



Erika da Silva Mello

Análise do Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana Transtorácica
na Endocardite Infecciosa por *Staphylococcus aureus* em Modelo Animal.

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

Orientador: Prof. Dr.
Alessandro Melo Deana.

São Paulo

2025

Mello, Erika da Silva.

Análise do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana transtorácica na endocardite infecciosa por *Staphylococcus aureus* em modelo animal. / Erika da Silva Mello. 2025.

96 f.

Tese (Doutorado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

Orientador (a): Prof. Dr. Alessandro Melo Deana.

1. PDT. 2. Endocardite. 3. Bactéria. 4. Metileno. 5. Azul. 6. Luz vermelha. 7. Infecção. 8. Fotodinâmica. 9. aPDT. 10. *Staphylococcus*.

I. Deana, Alessandro Melo. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 04 de dezembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Érika da Silva Mello

Título da Tese: “Análise do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana transtorácica na endocardite infecciosa por *Staphylococcus aureus* em modelo animal”.

Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DEANA A. M. Deana

Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES R. A. Prates

Membro: PROF^a. DR^a. PATRICIA APARECIDA DA ANA P. A. da Ana

Membro: PROF^a. DR^a. MARTHA SIMOES RIBEIRO Martha Ribeiro

Membro: PROF^a. DR^a. FERNANDA MARCIANO CONSOLIM COLOMBO F. M. Colombo

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a Deus, que colocou esse desejo em meu coração, me deu foco, me capacitou, aproximou pessoas incríveis que me ensinaram e apoiaram. Dou-te graças pelo privilégio de estudar Sua maravilhosa criação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado esposo Eduardo, pelo apoio, orações e por viabilizar todas as minhas necessidades para que eu pudesse me dedicar à pesquisa.

Aos meus pais, meus amores e alicerces. Não apenas me trouxeram até aqui, mas me formaram para a vida toda. Com sabedoria, amor, honra, determinação, foco e muita oração. Tenham certeza de que todas as orações ficaram tatuadas no coração de Deus e colherei os frutos para sempre. Aos meus irmãos pelo apoio, oração e carinho. À minha amiga Claudia Grotti, seu carinho, interesse, apoio e orações.

À Universidade Nove de Julho, que abriu as portas para mim. Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Biofotônica, na pessoa da professora Kristianne Porta Santos Fernandes, assim como à Secretaria. A todos os professores e seus ensinamentos. À veterinária Nurya, pela orientação inicial. E especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Alessandro Melo Deana.

À Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro, que me recebeu, acolheu, orientou e me fez sentir parte de seu grupo de alunos. Obrigada por tantos ensinamentos.

Aos colegas do CLAP-IPEN-USP Tânia, Abdênego e Bruno, que me ensinaram todos os procedimentos laboratoriais deste estudo e me permitiram conhecer e aprender sobre diferentes pesquisas. Aos colegas do Biotério IPEN-USP: Eliana, Neide, Mara, André, Calixto, Gabriel, Terezinha, Sandy (*in memoriam*), Bárbara, João Vitor e ao veterinário Alex, que, ao meu lado, estudou o procedimento cirúrgico até que eu achasse o caminho certo, além de me ensinar diferentes técnicas para novos estudos.

Gratidão às amigas Vanessa Dalapria, Glaucia Abud, Luciana Toledo e ao Cícero Dayves. Obrigada pelo apoio, estímulo e permitirem estar na pesquisa de cada um de vocês.

Ao @lucianoilustrador: apenas comece.

*“Sobre tudo que se deve guardar, guarda o teu coração,
porque dele procedem as fontes da vida”.*

(Provérbios 4:23, Bíblia Sagrada)

