais (gingivite e periodontite), maior o impacto negativo na qualidade de vida das pessoas. Quadros mais severos com grandes perdas de inserção clínica e que afetam função e estética, parecem influenciar também em aspectos psicológicos, sociais e físicos na população afetada por estas doenças (BUSET et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; JANSSON et al., 2014).

### 1.1. Bactéria *Aggregatibacter Actinomycetencomitans*

A *Aggregatibacter actinomycetencomitans* é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa, pequena e imóvel em forma de bastonete. Atualmente são reconhecidos seis sorotipos de *A.actinomycetencomitans* (a-f) com base em diferenças estruturais e antigênicas, sendo o sorotipo b (clone JP2) fortemente associado a formas agressivas e localizadas da doença periodontal. A presença da *A.actinomycetencomitans* não está associada a gengivite e aparece em cerca de 10% apenas dos casos de periodontite crônica (DAMGAARD et al., 2017; HENDERSON; WARD; READY, 2010a). Adicionalmente, a *actinomycetencomitans* faz parte dos micro-organismos HACEK (*Haemophilus spp.*, *A. actinomycetencomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella spp*), associadas a doenças sistêmicas como a endocardite bacteriana, sendo responsáveis por até 3% dos casos dessa doença (BJURSHAMMAR et al., 2012; CIEPLIK et al., 2014).

A forma agressiva e de rápida progressão da periodontite é responsável pela destruição dos tecidos de suporte ao redor dos dentes, podendo levar ao edentulismo precoce. Sua prevalência é normalmente menor que 1%, afetando pacientes jovens, de países em desenvolvimento e costuma variar bastante de acordo com o grupo racial, sendo que as minorias afro-americanas e asiáticas apresentam 15 vezes maior incidência que a população caucasiana (HENDERSON; WARD; READY, 2010a; SCAPOLI et al., 2015). A inclusão da

*A. actinomycetencomitans* na lista dos principais agentes etiológicos da doença periodontal, baseia-se em estudos de prevalência em pessoas saudáveis e com doença periodontal; na presença de determinantes de virulência bacteriana com potencial para a promoção da doença e na presença ou ausência de anticorpos circulantes em grupos doentes e grupos saudáveis. No entanto, mais recentemente, métodos moleculares têm alterado a maneira de compreensão da microbiota presente em regiões saudáveis e com doença periodontal. Tais estudos mostram que possivelmente nem todas as cepas da *A. actinomycetencomitans* são igualmente patogênicas, e o papel que outras bactérias possuem quando combinadas com a *A. actinomycetencomitans*, ou seja, com quais outras bactérias ela coopera, necessita ser determinado para a compreensão deste micro-organismo na patologia da doença (HENDERSON; WARD; READY, 2010a)

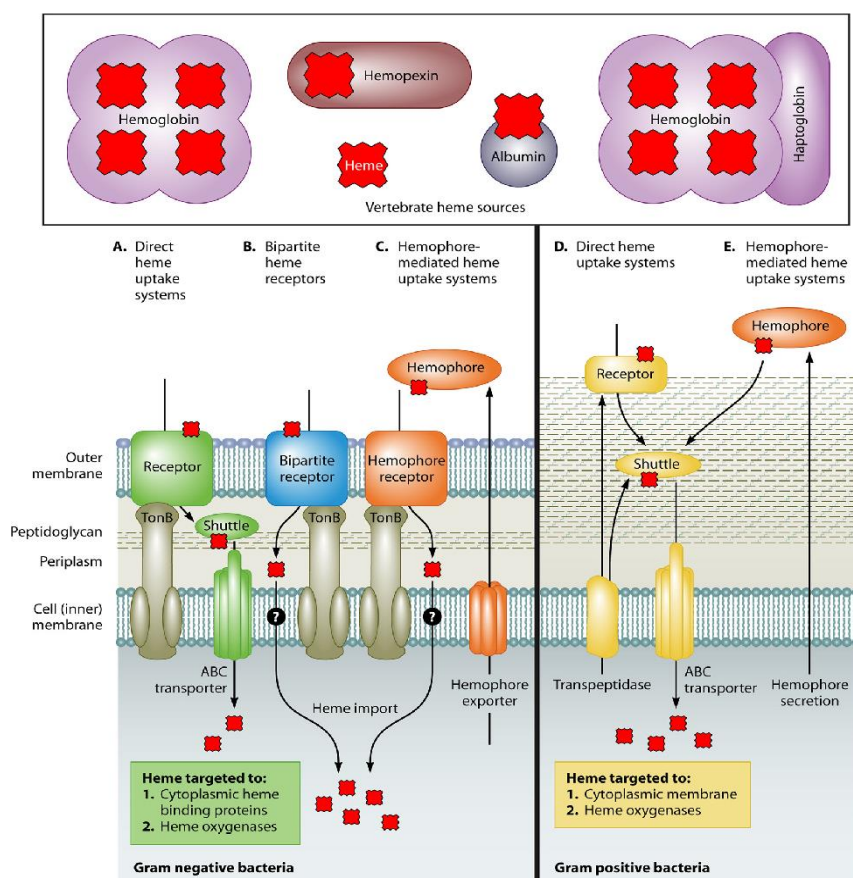
*A. actinomycetencomitans* possui diversos mecanismos de virulência como a produção de leucotoxina LtxA (um exemplo de toxina de repetição RTX), toxina CDT (toxina distensora citoletal) e uma terceira chamada CagE. Porém não está claro se estas toxinas interagem diretamente com os tecidos ósseos e periodontais dado que outras bactérias da microbiota oral e não oral também expressam essas toxinas e não são associadas a periodontite de rápida progressão. A falta de modelos apropriados deste tipo de periodontite é um problema no estudo desta forma da doença. O genoma JP2 do *A. actinomycetencomitans* (HK1651) foi sequenciado através do método de homologia de sequência e descobriu-se que ele possui 2.205.303 pares de bases, aonde 27% dos genes codificam proteínas sem função conhecida, mas homólogas em outras espécies bacterianas. Destes 27%, 5% são exclusivos desta cepa JP2. Esta análise de homologia de genes codificadores de proteínas revelou a similaridade desta cepa com a espécie *Haemophilus spp.* (HENDERSON; WARD; READY, 2010b; NAJAR FZ, LIN S, SONG L, LAI H, WHITE J, KENTON S, 2009)

Todos os seres vivos necessitam de íons metálicos em sua sobrevivência. A absorção do ferro é necessária para o crescimento bacteriano, como componente essencial no transporte de elétrons e como cofator indispensável para várias enzimas. Para as bactérias patogênicas o ferro é um nutriente essencial para causar a doença em seus hospedeiros. Nos humanos e nos

animais, o ferro encontra-se ligado a proteínas como a transferrina e a lactoferrina e *A. actinomycetencomitans* não possui quelantes de ferro, denominados de sideróforos detectáveis que se liguem a transferrina humana, sugerindo que esta bactéria obtenha esse nutriente por meios independentes de sideróforos (ANZALDI; SKAAR, 2010; GRABER; SMOOT; ACTIS, 1998; GRENIER, DANIEL; LEDUC, ANNIE; MAYRAND, 1997).

Pelo fato de o ferro férrico ser insolúvel em água, é necessário que proteínas especializadas na condução para o meio intracelular estejam presentes nos micro-organismos. Nos vertebrados a forma mais abundante de ferro está ligado a um anel de porfirina como ferriprotoporfina IX (heme). A figura 3 representa os sistemas de aquisição de heme por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos, utilizando a hemoglobina, hemopexina, heme-albumina e hemoglobina-haptoglobina (ANZALDI; SKAAR, 2010).

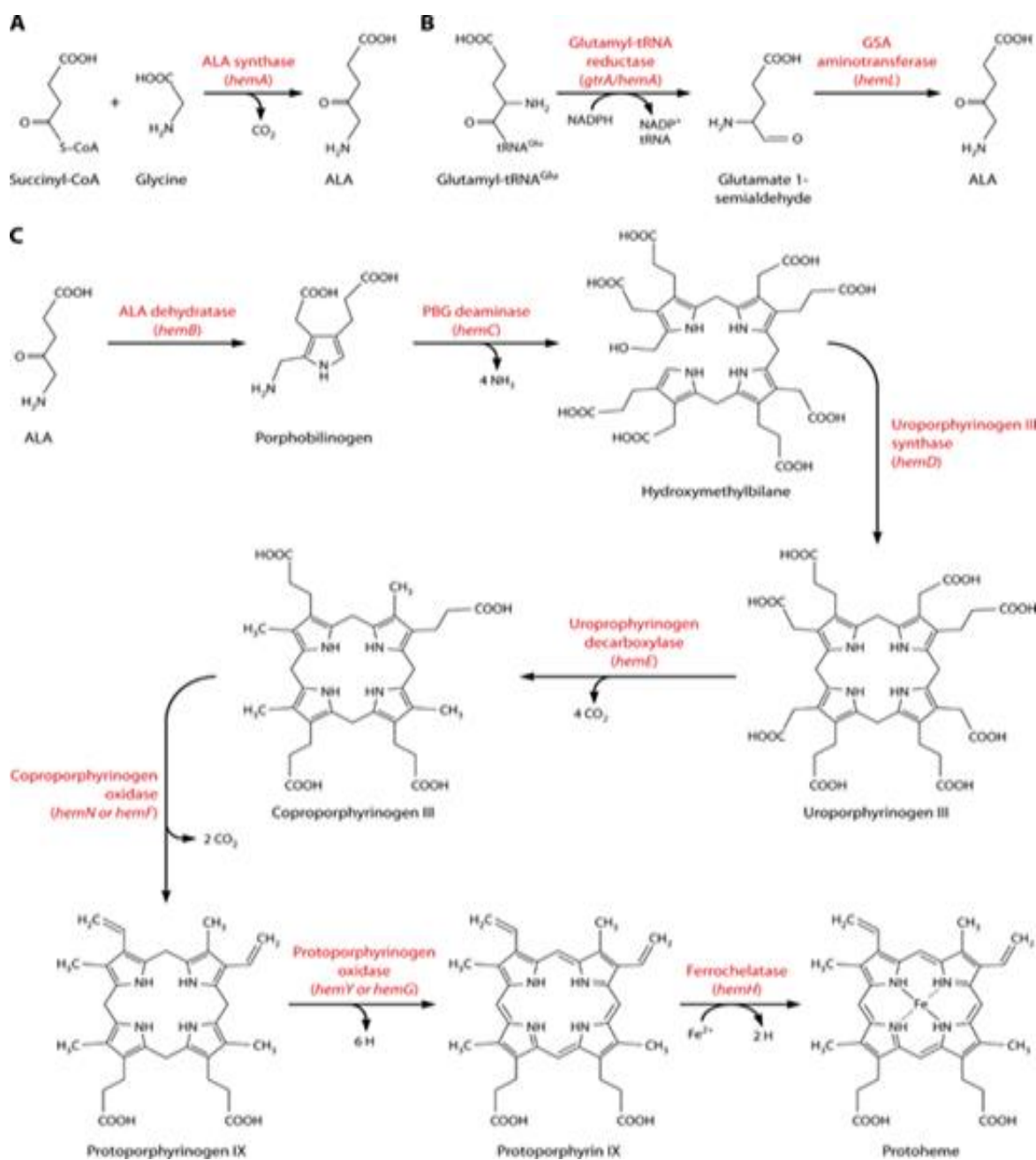
Figura 3: Figura representativa dos sistemas de aquisição de heme por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos. Fonte: Anzaldi; Skaar, 2010.