RESUMO

Endocardite infecciosa (EI), grave infecção no endotélio cardíaco com vegetações valvares, apresenta incidência anual de 3-10 casos/100.000 pessoas e mortalidade de 30% em 30 dias. *Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico. Devido ao tratamento prolongado, à resistência bacteriana e aos custos elevados, a busca por terapêuticas inovadoras é necessária. Este objetivou analisar o efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na sobrevivência de 72 ratos Wistar machos. A EI foi induzida através da inoculação de *S. aureus* via cateter introduzido na artéria carótida até as valvas. Os animais foram alocados aleatoriamente em três grupos: controle (EI), uma sessão de aPDT (PDT1) e três sessões de aPDT (PDT3). A aPDT utilizou azul de metileno (10mg/kg), em solução salina a 0,9% e LED 660(±20) nm (360 J, 600 s, 129 J/cm²), com sessões transtorácicas, a partir do 4º dia. No 20º dia, os animais sobreviventes foram eutanasiados, para exames histológicos e microbiológicos das valvas. Os resultados mostraram que a sobrevida foi de 33,33% (EI), 50% (PDT1) e 91,66 (PDT3), com $p < 0,05$. Colônias bacterianas apresentaram redução significativa. As análises histológicas dos grupos tratados apresentaram reorganização tecidual e diminuição do infiltrado inflamatório, com reparo mais avançado no grupo PDT3. Este estudo sugere que a aPDT com azul de metileno e LED 660 (±20) nm é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da EI.

Palavras-chave: PDT; endocardite; bactéria; metileno; azul; luz vermelha; infecção; fotodinâmica; aPDT; *Staphylococcus*.

ABSTRACT

Infectious Endocarditis (IE), a severe infection of the cardiac endothelium with valvular vegetations, has an annual incidence of 3-10 cases/100,000 people and a 30-day mortality rate of 30%. *Staphylococcus aureus* is the main etiological agent. Given the prolonged treatment, bacterial resistance, and high costs, the search for innovative therapies is necessary. This study aimed to analyze the effect of antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) on the survival of 72 male Wistar rats.

IE was induced by inoculating *S. aureus* via a catheter introduced into the carotid artery to the heart valves. Animals were randomly allocated into three groups: control (IE), one session of aPDT (PDT1), and three sessions of aPDT (PDT3). The aPDT used methylene blue (10mg/kg), in 0.9% saline solution, and LED 660($\pm$ 20) nm (360 J, 600 seconds, 129 J/cm²), with transthoracic sessions starting on the 4th day. On the 20th day, surviving animals were euthanized for histological and microbiological examinations of the valves.

Results showed survival rates of 33.33% (IE), 50% (PDT1), and 91.66% (PDT3), with $p < 0.05$. Bacterial colonies underwent significant reduction. Histological analyses of the treated groups revealed tissue reorganization and decreased inflammatory infiltrate, with more advanced repair in the PDT3 group. This study suggests that aPDT with methylene blue and LED 660($\pm$ 20) nm is a promising therapeutic strategy for the treatment of Infectious Endocarditis.

Keywords: endocarditis; bacterial; methylene; blue; red light; infection, photodynamic; aPDT; *Staphylococcus*.

RESUMO PARA LEIGOS

A endocardite infecciosa é uma infecção que atinge o interior do coração, especialmente as valvas, formando acúmulos de bactérias chamados de vegetações. Essa doença é grave e pode matar cerca de 30% dos pacientes em até 30 dias. O principal causador dessa infecção é uma bactéria chamada *Staphylococcus aureus*, que é conhecido por ser resistente a muitos antibióticos.

O tratamento costuma ser longo, caro e pode causar efeitos colaterais. Por isso, é muito importante diagnosticar precocemente e começar o tratamento rapidamente.

Este estudo busca testar uma nova forma de tratar a infecção no coração, chamada **Terapia Fotodinâmica**, que usa uma substância chamada azul de metileno e uma fonte de luz, aplicada de forma não invasiva no tórax dos animais. O objetivo é eliminar as bactérias presentes nas valvas do coração.

Para isso, 72 ratos Wistar foram infectados com a bactéria e divididos em três grupos, a saber: grupo controle, grupo com 1 sessão de tratamento e grupo com 3 sessões de tratamento. Alguns grupos foram avaliados para verificar o efeito da aPDT, outros foram analisados para determinar se houve redução da infecção, alterações teciduais e aumento da sobrevida dos animais.

Os pesquisadores esperavam que essa técnica conseguisse reduzir ou eliminar as bactérias no coração, e que aumentasse a sobrevida dos animais, contribuindo para o desenvolvimento de novos tratamentos em humanos no futuro.

Palavras-chave: PDT; endocardite infecciosa; azul, metileno; *Staphylococcus aureus*.