Os mamíferos desenvolveram mecanismos de diminuir a disponibilidade do íon ferro nos fluídos corporais como forma de defesa, porém as bactérias

combateram este sistema de defesa com a evolução das proteínas de ligação e dos sistemas de absorção do ferro, considerados fenótipos de virulência. Pesquisas demonstram que *A. actinomycetencomitans* possui genes homólogos às proteínas de ligação hgpABC do *Haemophilus influenzae* que se ligam a hemoglobina e haptoglobina, além de genes envolvidos na adesão bacteriana. Proteínas ligantes à heme - AfuA (homóloga ao HitA da *H. influenzae* e FbpA da *Neisseria meningitidis*), e proteínas de ligação de ferro que se ligam a lactoferrina humanas também foram demonstrados nestas pesquisas. As proteínas da membrana externa destas bactérias possuem um papel importante na penetração dos tecidos moles, diminuição da circulação de leucócitos pela produção de leucotoxina LtxA e inibição na proliferação de fibroblastos. O Heme em altas concentrações torna-se tóxico pelo seu alto potencial redox, tendo sua biossíntese regulada através de um mecanismo de feedback negativo (GRABER; SMOOT; ACTIS, 1998; HENDERSON; WARD; READY, 2010b; MOSLEMI et al., 2014). A figura 4 mostra o esquema da biossíntese da heme em bactérias.

Figura 4: Esquemática da Biossíntese da heme em bactérias. Anzaldi; Skaar, 2010



O primeiro precursor da heme é o ALA (ácido-aminolevulínico). O ALA pode ser sintetizado por duas vias. (A) Succinil-CoA e glicina são convertidos em ALA pela ALA sintase (hemA,) porém hemA só foi identificado em Alphaproteobacterias. (B) A maioria das bactérias sintetizam o ALA pela via partindo do glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> pela via C5 utilizando GtrA e HemL. (C) A ALA desidratase (hemB) sintetiza o porfobilinogênio (PBG) a partir de duas moléculas



de ALA. PGB desaminase (hemC) converte quatro moléculas de PGB em hidroximetibilano. O hidroximetibilano linear é fundido em um anel pela uroporfirinogênio III sintase (hemD) para formar o uroporfirinogênio III. Quatro grupos carboxila são removidos pela uroporfirinogênio descarboxilase (hemE) formando o coproporfirinogênio III. Em seguida, HemN (coproporfirinogênio oxidase – independente de oxigênio), ou HemF (dependente de oxigênio), converte o coproporfirinogênio III em protoporfirinogênio IX. O protoporfirinogênio IX é então oxidado a protoporfirina IX seja por HemG (O<sub>2</sub> independente) ou por Hemy (O<sub>2</sub> dependente). Finalmente, a protoporfirina IX é convertida em protoheme pela quelação do íon ferroso no centro do anel porfirínico. Este protoheme pode ser utilizado diretamente ou modificado posteriormente antes de ser usado como um grupo protético em hemoproteínas (ANZALDI; SKAAR, 2010).

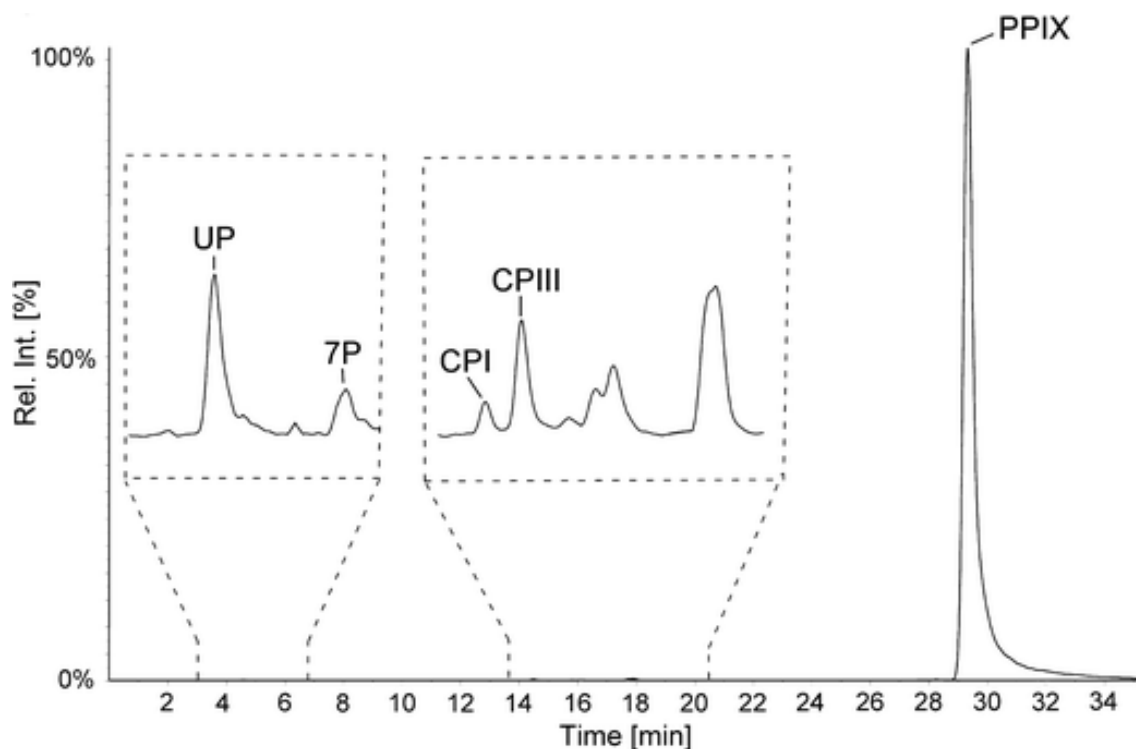
Uma das primeiras evidências de que um micro-organismo é capaz de produzir porfirinas endógenas e sofrer fotoinativação foi no ano de 1997 quando, van der Muller et. Al., utilizaram o ácido aminolevulínico (ALA) em *Haemophilus paraenfluenzae* e depois irradiaram com luz no comprimento de onda de 630 nm. Os autores alcançaram resultados “substanciais” na morte destes micro-organismos (VAN DER MEULEN et al., 1997)

Cieplik et al., 2014, sugerem que *A. actinomycetencomitans*, possui substâncias endógenas capazes de agir como fotossensibilizadores, com capacidade de geração de oxigênio singlete que leva o micro-organismo ao stress oxidativo e morte, quando iluminadas com luz azul. Neste estudo, *A.actinomycetencomitans* foi cultivado em caldo de infusão cérebro coração (BHI) por uma noite para obtenção das bactérias em fase estacionária, e utilizados para os experimentos de iluminação e lise. Através de medições espectroscópicas eles demonstraram a absorção e emissão da *A. actinomycetencomitans* lisado eram semelhantes com as substâncias flavina e porfirina (CIEPLIK et al., 2014).

A influência das condições e tempo de cultivo, número de passagens e adição de sangue ao meio de cultura na produção de diferentes perfis de porfirina pelos micro-organismos *A. Actinomycetencomitans* e *Porphyromonas gingivalis* foi estudado pelo grupo de Fyrestam et al. (2017). A hipótese levantada era de que a mudança nestas condições *in vitro* nos estudos com terapia fotodinâmica

antimicrobiana, produziram resultados diferentes, e que a comparação entre eles depende de protocolos mais padronizados. Em estudo anterior, os autores demonstraram pela primeira vez, através de um método quantitativo e seletivo (cromatografia líquida de alta eficiência) a presença de Uroporfirina, Coproporfirina I, Coproporfirina III, Heptacarboxilporfirina I e Protoporfirina IX em *A. actinomycetecomitans* (FYRESTAM et al., 2015). A figura 5 mostra o cromatograma HPLC-MS/MS de porfirinas extraídas de *A. actinomycetecomitans* com 7 dias de cultivo em ágar Columbia com 5% de sangue de cavalo defibrinado.

Figura 5: Cromatograma HPLC-MS / MS de porfirinas extraídas de *A. actinomycetecomitans*. Partes do cromatograma nas caixas estão aumentadas para melhor visualização. Nota-se a presença de Uroporfirina (UP=184 ng/g), Heptacarboxilporfirina (7P = 28 ng/g), Coproporfirina I (CPI=ng/g), Coproporfirina III (CPIII=20ng/g) e Protoporfirina IX (PPIX=286 ng/g). Fonte: Fyrestam et al., 2015.



Fyrestam et al. (2017) sugerem nos resultados de seu trabalho que *A. actinomycetecomitans* e *Porphiromonas gingivalis*, utilizam a heme de seus arredores e da hemoglobina presente no ágar Columbia como fonte de ferro. Novamente, através de análise de cromatograma HPLC-MS/MS (espectrometria de massa tandem), eles demonstraram a presença de intermediários da biossíntese da heme como a Coproporfirina I, Coproporfirina III e a Protoporfirina IX. Houve diferenças expressivas nas quantidades dos padrões de porfirina

expressados por *A.actinomycescomitans* quando este foi incubado em diferentes momentos do crescimento. Coproporfirina III, Protoporfirina IX e Coproporfirina I foram detectados no terceiro dia com 80%, 16% e 4%, respectivamente, do teor de porfirina total molar. Com maiores tempo de cultivo o perfil de porfirina mudou. No nono dia a Protoporfirina IX representou o total de 85%, Coproporfirina III 15% enquanto Coproporfirina I ficou abaixo do limite de quantificação. Com relação ao conteúdo de heme, as bactérias investigadas acumularam esta molécula de forma exponencial durante o crescimento. Portanto, os autores concluíram no caso da *A.actinomycescomitans* que a subcultura, o tempo de incubação e o número de passagens impactam fortemente o teor de porfirina total molar bacteriano quando o micro-organismo possui as enzimas necessárias para a biossíntese do heme endogenamente, visto que não se conhece vias sintéticas capazes converter o heme em Coproporfirina I e III. Isto influenciaria demasiadamente os resultados de estudos que utilizam fotossensibilizadores endógenos, especialmente Protoporfirina IX (FYRESTAM et al., 2017; HAMBLIN et al., 2005).

Uma melhor compreensão de como *A.actinomycescomitans* e outras bactérias sintetizam e adquirem heme deve ser alcançada. Se este micro-organismo prefere sintetizar heme ou captar do meio ainda é desconhecido. Uma hipótese é de que o micro-organismo capaz de síntese escolha a forma energeticamente mais favorável de aquisição do ferro. A extração da heme da molécula de hemoglobina por exemplo, é energeticamente difícil para os micro-organismos. Supõem-se que quando em ambientes ricos em ferro, as bactérias capazes sintetizam o heme, mas, quando em ambientes pobres em ferro, adquirem do meio externo (ANZALDI; SKAAR, 2010; FYRESTAM et al., 2017)

Bjurshammar et al. (2012), mostrou que *A. actinomycescomitans* é capaz de emitir fluorescência na região espectral vermelha quando cultivada em substratos de ágar Columbia. O objetivo principal do estudo foi investigar as propriedades de fluorescência deste micro-organismo e se essas propriedades se relacionam com o crescimento, a morfologia e o tamanho das colônias. Até então, os estudos de fluorescência vermelha eram correlacionados a “características intrínsecas de biofilmes maduros” pela presença de anaeróbios obrigatórios como a *Prevotella intermedia* e a *Porphyromonas gingivalis*. Neste

trabalho, a *A.actinomyctencomitans* foi cultivada por até 12 dias em dois meios de cultura diferentes, o ágar TSBV um substrato sem eritrócitos, e ágar Columbia com 5% de sangue de cavalo. Apesar de não ser o objetivo da pesquisa, os autores sugerem a presença de porfirinas em *A.actinomyctencomitans* apenas na presença de eritrócitos no substrato. (BJURSHAMMAR et al., 2012).

## 1.2. Tratamento Convencional

O tratamento periodontal é dividido em etapas e varia de acordo com as diferentes formas da doença. A primeira etapa é denominada terapia básica, e inclui a orientação de higiene oral, remoção do biofilme supra e subgingival utilizando-se raspadores universais ou instrumentos ultrassônicos. A escovação não orientada parece não ser capaz de tratar problemas como a gengivite, porém quando a associação de orientação de técnicas de higienização e uma única sessão de profilaxia profissional é realizada, efeitos positivos na redução de inflamação gengival podem ser notados. A raspagem e alisamento coronaradicular visam a remoção do biofilme e do cálculo, sendo que pesquisas mostram uma menor perda de substância e menos rugosidades radiculares com o uso de ultrassom além da maior rapidez no procedimento, no entanto, em bolsas profundas ele parece não ser tão efetivo. A terapia cirúrgica é indicada no acesso de regiões que persistem com os sinais clínicos da doença na tentativa de facilitar o acesso a raspagem e melhorar a higienização por parte do paciente. (DENTINO et al., 2013; PLESSAS, 2014).

Os antibióticos sistêmicos começaram a ser utilizados na década de 70 em associação as raspagens radiculares no tratamento da Doença Periodontal especialmente em pacientes com a doença em sua forma mais avançada, e em casos associados a fatores de risco como o fumo e diabetes, pois os benefícios alcançados da terapia manual isoladamente não eram mantidos a longo prazo.

A antibioticoterapia sistêmica pode apresentar um benefício adicional em conjunto com a raspagem e alisamento radicular nos casos de periodontites mais agressivas, com bolsas muito profundas, periodontites recorrentes ou com perfis microbiológicos específicos; podendo proporcionar maiores ganhos de inserção clínica e redução nas profundidades de sondagem em comparação com a raspagem e alisamento radicular isoladamente (HERRERA et al., 2012).

Monteiro *et al.* (2013), investigaram através de questionário aplicado a cirurgiões dentistas que realizam tratamento de pacientes com periodontite, em quais situações clínicas o uso de antibioticoterapia sistêmica era indicado por eles. O estudo concluiu que uma grande quantidade de profissionais indicava o uso dos antibióticos sistêmicos de forma incoerente, quando seu uso não possui indicação e com protocolos ineficientes.

Um exemplo é o fato de que 99% dos entrevistados receitavam antibióticos sistêmicos nos casos de abscessos periodontais localizados, a despeito da literatura mostrar que apenas uma pequena porção dos abscessos evoluem para complicações sistêmicas como linfadenopatia, febre, prostração e sensação de mal-estar. Como consequência do uso indiscriminado dos antibióticos sistêmicos no tratamento de problemas de origem periodontal, cepas de micro-organismos mais resistentes ao uso, por exemplo, de amoxicilina em associação ao metronidazol, podem ser encontradas em pacientes com periodontite crônica (MONTEIRO *et al.*, 2013).

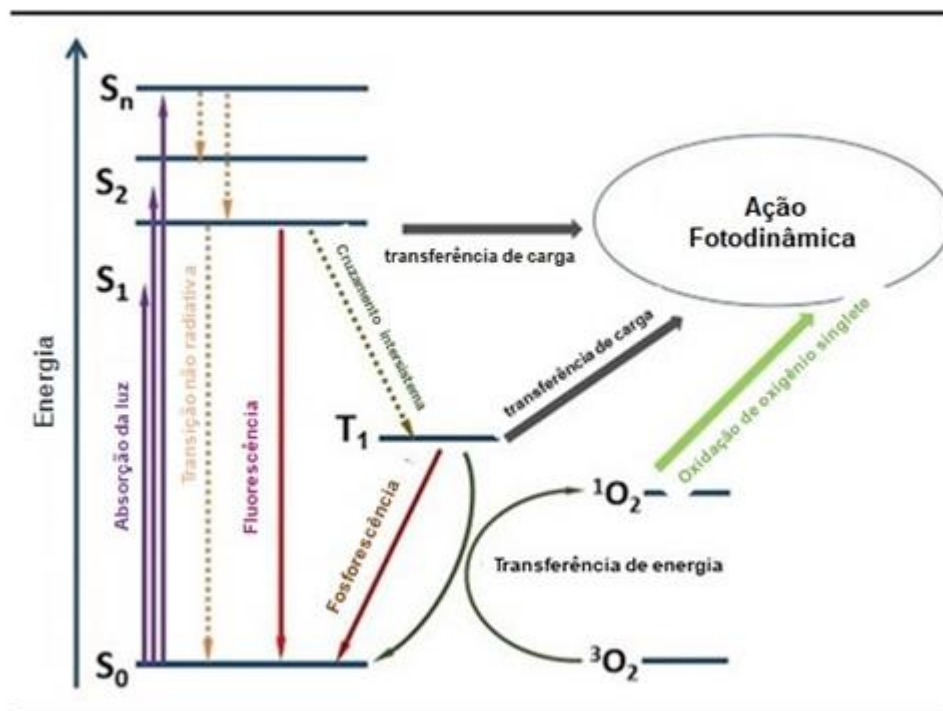
A última etapa do tratamento convencional da doença periodontal é a terapia de manutenção ou controle, para os reforços nas orientações de higiene bucal e remoção do biofilme supra e subgingival, na tentativa de evitar a recorrência da doença.

### 1.3. Terapia antimicrobiana com luz azul (aBLT)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem se mostrado eficiente em micro-organismos resistentes a tratamentos com antibióticos (SOUKOS; GOODSON, 2011). Na aPDT, uma molécula de fotossensibilizador exógena é iluminada por uma luz com determinado comprimento de onda do espectro visível. Esta molécula em seu estado singlete fundamental, absorve um fóton e passa para um estado singlete excitado. Esta molécula pode perder energia por processos não radiativos e/ou retornar ao seu estado fundamental emitindo um fóton (fluorescência) ou, através do cruzamento inter sistemas passar para um estado triplete excitado. O fotossensibilizador pode retornar então ao seu estado fundamental por meios radiativos (fosforescência), não radiativos, ou na presença de oxigênio, produzir dois diferentes tipos de reação, tipo I e tipo II. Na reação do tipo I o fotossensibilizador transfere elétrons formando radicais livres

ou espécies reativas de oxigênio (ROS) como por exemplo, o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Na reação tipo II, o fotossensibilizador transfere energia ao oxigênio molecular e há a formação do oxigênio singlete que costuma ser considerado a espécie que mais causa danos na aPDT (FYRESTAM et al., 2017; KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES, RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI, 2017; SOUKOS; GOODSON, 2011). Estes mecanismos foto físicos são descritos na figura 6 no Diagrama de Jablonsky.

Figura 6: ilustração esquemática dos mecanismos da aPDT pelo Diagrama de Jablonsky. Fonte: adaptado de <https://i.ytimg.com/vi/5F5rvakvwk/hqdefault.jpg>.