DESTAQUES

- Demonstrou-se o uso da aPDT *in vivo*, utilizando LED 660 (± 20) nm associado ao azul de metileno, em um modelo animal com o microrganismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

- Este trabalho mostrou que a administração via oral do azul de metileno permitiu obter sua concentração ideal nas valvas cardíacas, as quais foram irradiadas por via transtorácica. Tal achado indica que não apenas o fotossensibilizador, mas também a energia entregue, alcançaram o coração e suas valvas de maneira adequada ao tratamento.

- Foi observado um aumento da taxa de sobrevivência significativamente superior ao relatado pela literatura, atingindo 50% para o grupo que recebeu 1 sessão de aPDT e 91,66% no grupo que recebeu 3 sessões de aPDT.

- Este trabalho demonstrou uma considerável redução no número de unidades formadoras de colônias no grupo que recebeu 1 sessão de aPDT, e a eliminação completa (e superiormente eficaz) foi alcançada no grupo que recebeu 3 sessões de aPDT, resultando na redução do tempo de tratamento.

- Observou-se o início de um processo de reparo valvar no grupo que recebeu 1 sessão de aPDT, sendo este mais evidente no grupo que recebeu 3 sessões de aPDT, o que demonstra o potencial de reparo do LED 660 (± 20) nm aliado à sua atuação na aPDT.

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Ilustra a formação de colônias bacterianas a partir da insuficiência valvar.	19
Figura 2: Ilustra a colonização da lesão no endotélio cardíaco lesado por microrganismos na rede de fibrinas e plaquetas.	19
Figura 3: Tempo de tratamento esperado e tempo em caso de intercorrências.	24
Figura 4: Diagrama de Jablonski.	27
Figura 5: Fluxograma do estudo. A cor amarela indica o grupo controle; a cor verde indica o grupo 1 sessão de tratamento e a cor salmão indica 3 sessões tratamento.	44
Figura 6: Modelo de preparo do cateter.	45
Figura 7: Cultura matriz de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Figura 8 Contagem de Unidades formadoras de Colônia.	47
Figura 9 Mostra indução anestésica do rato, pesquisadora calibrando o sistema de anestesia.	48
Figura 10: Mostra tricotomia realizada no pescoço e na região cervical.	48
Figura 11: Visão transoperatória a instalação do cateter na artéria carótida direita.	49
Figura 12: Cateter posicionado e fixado na artéria carótida direita.	50
Figura 13: Mostra uma extremidade do cateter exposta no dorso do animal, fixada por sutura.	51

Figura 14: Inoculação via cateter.....	52
Figura 15: Administrando azul de metileno via gavagem.....	54
Figura 16: Mostra a aPDT transtorácica realizada na região das valvas cardíacas.....	56
Figura 17: Remoção do coração e valvas para análise histológica e microbiológica.	57
Figura 18: Curva de Kaplan Meier compara o tempo sobrevida dos animais.....	59
Figura 19: Gráfico de barras da porcentagem de animais infectados antes e após o tratamento a partir da análise microbiológica das valvas cardíacas. .	60
Figura 20: Concentração de UFC após 24h.	61
Figura 21: Crescimento bacteriano após 24 h na incubadora.....	62
Figura 22: Gráfico apresenta a média dos valores da temperatura retal dos grupos EI, PDT1 e PDT3 ao longo de 20 dias.....	64
Figura 23: Gráfico apresenta a média de peso corporal dos grupos EI, PDT1 e PDT3 ao longo de 20 dias.....	64
Figura 24: Análise histológica das valvas nos diferentes grupos: a) valva saudável; b) grupo EI; c) grupo PDT1 e d) grupo PDT3.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de Duke para diagnóstico de EI, modificado por Li <i>et al.</i>	21
--	----

Tabela 2: Cronograma da prática em Biotério. EI (EI), aPDT 1 sessão (PDT1), aPDT 3 sessões (PDT3) e sobrevida (SV).	53
--	----

Tabela 3 Parâmetros do LED	55
----------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS

SIGLA	SIGNIFICADO
S. AUREUS	Staphylococcus aureus
APDT	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
HISTO	Exame histológico
MICRO	Exame microbiológico
SV	Sobrevida
EI	Grupo EI ou grupo controle
PDT1	Grupo 1 sessão de tratamento
PDT3	Grupo 3 sessões de tratamento
UFC	Unidades formadoras de colônias