Uma maior amplitude na utilização da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) parece encontrar barreiras na falta de fotossensibilizadores antimicrobianos altamente eficazes com aprovação clínica. Os corantes de azul de metileno e azul de toluidina, são os únicos fotossensibilizadores amplamente utilizados em terapia fotodinâmica antimicrobiana, mas encontram barreiras em alguns tipos de micro-organismos

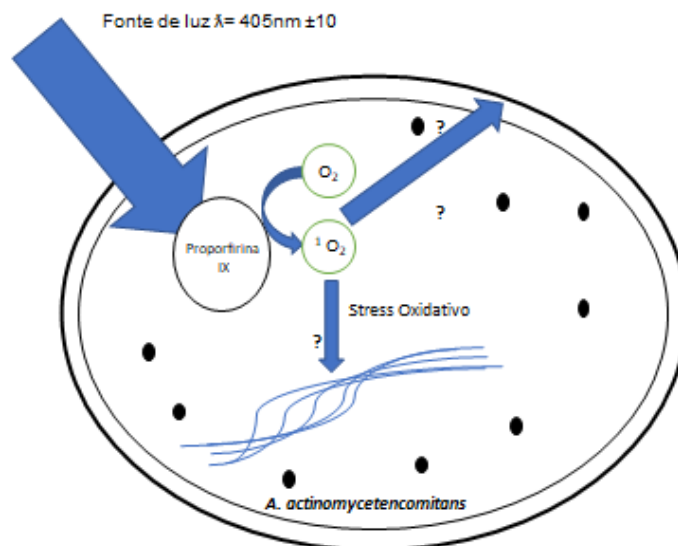
e da localização anatômica da infecção a ser tratada (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).

As pesquisas que abrangem a terapia antimicrobiana com luz azul (aBLT) são relativamente recentes pois, acreditava-se que o que era gerado por quartzo, vapor e mercúrio era na verdade Ultravioleta, visto que a aplicação germicida desta fonte já era amplamente estudada. Niels Ryberg Finsen ganhou o Prêmio Nobel de Medicina em 1903 ao utilizar a lâmpada Finsen no tratamento de diversas doenças, sendo utilizada até metade do século XX. Hoje sabe-se que ela gerava luz no espectro visível azul-violeta e não era uma fonte “UV artificial”. Com o passar do tempo, o conhecimento de que a luz UV possui uma forte tendência carcinogênica, pode causar envelhecimento e danos dermatológicos, bem como o advento dos lasers e Leds, despertaram o interesse no desenvolvimento de pesquisas sobre o efeito germicida da luz azul-violeta (ENWEMEKA et al., 2021).

O crescimento descontrolado de bactérias resistentes a diversos tipos de drogas tem levado os pesquisadores a buscar alternativas de tratamento antimicrobiano ao qual os micro-organismos não desenvolvam resistência com facilidade. A abordagem da terapia antimicrobiana com luz azul (aBLT) tem atraído atenção devido ao seu efeito antimicrobiano intrínseco, sem a utilização de fotossensibilizadores exógenos.

O mecanismo de ação da terapia antimicrobiana com luz azul ainda não está bem estabelecido na literatura atual. Uma hipótese frequentemente abordada é a de que a luz azul leva o micro-organismo a um processo de autofotossensibilização através de fotossensibilizadores endógenos (porfirinas livres de ferro e flavinas) o que leva a produção de espécies citotóxicas de oxigênio (DAI, 2017; PUMMER et al., 2017; WANG et al., 2017). A figura 7 representa a ação da absorção da luz azul pela bactéria *A actinomycetencomitans* causando o estresse oxidativo e os possíveis danos ao DNA e parede celular, levando a morte microbiana.

Figura 7: Irradiação com a luz azul produzindo o efeito antimicrobiano via protoporfirina IX. (PpIX) em *A. actinomycetencomitans*. Fonte: autor.



A terapia antimicrobiana com luz azul pode ser realizada com diversos dispositivos. Entre eles estão a radiação com laser monocromático, radiação quase-monocromática de diodos emissores de luz, diodos super-luminescentes, lâmpadas isoladas com monocromadores ou filtros ópticos e também por luz de banda larga de lâmpadas azuis, sendo que a fotoinativação é equivalente entre eles no comprimento de onda de 405 nm (PLAVSKII et al., 2018).

A eficiência da aBLT já foi demonstrada em diversos estudos e em diferentes espécies microbianas, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, micobactérias, fungos, leveduras e dermatófitos, e apesar das diferentes condições em que foram realizados, a maioria dos micróbios estudados têm se mostrado sensíveis a terapia antimicrobiana com luz azul (DAI; WANG, 2018).

Com relação ao micro-organismo *A. actinomycetencomitans* em seu estado planctônico e o efeito da aBLT, três estudos foram encontrados na literatura sendo que foram obtidos diferentes resultados de inativação. A tabela 1 mostra os parâmetros, condições de cultura e os resultados encontrados nestes estudos (CIEPLIK et al., 2014; JIANG et al., 2015; SONG et al., 2013).



Tabela 1: Estudos que utilizaram a terapia antimicrobiana com luz azul no micro-organismo *A.actinomyctencomitans* em estado planctônico. Fonte: autor.

Fonte de luz	Parâmetros dosimétricos	Condições de cultura	Eficiência na inativação	Referência
Lâmpada halógena 400 - 520 nm	I: 500 mW/cm <sup>2</sup> T: 120s	24h em BHI	sem eficiência	Song et al., 2013
LED 460 nm	I: 1.250 ± 50 mW/cm <sup>2</sup> ER: 150 J/cm <sup>2</sup> T: 120s	1 noite em BHI	redução ≥ 5 log <sub>10</sub>	Cieplik et al., 2014
LED 405 ± 10 nm	I: 30 mW/cm <sup>2</sup> ER: 40 J/cm <sup>2</sup>	ágar sangue	fração de sobrevivência 77,68 ± 0,56%	Jiang et al., 2015

Em um estudo direcionado às bactérias do biofilme dentário, Fontana *et al.* (2015), demonstraram reduções significativas de crescimento do biofilme, bem como efeitos supressores de oito tipos diferentes de bactérias periodontopatógenas chave após a exposição a pequenas doses de luz azul a 455 nm, com densidade de potência 50 mW/cm<sup>2</sup> e densidade de energia de 12 J/cm<sup>2</sup> por 4 minutos. Neste estudo a quantidade *A actinomyctencomitans* na placa bacteriana foi reduzida após a irradiação com a luz azul, porém não houve uma redução estatística. A hipótese confirmada foi que a redução de micro-organismos patógenos fotossensíveis causou uma alteração da microbiota da placa controlando o crescimento e a alteração da dinâmica microbiana, indicando que exposições diárias com baixa intensidade em bolsas periodontais de pessoas doentes pode reduzir periodontopatógenos chave e aumentar a microbiota associada a quadros de saúde periodontal (FONTANA *et al.*, 2015).

Resultados semelhantes ao do estudo anterior foram citados por Shany-Kdoshim *et al.* (2019), ao realizarem a terapia antimicrobiana com luz azul em biofilme oral. Os autores utilizaram uma lâmpada halógena no comprimento de onda de 400-500 nm, densidade de potência de 1.2 W/cm<sup>2</sup> densidade de energia de 146 J/cm<sup>2</sup> por 2 minutos. A redução na quantidade de micro-organismos periodonto patógenos viáveis foi de 50% (*P.gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*) e também nessa porcentagem na espessura do biofilme, corroborando com a hipótese de que a aBLT pode contribuir na alteração de um biofilme disbiótico para um biofilme simbiótico, e ser aplicável em doenças associadas ao biofilme (SHANY-KDOSHEM *et al.*, 2019).

#### 1.4. Estado da arte

Os trabalhos mais atuais sobre o uso da aBLT no micro-organismo periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* divergem quanto ao comprimento de onda, parâmetros dosimétricos bem como no tipo de meio de cultura utilizado. Song et al., 2013, utilizou a aBLT em bactérias periodontopatógenas em estado planctônico e em biofilme e não atingiu significância na inativação do *A. Actinomycetemcomitans*. No entanto, Cieplik et al., 2014 e Jiang et al., 2015, obtiveram resultados estatísticos na redução destes micro-organismos e, apontaram a presença de fotossensibilizadores endógenos tais como porfirinas e flavinas e a interação destes com a luz azul, responsável pelo efeito antimicrobiano.

#### 1.5. Justificativa

Dado o estado da arte acima aludido e as limitações da tecnologia atual faz-se necessário um estudo aprofundado dos efeitos aBLT e *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* bem com o impacto da influência do meio de cultura nos resultados de morte dos micro-organismos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a terapia antimicrobiana com luz azul na curva de morte e do micro-organismo *Aggregatibacter Actinomycetencomitans* e em função de diferentes meios de cultura.

### 2.2. Objetivos específicos

No atendimento do objetivo geral o estudo contempla os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a dose subletal de luz azul para um inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetencomitans* crescida no meio BHI
- Determinar a dose subletal de luz azul para um inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetencomitans* crescida no meio Agar Sangue
- Caracterizar a curva de morte para um inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetencomitans* crescida no meio BHI submetido à aBLT
- Caracterizar a curva de morte para um inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetencomitans* crescida no meio Agar Sangue submetido à aBLT
- Estudar o efeito do meio de cultura na curva de morte de um inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetencomitans* submetido à aBLT
- Analisar a presença de fotossensibilizadores endógenos em um inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetencomitans* em diferentes meios de cultura

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Fonte de Luz

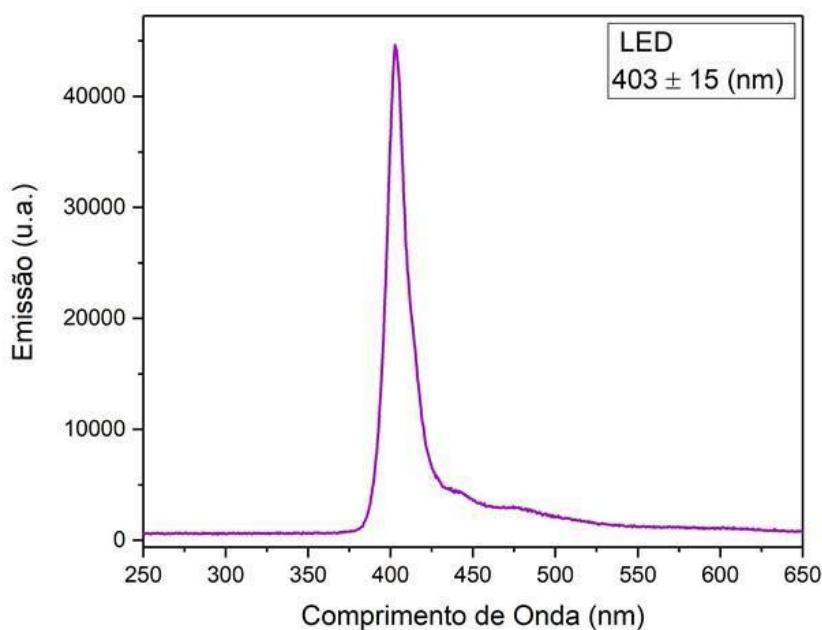
A fonte de luz utilizada foi um LED 403 nm, produzido no laboratório da Universidade Nove de Julho, nos seguintes parâmetros descritos abaixo na tabela 3.

Tabela 2: Características da fonte de luz e parâmetros utilizados. Fonte: autor.

Parâmetros	LED
Comprimento de onda (nm)	403 ± 15
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante (W)	1
Área do feixe (cm <sup>2</sup> )	1,7
Irradiância (mW/cm <sup>2</sup> )	588,2
Tempo de exposição (min)	0, 1, 5, 10, 30 e 60
Exposição radiante (J/cm <sup>2</sup> )	0, 35,176, 352, 1.058, 2.117
Energia radiante (J)	0, 60, 300, 600, 1.800, 3.600

A figura 8 demonstra o espectro de emissão do Led com pico em  $\lambda = 403$  nm utilizado nos experimentos.

Figura 8: Espectro de emissão do Led de 403 nm. Fonte: autor



### 3.2. Preparação do inóculo

As bactérias *A. actinomycetencomitans* ATCC 29523 foram cultivadas em caldo de BHI (ágar infusão de cérebro e coração) em um tubo plástico (falcon) de 15ml e em placas de ágar sangue, e foram incubadas a 37°C por um período de 48h. A bactéria *A. actinomycetencomitans* cresce em microaerofilia e para a reprodução destas condições utilizou-se uma estufa bacteriológica e a atmosfera de 5-10% CO<sub>2</sub> foi induzida pela técnica da chama de vela. Fixou-se a vela na parte inferior de um recipiente hermeticamente fechado e a vela foi acesa. Quando a chama se apaga o resultado é a queima do oxigênio (O<sub>2</sub>) e a transformação em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (MARTORANO-FERNANDES; CAVALCANTI; DE ALMEIDA, 2020; PRATES et al., 2007)

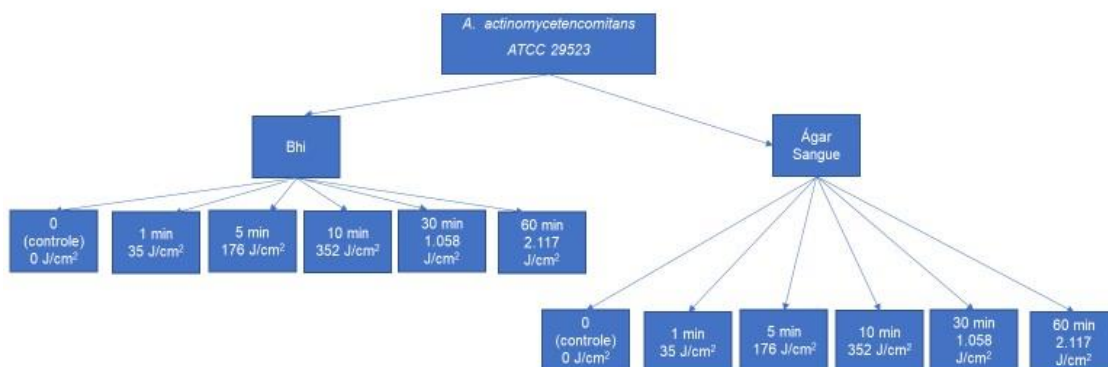
Para a preparação do inóculo dos micro-organismos cultivados BHI, após o período de incubação de 48h, os tubos falcon contendo os micro-organismos foram colocados na centrífuga por 3 minutos para retirar o líquido sobrenadante. Estes foram completados com 7ml de solução salina fosfatada estéril (PBS) em pH 7,2 e as suspensões de células resultaram em uma concentração de aproximadamente 2x10<sup>8</sup> UFC/mL (escala Mcfarland). Colocou-se o tubo falcon no vórtex para homogeneização do conteúdo. Para diminuir a concentração de bactérias no inóculo, 500µL deste primeiro tubo falcon foram diluídos em outro contendo também 7mL formando assim a suspensão padrão.

Para a preparação do inóculo dos micro-organismos cultivados em placas de ágar sangue, após 48h de incubação, uma pequena porção do concentrado bacteriano foi colhido das placas com a utilização de uma alça microbiológica estéril e diluída em um falcon contendo 7 mL de PBS, utilizando-se a mesma escala de Mcfarland para a obtenção da concentração de 2x10<sup>8</sup> UFC/mL.

### 3.3. Grupos amostrais e Terapia antimicrobiana com luz azul

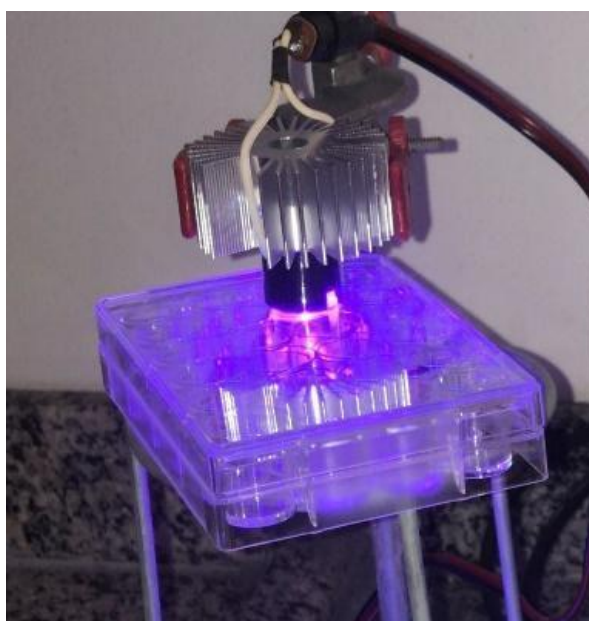
Os grupos foram divididos de acordo com o fluxograma (Figura 9) a seguir, que mostra os micro-organismos cultivados em BHI e ágar sangue e os tempos de exposição da luz azul.

Figura 9: Fluxograma dos grupos experimentais. Fonte: autor.



Foram utilizadas 2 placas por experimento, uma de 96 poços para a diluição e outra de 24 poços para a irradiação. Após o preparo da suspensão padrão, 1mL foi colocado em um poço da placa de irradiação, como demonstrado na figura 10.

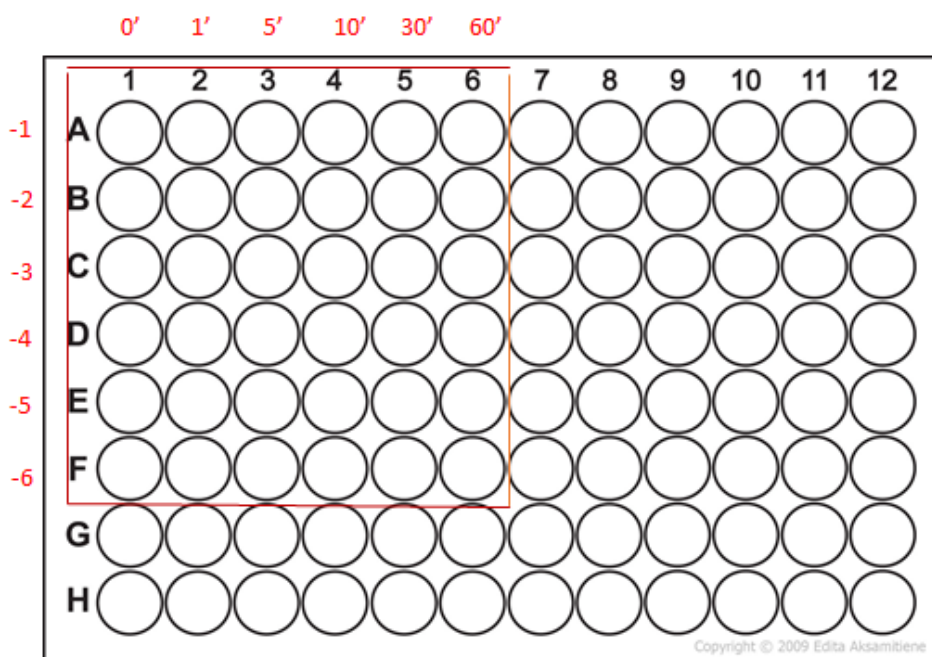
Figura 10: foto do LED azul de 403nm  $\pm$  15. Fonte: autor



Todos os poços experimentais da placa de diluição foram preenchidos com 180  $\mu\text{L}$  de PBS. Foi retirado 20  $\mu\text{L}$  do inóculo e levados para o procedimento de diluição na posição 0. Seguiu-se a irradiação do inóculo por 1,5, 10, 30 e 60 minutos e feita a diluição de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  vezes a concentração original.

A placa de diluição foi organizada da seguinte forma como demonstra a figura 11.

Figura 11: Placa de diluição de 96 poços. Fonte: autor



[Esta Foto de Autor Desconhecido está licenciado em CC BYSA](#)

Posteriormente, foram semeadas em placa de BHI e ágar sangue, em triplicata por estriamento de alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  e incubadas em microaerofilia.

### 3.4. Espectroscopia

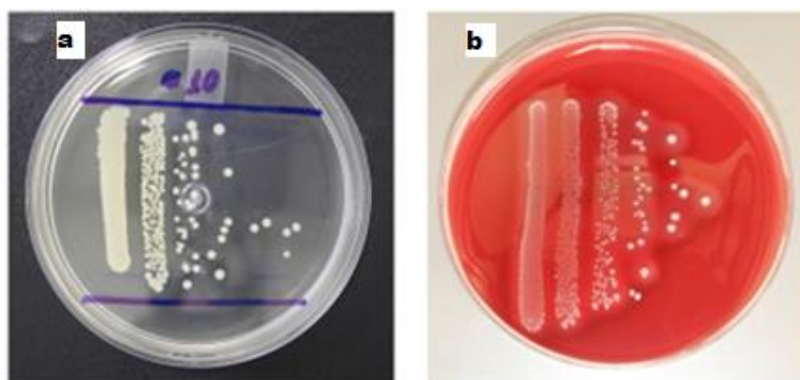
Os inóculos de *A.actinomycetencomitans* foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  em placas de BHI e ágar sangue por 15 dias em microaerofilia. Amostras dos microorganismos foram lavadas duas vezes com PBS e colocadas em tubos falcon com 7mL de PBS para centrifugação à 2.800 RPM por 10 minutos. Os pellets foram suspensos em 8mL de água destilada, 2 mL de SDS à 1% e NaOH à 0,1M para lise. Após 24 horas os tubos falcon foram centrifugados novamente por 10 minutos 2.800 RPM para realização da espectroscopia.