Sumário

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	18
1.1	Etiologia	18
1.3	Prevenção.....	22
1.4	Tratamento convencional.....	23
1.5	Efeitos adversos da antibioticoterapia	25
1.6	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana	26
1.7	Azul de metileno como fotossensibilizador	28
1.8	Terapia Fotodinâmica associada ao azul de metileno	28
1.9	Penetração da luz nos tecidos biológicos	32
1.10	Efeitos adversos do LED	33
1.11	Escolha dos parâmetros do LED	34
1.12	Modelo animal para estudo da EI	34
1.13	Estado da arte.....	35
1.14	Justificativa	38
1.15	Hipótese da pesquisa:	38
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	Objetivo Geral.....	40
2.2	Objetivos específicos	40

3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Ética.....	41
3.2	Análise estatística	41
3.3	Tamanho amostral	41
3.4	Inteligência artificial.....	42
3.5	Modelo Animal	42
3.6	Fluxograma do estudo	43
3.7	Procedimento de calibração e validação do modelo experimental de endocardite infecciosa.....	44
3.8	Preparo do cateter para cirurgia	45
3.9	Preparo dos microrganismos	45
3.10	Preparo pré-operatório e Anestesia	47
3.11	Procedimento cirúrgico:	49
3.12	Infecção com microrganismos	51
3.13	Tratamento preconizado para EI.....	52
3.14	Hemocultura.....	52
3.15	Definindo o momento da irradiação	53
3.16	Administração do fotossensibilizador:.....	54
3.17	Terapia Fotodinâmica Transtorácica.....	54
3.18	Término do tratamento.....	56

4	RESULTADOS.....	58
4.1	Análise de sobrevivência.....	58
4.2	Análise microbiológica	59
4.3	Análise da Temperatura e Peso.....	63
4.4	Análise Histológica.....	65
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A endocardite infecciosa (EI) é definida como um foco de infecção no endotélio do coração (1,2), formando vegetações nas valvas cardíacas nativas ou protéticas (3,4). Estas vegetações consistem em um aglomerado de fibrinas, células inflamatórias, plaquetas e colônias bacterianas em variadas fases metabólicas (5). Apresenta uma incidência anual de 1,5 - 15/100.000 pessoas por ano (6) com 30% de mortalidade em 30 dias (7). Na população pediátrica, a incidência anual é de 0,43-0,69/100.000 em crianças por ano (8), e 50% dos casos acomete adultos com mais de 50 anos (9). O sexo masculino apresenta um número maior de casos que o sexo feminino (proporção de 1,5-3:1 homens para mulheres) (9,10). Fatores como a presença de próteses valvares, doenças reumáticas e congênitas ampliam o risco de infecção em 10 a 50 vezes (11–13). Comorbidades como Diabetes Mellitus, doenças renais crônicas, doenças hepáticas crônicas e uso de drogas intravenosas aumentam a probabilidade dessas condições (14). A progressão da deterioração valvar pode levar a reinfecção, tornando necessária a intensificação da terapêutica médica e/ou cirúrgica (5).

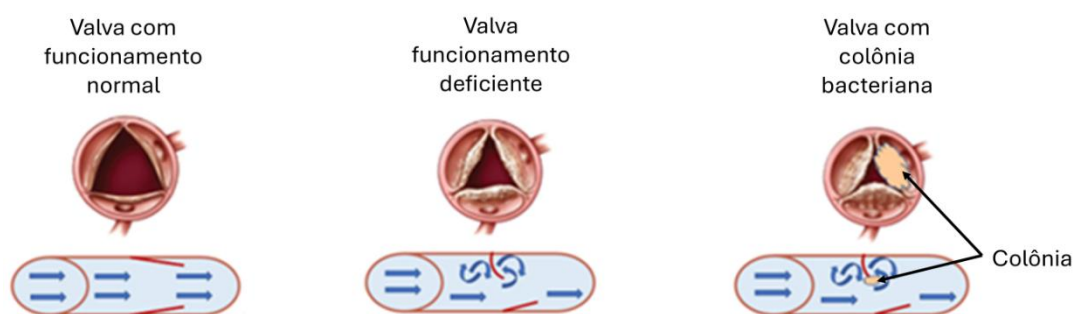
É fundamental o diagnóstico precoce e início imediato do tratamento (2) a fim de evitar complicações como insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, abscessos intracardíacos, êmbolos cerebrais, disfunção da prótese cardíaca (15,16) e embolia pulmonar presente entre um terço a um quinto dos pacientes (17). A EI é mais frequente na valva mitral, seguida pela aórtica e, eventualmente, na valva pulmonar, preferindo valvas que apresentam alguma alteração prévia, como próteses (18). Além disso, a doença exige um elevado tempo de tratamento, entre 2 a 6 semanas (1,19).

1.1 Etiologia

A etiologia da EI relaciona-se a fatores epidemiológicos específicos e ao seu agente causal (17). Em condições normais, o endotélio valvar não é

suscetível à colonização e à infecção bacteriana, exceto na presença de uma lesão mecânica. Isso pode ocorrer quando alterações estruturais - de origem reumática, degenerativa ou protética - geram fluxo sanguíneo turbulento nas cavidades cardíacas, capaz de provocar lesão endotelial por estresse mecânico (Figura 1).

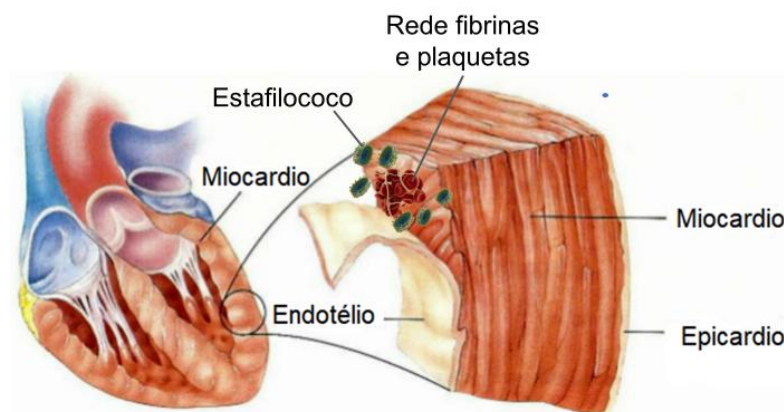
Figura 1: Ilustra a formação de colônias bacterianas a partir da insuficiência valvar.



Fonte: Sanarmed compilado (20).

A exposição da matriz extracelular permite o depósito de fibrinas e plaquetas na área lesada, configurando a chamada endocardite não infecciosa. Quando os microrganismos se alojam neste trombo fibrina-plaquetário e formam colônias, estabelece-se a EI (21) (Figura 2).

Figura 2: Ilustra a colonização da lesão no endotélio cardíaco lesado por microrganismos na rede de fibrinas e plaquetas.



Fonte: Anatomia papel e caneta, seu amigo farmacêutico modificado (22,23).

Hemodiálise, cateter intravenoso, troca de prótese valvar, imunossupressão e uso de drogas por via intravenosas são apontados como os principais fatores de risco para o acesso bacteriano. De origem precoce ou tardia, a EI associada à cirurgia de prótese valvar pode ocorrer por inoculação direta do microrganismo durante o ato operatório, ou por disseminação hematogênica nos primeiros dias ou semanas após o procedimento (5).

Através da cavidade bucal, tratos gastrointestinal e urinário, ou pela pele após procedimentos invasivos, os microrganismos podem invadir a corrente sanguínea (24), aderir às áreas lesadas do endocárdio - como valvas cardíacas – ou a materiais estranhos – como próteses valvares – e, assim, formar vegetações (2,25). Estas vegetações integram o microrganismo em uma matriz extracelular rica em polissacarídeos, capaz de se organizar em biofilme, o que reduz a eficácia de agentes antimicrobianos, favorecendo a persistência de organismos resistentes (2), estimula a produção e liberação de enzimas que promovem a destruição de tecidual (2,25).

No que se refere à cavidade oral, entre os microrganismos associados à EI, *Staphylococcus spp.* figuram os mais frequentes (2,26). Sua invasão na corrente sanguínea pode ocorrer por hábitos de vida diário, como a escovação dental (0-50%), o uso de fio dental (20-68%), a mastigação e o trauma gengival pelo uso de palitos (7-51%), assim como a extração dental (18,27). Além disso, a má higiene bucal, a doença periodontal e a presença de cavidades de cárie também contribuem (18). Assim, a bacteremia espontânea supera a gerada por procedimentos odontológicos (27), havendo ainda limitação de dados sobre a eficácia da terapêutica antibiótica (28).