As medições dos espectros absorvância dos micro-organismos cultivados nos diferentes meios de cultura foram realizadas com um espectrômetro (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan).

### 3.5. Análise microbiológica

A análise microbiológica foi realizada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) como representado nas figuras 12 a e b pelas fotos tiradas após o período de incubação de 24h.

Figura 12: Placas de a) BHI e b) ágar sangue contendo *A.actinomycetencomitans* após a irradiação com luz azul e o crescimento em estufa a 37°C por 24h. Fonte: autor.



### 3.6. Microscopia de Fluorescência

Os inóculos de *A. Actinomycetencomitans* foram incubados em microaerofilia à 37°C por 7 dias em caldo de BHI e placas de ágar sangue. Amostras dos micro-organismos foram lavadas com 7 mL PBS, coletadas e colocadas em lâminas de vidro para a visualização no microscópio de fluorescência (ZOETM Fluorescent Cell Imager, BIO-RAD Laboratories, Singapore). A figura 13 mostra o microscópio descrito acima.



Figura 13: Microscópio de fluorescência ZOETM, BIO-RAD Laboratories. Fonte: autor.



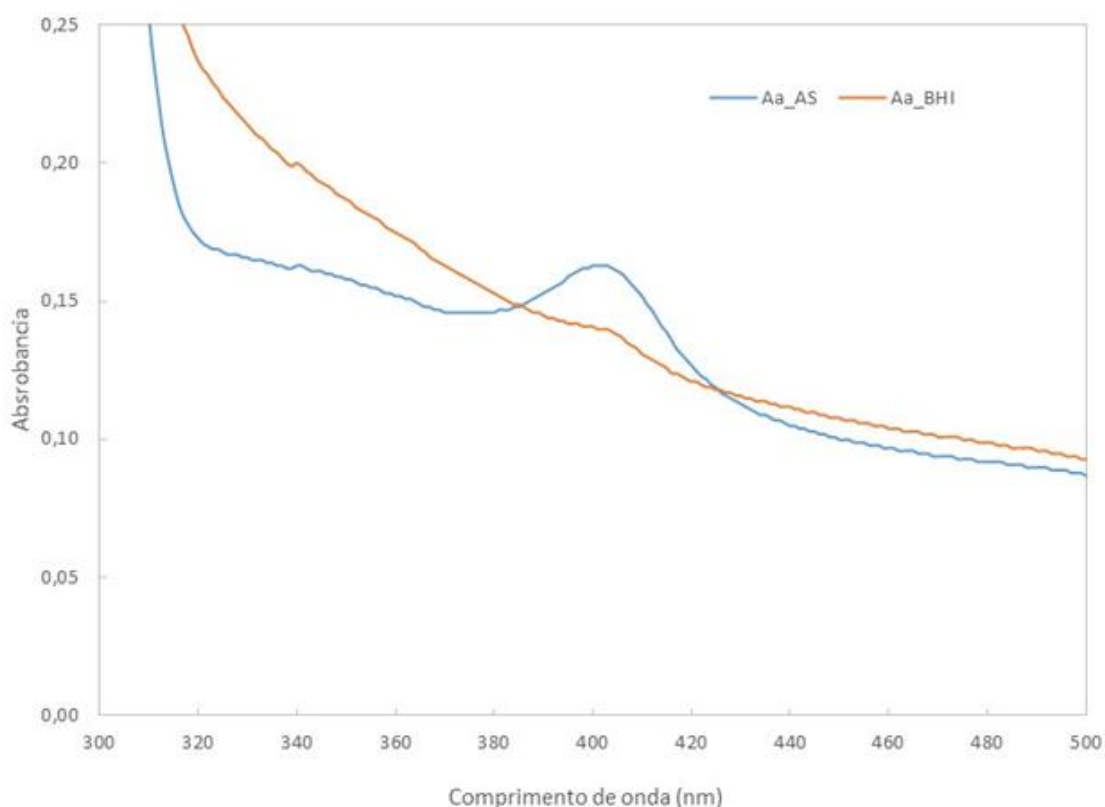
### 3.7. Análise estatística

O desfecho primeiro do estudo é a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). O logaritmo da contagem de UFCs possui distribuição log-normal conforme a literatura da área portanto os dados são representados como média e desvio padrão e todos os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) e teste de Bonferroni como post-hoc. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### 4. RESULTADOS

A espectroscopia do lisado de *A. actinomycetencomitans* quando cultivado em BHI, resultou um discreto pico de absorvância próximo ao comprimento de onda de 405 nm, sendo que o resultado quando o cultivo foi feito em ágar sangue mostrou um pico de absorvância mais pronunciado também próximo a este mesmo comprimento de onda. As porfirinas livres de metal possuem uma banda de absorção intensa na faixa de 400nm (banda e Soret) e nossos resultados sugerem a presença destes compostos no micro-organismo *A. actinomycetencomitans*. A representação deste resultado pode ser observada na figura 14.

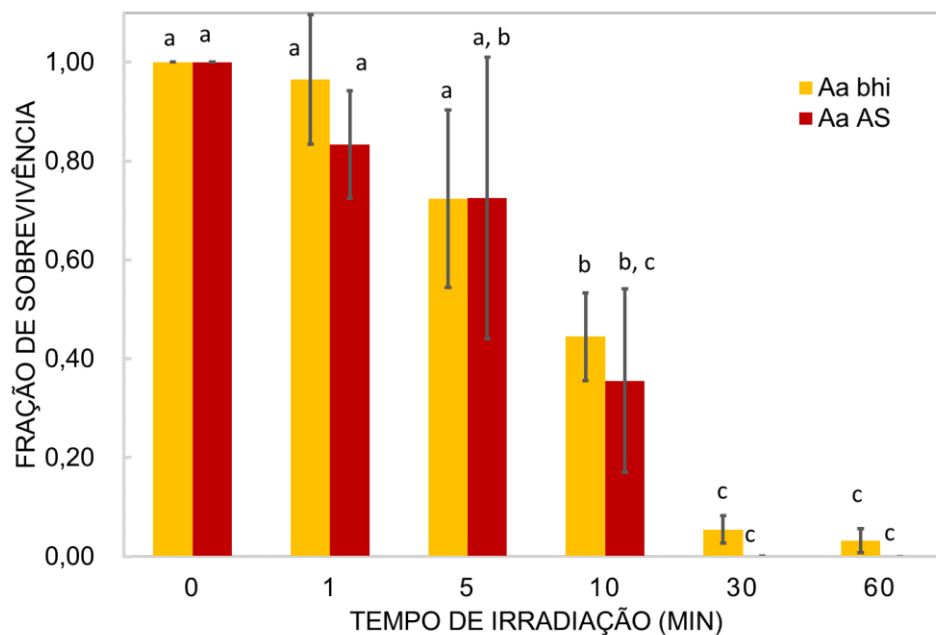
Figura 14: Gráfico de absorvância do lisado de *A. actinomycetencomitans* nos meios de cultura BHI e ágar sangue. Fonte: autor.



Os resultados da aBLT sobre o inóculo de *A. actinomycetencomitans* cultivados em BHI e ágar sangue, estão representados pelo gráfico de fração de

sobrevivência de acordo com o tempo de irradiação com a luz na figura 15. O desvio padrão elevado é devido a uma flutuação estatística aleatória inerente a natureza dos dados.

Figura 15: Gráfico de fração de sobrevivência com relação ao tempo de irradiação do *A. actinomycetencomitans* com o LED emitindo em 403 nm. Letras diferentes representam diferença significativa. Fonte: autor.



A análise de variância de duas vias mostrou diferença significativa entre os tempos ( $p < 0.0001$ , two-way ANOVA), entretanto foi observada ausência de diferença significativa entre os meios de cultura ( $p = 0.5300$ , two-way ANOVA) bem como ausência de interação entre os meios de cultura e os tempos de irradiação ( $p = 0.9898$ , two-way ANOVA)

As contagens das colônias de *A. actinomycetencomitans* em UFC/mL quando o tempo de irradiação do inóculo alcançou os 10 minutos ( $352 \text{ J/cm}^2$ ) mostrou efeito antimicrobiano, independentemente do meio de cultura utilizado. Apesar disso, a fração de sobrevivência das colônias foi de cerca de 40% em ambos os meios, não representando uma redução biológica e nem estatística ( $p > 0,05$ ).

Quando o tempo de irradiação aumentou para 30 e 60 minutos ( $1.058 \text{ J/cm}^2$  e  $2.117 \text{ J/cm}^2$  respectivamente), a análise da fração de sobrevivência das

colônias de micro-organismos cultivadas em diferentes meios de cultura (análise entre grupos) também mostrou resultado estatisticamente similar ( $p > 0,05$ ). No entanto, a análise intragrupos, ou seja, a fração de sobrevivência dos micro-organismos com relação aos grupos controle em ambos os meios de cultura, com 30 e 60 minutos de irradiação com luz azul, foi significativa ( $p < 0,05$ ). É importante observar que no grupo BHI foi observada uma redução  $> 96\%$ , enquanto no grupo AS a redução de ufc foi maior que  $99,9\%$ . Esses resultados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 3: Análise da fração de sobrevivência do micro-organismo *A. actinomycetencomitans* nos diferentes meios de cultura após exposição a terapia antimicrobiana com luz azul. (Bonferroni). Fonte: autor.