Considerados um dos principais agentes etiológicos da EI (29), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) está presente entre 28 e 31% dos casos (10,30), e caracteriza-se por elevada agressividade e potencial destrutivo (25,31). Essa espécie é responsável por 40% ou mais dos óbitos entre portadores de próteses valvares infectadas (25), e apresenta forte resistência aos antibióticos (32). Destaca-se o *S. aureus* resistente à metilina, detectado

também na cavidade oral (33,34), o qual tem demonstrado resistência inclusive à combinação amoxicilina/ácido clavulânico (35).

1.2 Diagnóstico

Na EI os sinais clínicos mais frequentes incluem (36–38):

- 80-90% de febre;
- 40-75% de calafrios e sudorese;
- 40-86% de anorexia, fraqueza e perda de peso.

Para diagnóstico da EI, frequentemente estabelecido após 48 h de internação hospitalar (5,39), os critérios modificados de Duke apresentam uma sensibilidade de 80% em valvas cardíacas nativas, mas com eficácia reduzida em próteses e dispositivos eletrônicos (1,2,40). Estes critérios baseiam-se em achados clínicos, ecocardiográficos e biológicos, a saber: hemocultura e sorologia (41) (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios de Duke para diagnóstico de EI, modificado por Li et al.

Critérios de Duke modificado para diagnóstico de EI	
Critério Maior	Critério Menor
Cultura de sangue positiva para EI com identificação do organismo em duas amostras separadas de hemocultura	Predisposição cardíaca ou uso de drogas intravenosas
Hemocultura positiva persistente para um microrganismo (pelo menos duas culturas positivas em amostras colhidas com mais de 12 h de diferença)	Febre $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$

Ecocardiograma positivo para EI incluindo vegetação, abscesso, valva protética com deiscência parcial recente ou regurgitação valvar recente.	Fenômenos vasculares como êmbolo arterial, infartos pulmonares sépticos, aneurisma micótico, hemorragia intracraniana, hemorragia conjuntiva e lesões de Janeway *
Amostra única de hemocultura para <i>Coxiella burnetii</i> ou IgG antifase I** com titulação maior que 1:800	Evidência microbiológica não encontrada nos critérios maiores
	cultura positiva de sangue não encontrada nos critérios maiores
	Fenômenos imunológicos (nódulos de Osler***, manchas de Roth****, fator reumatoide ou glomerulonefrite)
O diagnóstico é dado pela presença de: • dois critérios clínicos maiores OU • um critério maior + três critérios menores OU • cinco critérios menores. O diagnóstico de possível EI é dado pela presença de: • um critério maior + 1 critério menor OU • três critérios menores	

*Manchas planas de 1-4mm de diâmetro, avermelhada, com borda irregular e geralmente indolores. **Primeira linha de defesa. ***Lesões violáceas e sensíveis na ponta dos dedos nas mãos e nos pés. ****Sinal de hemorragia na retina com centro branco.

Fonte: Hubers et al (2020) (10).

1.3 Prevenção

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia

Em 2023, as Diretrizes Brasileiras de Cardiologia concluiu que uma pequena porcentagem dos casos de EI poderia ter sido causada por procedimentos odontológicos geradores de bacteremia, o que sugeriu maior atenção na manutenção da saúde bucal em detrimento da profilaxia antibiótica (42). Em 2013, uma revisão sistemática na base de dados Cochrane revelou a falta de evidências sobre a eficácia da profilaxia antibiótica na prevenção da EI em pessoas pertencentes ao grupo de risco que seriam submetidas a procedimentos odontológicos. Além disso, não está claro se o efeito benéfico desta conduta supera os potenciais danos e custos da administração deste medicamento (42–44).

1.4 Tratamento convencional

Para um tratamento adequado, é necessário conhecer o microrganismo causador da EI, a posição do local afetado (valva aórtica, pulmonar, tricúspide ou mitral) e o tipo de valva infectada (nativa ou protética) (25,31).