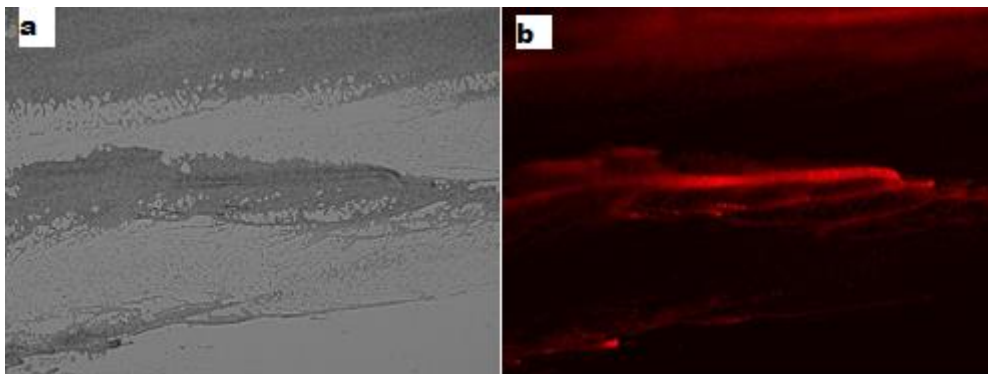
**A.a em BHI x A.a em ágar sangue**

<b>tempo</b>	<b>valor de <math>p</math></b>	<b>Exposição radiante</b>
<b>C</b>	----	----
1 minuto	0,4823	35 J/cm <sup>2</sup>
5 minutos	0,9956	176 J/cm <sup>2</sup>
10 minutos	0,7658	352 J/cm <sup>2</sup>
30 minutos	0,1924	1.058 J/cm <sup>2</sup>
60 minutos	0,3194	2.117 J/cm <sup>2</sup>

A tabela 3 mostrou ausência de diferença significativa entre os meios de cultura estudados (Bonferroni).

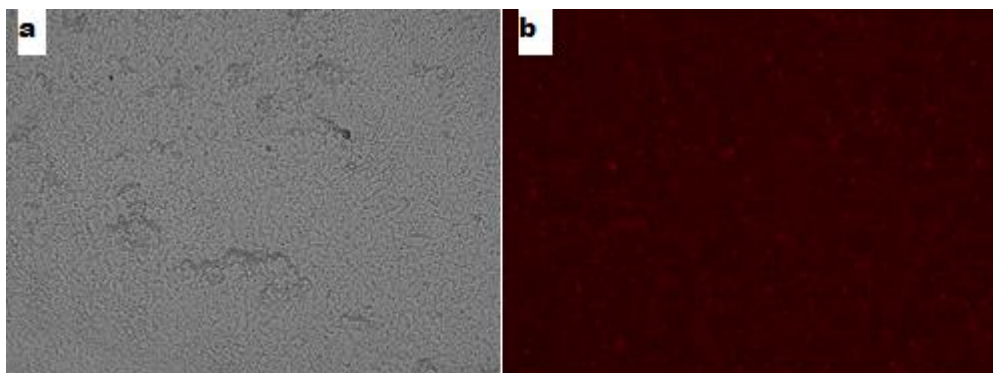
A figura 16 a) mostra a imagem da microscopia em campo claro e b) de fluorescência vermelha das colônias cultivadas nos diferentes meios de cultura em com aumento de 175x.

Figura 16: Imagens da microscopia em campo claro (a) e de fluorescência vermelha (b) das colônias de *A. actinomycetencomitans* cultivadas em ágar sangue com aumento de 175x. Fonte: autor.



A figura 17 a) mostra a imagem da microscopia em campo claro e b) de fluorescência vermelha das colônias cultivadas em BHI com aumento de 175x.

Figura 17: Imagens da Microscopia em campo claro (a) e de fluorescência vermelha (b) das colônias de *A. actinomycetencomitans* cultivadas em BHI com aumento de 175x. Fonte: autor.



Pode-se observar fluorescência vermelha nas colônias de *A. actinomycetencomitans* crescidas tanto em placas de BHI quanto em placas de ágar sangue. Porém, observa-se uma diferença qualitativa na fluorescência quando os micro-organismos foram cultivados na presença de sangue no meio de cultura.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se fluorescência vermelha nos micro-organismos quando estes foram cultivados em meios de cultura com e sem sangue no substrato, divergindo dos achados de Bjurshammar *et al.* (2012), que apontou fluorescência em colônias de *A. actinomycetencomitans* apenas quando estes foram cultivados em placas de ágar Columbia com 5% de sangue de cavalo desfibrinado. Quando estes foram cultivados em ágar TSB, um substrato sem eritrócitos, nenhuma fluorescência foi observada. Porém os autores ressaltam a importância de novas pesquisas a fim de verificar as porfirinas presentes em *A. Actinomycetencomitans*.

Tem-se questionado que as condições de cultura dos micro-organismos, como por exemplo o tempo de cultura, o número de passagens e o meio de cultura, influenciam diretamente os padrões de porfirinas endógenas *in vitro*. Meios de cultura mais parecidos com as condições encontradas *in vivo*, e maiores tempos de cultivo e passagens, parecem favorecer a formação de uma maior quantidade de porfirinas, o que resultaria em um melhor desempenho no uso da aBLT (FYRESTAM *et al.*, 2017).

No contexto desse estudo, mostrou-se através da espectroscopia que o *A. actinomycetencomitans* apresentou um pico de absorbância próximo a banda de Soret das porfirinas em ambos os meios de cultura, o que indica que estes micro-organismos são capazes de realizar a produção endógena destas substâncias, bem como, de capturar do meio de cultura quando estas estão disponíveis.

Trabalhos têm atribuído a ação antimicrobiana da luz azul à compostos endógenos do tipo flavinas (CIEPLIK *et al.*, 2014; PLAVSKII *et al.*, 2018). Os compostos endógenos de flavina, como o mononucleotídeo de flavina, o dinucleotídeo de flavina adenina e a riboflavina, possuem propriedades fotossensíveis e uma boa capacidade de geração de oxigênio singlete, apesar de que seus picos de absorção são alterados de acordo com o solvente em que se encontram. De forma geral, em solução aquosa, o mononucleotídeo de flavina por exemplo, exibe um pico máximo de absorção na faixa de 445 nm e outro menor na faixa de 360 nm, o que pode explicar a fotoinativação em trabalhos que utilizam fontes de luz em comprimentos de onda em 445 nm  $\pm$ 15.

Todavia, o trabalho dos autores Cieplik et al. (2014), reduziu em  $5 \log_{10}$  a quantidade de *A. actinomycetencomitans*, cultivado em meio de cultura sem sangue (BHI) por uma noite. Este trabalho difere desse estudo principalmente no comprimento de onda utilizado, que foi um LED no comprimento de onda de 460 nm, de utilização em consultórios odontológicos utilizado na fotopolimerização de resinas (Bluephase® C8, Ivoclar-Vivadent). Os resultados da espectroscopia do lisado de *A. actinomycetencomitans* dos autores citados, revelou um pico de absorção em 340 nm e um pico menor em 405 nm, o que eles atribuíram a presença de flavinas e porfirinas, sendo que de acordo com o comprimento de onda utilizado no experimento, as flavinas tiveram uma maior contribuição no efeito antimicrobiano. A escolha deste comprimento de onda nos experimentos provavelmente deve-se ao fato de que as flavinas em solução aquosa e misturas de ácido acético/acetato de etila, emitir um pico acentuado neste comprimento de onda. Em nossos resultados, a espectroscopia do lisado de *A. actinomycetencomitans* em ambos os meios de cultura, mostrou picos de absorção próximos ao espectro de absorção das porfirinas, e com relação a presença de flavinas um, pico pequeno e inconclusivo foi observado, e que não deve ser relacionado como responsável pela fotoinativação destes micro-organismos.

Os principais trabalhos *in vitro* com aBLT em *A. actinomycetencomitans* utilizaram diferentes comprimentos de onda, potência e dose nos experimentos. Song et.al. (2013), utilizou uma lâmpada halógena ( $\lambda = 400 - 520$  nm) de baixa intensidade ( $500 \text{ mW/cm}^2$ ) e não especificou nenhum valor de energia que atingiu as amostras, não atribuindo efeito da luz azul nestes micro-organismos. Em nosso trabalho utilizou-se um LED ( $\lambda = 403 \pm 15$  nm) e uma irradiância parecida ( $588 \text{ mW/cm}^2$ ), porém ao atingir uma elevada exposição radiante devido ao tempo de exposição (30 minutos) os efeitos antimicrobianos se mostraram presentes. Isso está de acordo com o estudo de Cieplik et al. (2014) e Jiang et al. (2015), que apontaram que os efeitos antimicrobianos da luz azul se relacionam diretamente com a dose de luz aplicada nas amostras. Apesar do segundo grupo citado ter utilizado um LED semelhante ao do nosso trabalho ( $\lambda = 405 \pm 10$  nm) e uma irradiância baixa ( $30 \text{ mW/cm}^2$ ) atingiram significância na inativação microbiana com dose de  $40 \text{ J/cm}^2$ . É importante ressaltar que Cieplik et al. (2014), utilizou um comprimento de onda diferente (LED  $\lambda = 460$  nm), uma

irradiância elevada ( $1.260 \pm 50 \text{ mW/cm}^2$ ) e alcançou uma dose de  $150 \text{ J/cm}^2$  em 120 segundos. Os autores citaram um aumento marginal de temperatura após este tempo de  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  e apontaram a necessidade de uma investigação se este aumento na temperatura pode ter algum efeito perigoso nos tecidos orais dos mamíferos como por exemplo, queimaduras.

O presente estudo demonstrou que a aBLT, nos parâmetros utilizados, é capaz de eliminar o micro-organismo *A. actinomycetencomitans* em seu estado planctônico através da interação com substâncias fotossensíveis produzidas endogenamente e/ou absorvidas do meio de cultura. A Figura 15 mostrou o gráfico da curva de morte deste micro-organismo quando o mesmo foi cultivado nos meios de cultura BHI e ágar sangue.

É importante salientar que, embora tenhamos observado falta de diferença significativa entre os grupos do estudo, no grupo BHI foi demonstrada uma redução  $> 96\%$ , caracterizando que a dose de  $1.058 \text{ J/cm}^2$  (30 minutos de irradiação) é a dose subletal neste meio de cultura, enquanto no grupo ágar sangue a redução de UFC foi maior que  $99,9\%$  nestes mesmos parâmetros. Portanto em ágar sangue a dose subletal para o inóculo de *A. actinomycetencomitans* é de  $352 \text{ J/cm}^2$  (10 minutos de irradiação). Esses resultados podem ser observados na tabela 3.

Isto, aliado aos resultados obtidos pela análise espectrométrica e de fluorescência sugerem que a *A. actinomycetencomitans* produz compostos endógenos do tipo porfirina em ambos os meios de cultura, entretanto estes compostos são produzidos em maior quantidade quando em um meio rico em sangue.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo apontam que a bactéria *A.actinomyctencomitans* é susceptível a aBLT, mesmo quando cultivada em meio de cultura sem sangue, por produzir independentemente do meio de cultura, pigmentos endógenos como a protoporfirina IX, que é ressonante com o comprimento de onda da fonte de luz utilizada nos experimentos. Deve-se considerar o fato deste micro-organismo periodontopatógeno viver no ambiente bucal em uma comunidade bacteriana e em condições de substrato mais parecidas com o meio de cultura com sangue.

O aumento de cepas resistentes a antibióticos eleva a necessidade de tratamentos alternativos em infecções microbianas e a aBLT pode ser um coadjuvante na terapia básica periodontal. A supressão de patógenos chaves como *A. actinomyctencomitans* no biofilme parece ser uma boa estratégia no controle e na prevenção da doença periodontal, levando ao aumento da flora microbiana associada a saúde, porém, mais estudos com aBLT em *A. actinomyctencomitans* em biofilmes são necessários. Bactérias fotossensíveis podem alterar a formação, a composição, o crescimento e a maturação do biofilme pelas interações entre as espécies e alteração de mecanismos como a coagregação e comunicação metabólica.

A contribuição de compostos do tipo flavinas endógenas nos micro-organismos ainda é controversa na literatura, e nosso estudo não encontrou indícios conclusivos de sua presença, porém se realmente estes compostos participarem da fotoinativação de periodontopatógenos, os LEDs já presentes em consultórios odontológicos para a fotopolimerização de resinas compostas poderiam ser utilizados como auxiliares na terapia básica periodontal.

Entretanto este assunto ainda não está pacificado na literatura e mais trabalhos são ainda necessários para determinar qual o mecanismo responsável por gerar os compostos endógenos utilizados na aBLT.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho trouxe a necessidade de continuarmos a busca por mais respostas sobre a ação da terapia antimicrobiana com luz azul neste importante micro-organismo periodontopatógeno.

Futuramente, pretendemos investigar como a luz azul age na *A. actinomycetemcomitans* quando a bactéria está aderida ao um biofilme, em condições mais parecidas com o ambiente bucal.

## Referências

AMANO, A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 10, p. 3965–3974, 2007.

ANZALDI, L. L.; SKAAR, E. P. Overcoming the heme paradox: Heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 4977–4989, 2010.

BJURSHAMMAR, N. et al. On the red fluorescence emission of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. v. 2012, n. December, p. 299–306, 2012.

BUSET, S. L. et al. Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 4, p. 333–344, 2016.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 64, n. 1, p. 57–80, 2014.

CIEPLIK, F. et al. Blue light kills *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to its endogenous photosensitizers. p. 1763–1769, 2014.

COSTERTON, J. W. et al. Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137–2142, 1994.

DAI, T. The antimicrobial effect of blue light: What are behind? **Virulence**, v. 8, n. 6, p. 1–4, 2017.

DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3–4, p. 170–188, Sep. 2009.

DAI, T.; WANG, Y. Antimicrobial blue light: a drug-free approach for inactivating pathogenic microbes. n. June, p. 18, 2018.

DAMGAARD, C. et al. Immunoglobulin G antibodies against *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in cardiovascular disease and periodontitis Immunoglobulin G antibodies against *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in card. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, 2017.

DENTINO, A. et al. Principles of periodontology. **Periodontology 2000**, v. 61, n. 1, p. 16–53, 2013.

ENWEMEKA, C. S. et al. The Role of UV and Blue Light in Photo-Eradication of Microorganisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p. 0–72, 2021.

FERREIRA, M. C. et al. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 4, p. 651–665, 2017.

FILA, G.; KAWIAK, A.; GRINHOLC, M. S. Blue light treatment of pseudomonas aeruginosa: Strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors. **Virulence**, v. 8, n. 6, p. 938–958, 2017.

FONTANA, C. R. et al. The effect of blue light on periodontal biofilm growth in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 8, p. 2077–2086, 2015.

FYRESTAM, J. et al. Determination of porphyrins in oral bacteria by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 23, p. 7013–7023, 2015.

FYRESTAM, J. et al. Influence of culture conditions on porphyrin production in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 17, p. 115–123, 2017.

G. CATON, J. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. March, p. S1–S8, 2018.

GRABER, K. R.; SMOOT, L. M.; ACTIS, L. A. Expression of iron binding proteins and heme binding activity in the dental pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 135–142, 1998.

GRENIER, DANIEL; LEDUC, ANNIE; MAYRAND, D. Interaction between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides and human hemoglobin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, p. 77–81, 1997.

HAMBLIN, M. R. et al. *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2822–2827, 2005.

HASAN, A.; PALMER, R. M. A clinical guide to periodontology: Pathology of periodontal disease. **British Dental Journal**, v. 216, n. 8, p. 457–461, 2014.

HENDERSON, B.; WARD, J. M.; READY, D. Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: A triple A\* periodontopathogen? **Periodontology 2000**, v. 54, n. 1, p. 78–105, 2010a.

HENDERSON, B.; WARD, J. M.; READY, D. Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: A triple A\* periodontopathogen? **Periodontology 2000**, v. 54, n. 1, p. 78–105, 2010b.

HERRERA, D. et al. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 12, n. 3 SUPPL., p. 50–60, 2012.

JANSSON, H. et al. Impact of Periodontal Disease Experience on Oral Health–Related Quality of Life. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 3, p. 438–445, 2014.

JIANG, X. et al. Toluidine blue O and porphyrin-mediated photodynamic therapy on three main pathogenic bacteria of periodontitis using portable LED phototherapy device. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 8, n. 4, p. 1–7, 2015.

KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES, RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI, C. M. F. **Biofotônica: conceitos e aplicações**. São Paulo: [s.n.].

LAMONT, G. D. T. AND R. J. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. **Periodontology 2000**, v. 52, n. 1, p. 68–83, 2010.

LOE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental Gingivitis in Man. **The Journal of periodontology**, v. 36, p. 177–178, 1965.

MARIOTTI, A.; HEFTI, A. F. Defining periodontal health. **BMC Oral Health**, v. 15, n. S1, p. S6, 15 Dec. 2015.

MARTORANO-FERNANDES, L.; CAVALCANTI, Y. W.; DE ALMEIDA, L. D. F. D. Inhibitory effect of Brazilian red propolis on Candida biofilms developed on titanium surfaces. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.

MONTEIRO, A. V. et al. Evaluation of the use of systemic antimicrobial agents by professionals for the treatment of periodontal diseases. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 12, n. 4, p. 285–291, 2013.

MOSLEMI, N. et al. Inactivation of Aggregatibacter

actinomycetemcomitans by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 89–94, 2014.

NAJAR FZ, LIN S, SONG L, LAI H, WHITE J, KENTON S, R. B. . **The Aggregatibacter (formerly Actinobacillus) actinomycetemcomitans genome - annotation, analysis and metabolic reconstruction. In: Henderson B, Curtis MA, Seymour RM, Donos N editors. Periodontal Medicine and Systems Biology. Chichester, UK: Wiley-BI. [s.l: s.n.].**

NATH, S.; RAVEENDRAN, R. Microbial dysbiosis in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 4, p. 543, 2013.

NEWMAN, MICHAEL G; TAKEI, HENRY H; KLOKKEVOLD, PERRY R; CARRANZA, F. A. **Carranza Periodontia Clínica**. 12. ed. São Paulo: [s.n.].

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontology 2000**, v. 60, n. 1, p. 15–39, 2012.

PLAVSKII, V. Y. et al. Porphyrins and flavins as endogenous acceptors of optical radiation of blue spectral region determining photoinactivation of microbial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, n. February, p. 172–183, 2018.

PLESSAS, A. Nonsurgical periodontal treatment: review of evidence. **Journal of Oral Health and Dental Management**, v. 13, n. 1, p. 71–80, 2014.

PRATES, R. A. et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 1, p. 70–76, 2007.

PUMMER, A. et al. **Antimicrobial efficacy of irradiation with visible light on oral bacteria in vitro: A systematic review** *Future Medicinal Chemistry*, 2017.

SCAPOLI, L. et al. Quantitative analysis of periodontal pathogens in periodontitis and gingivitis. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 29, n. 3, p. 101–110, 2015.

SHANY-KDOSHIM, S. et al. Killing mechanism of bacteria within multi-species biofilm by blue light. **Journal of Oral Microbiology**, v. 11, n. 1, 2019.

SHARMA, S. et al. Revelation of Viral - Bacterial Interrelationship in Aggressive Periodontitis via Polymerase Chain Reaction: A Microbiological

Study. **Journal of international oral health : JIOH**, v. 7, n. 9, p. 101–107, 2015.

SLOTS, J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 7–23, 2017.

SOCRANSKY, SIGMUND S., HAFFAJEE, A. Periodontal microbial ecology.: EBSCOhost. **Periodontology 2000**, v. 38, p. 135–187, 2005.

SOCRANSKY, S. S. Relationship of Bacteria to the Etiology of Periodontal Disease. **Journal of Dental Research**, v. 49, n. 2, p. 203–222, 1970.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, 1998.

SONG, H. H. et al. Phototoxic effect of blue light on the planktonic and biofilm state of anaerobic periodontal pathogens. **Journal of Periodontal and Implant Science**, v. 43, n. 2, p. 72–78, 2013.

SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 143–166, 2011.

STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 47, n. 4, p. 189–197, 2018.

VAN DER MEULEN, F. W. et al. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, n. 3, p. 204–208, 1997.

WANG, Y. et al. Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. **Drug Resistance Updates**, v. 33–35, n. June, p. 1–22, 2017.

YOSHIDA, A. et al. Antimicrobial effect of blue light using *Porphyromonas gingivalis* pigment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.