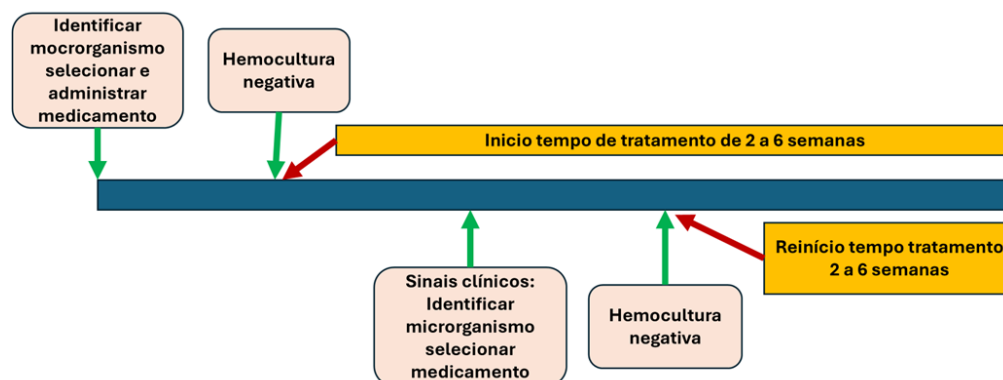
O uso de antibióticos específicos elimina a bacteremia, remove ou previne a destruição dos tecidos, e cura a infecção (se iniciada precocemente), porém, não restaura a integridade dos tecidos e valvas afetadas (25,28,31,45). Em 2015, a diretriz da *Sociedade Europeia de Cardiologia* recomendou que a seleção de antibióticos deve ser baseada nos testes de sensibilidade dos microrganismos recém-isolados, com duração de 2 a 6 semanas (41). A linezolida, a vancomicina e a daptomicina são consideradas a última linha de defesa contra as infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina, um microrganismo frequente em casos de EI (46).

Em casos de bacteremia persistente, uma considerável parcela de EI causada por *Staphylococcus spp.* pode não responder à terapia de primeira linha. Isso sugere diferentes combinações terapêuticas, em especial a daptomicina associada a uma penicilina antiestafilocócica, (mesmo em casos de

Staphylococcus sp. resistentes a metililina), ou ceftarolina, ou fosfomicina associada a imipenem ou apenas ceftarolina (16).

A duração da terapia antibiótica varia de 2 a 6 semanas, podendo ser estendida. A sua contagem inicia-se a partir da primeira hemocultura negativa, obtida após o começo da terapêutica medicamentosa, que, normalmente, é administrada por via intravenosa (19). Caso seja necessária intervenção cirúrgica devido a amostras positivas de culturas ou se for descoberto um abscesso intracardíaco, o tempo de tratamento é reiniciado a partir de novas amostras negativas (Figura 3) (42).

Figura 3: Tempo de tratamento esperado e tempo em caso de intercorrências.



Fonte: o autor (2025).

A permanência hospitalar prolongada, o aumento de despesas médicas e o aumento da mortalidade demonstram que a resistência bacteriana aos antibióticos tem sido um grande desafio terapêutico (48). A resistência aos antibióticos de *S. aureus* isolados aos antibióticos é generalizada, e a bacteremia resistente, causada por *S. aureus* resistentes a alguns tipos de antibióticos, como a Metililina, frequentemente leva ao uso de antibióticos caros ou menos eficazes (49). Embora tenham sido obtidos avanços no diagnóstico e na terapêutica, a mortalidade associada à EI continua alta (50), e é semelhante ou superior ao infarto agudo do miocárdio ou de muitas neoplasias malignas (41). A revisão realizada por Farahani *et al* (2024) revela que não houve diferença significativa no risco de mortalidade por todas as causas entre a terapia antibiótica

combinada e a terapia antibiótica única, terapia para bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (51).

1.5 Efeitos adversos da antibioticoterapia

O tratamento da EI requer o uso prolongado de potentes antibióticos. Assim, podem ocorrer efeitos adversos. Entre os antibióticos mais utilizados e as suas reações adversas temos:

- Penicilinas: reações alérgicas (rash cutâneo e anafilaxia), hepatotoxicidade, convulsões em doses elevadas e insuficiência renal (52).
- Cefalosporinas: reações alérgicas, diarreia (52).
- Aminoglicosídeos: nefrotoxicidade, ototoxicidade, e necessidade de monitorar os níveis de creatinina (4,53).
- Glicopeptídeos: nefrotoxicidade, ototoxicidade, e necessidade de monitorar níveis séricos e creatinina (54).
- Rifampicina: hepatotoxicidade, interações medicamentosas graves (potente indutor enzimático) (55).
- Daptomicina: elevação de CPK, miopatia/rabdomiólise, o risco de efeitos adversos aumenta na presença de estatinas (56,57) .
- Linezolida: trombocitopenia, anemia, neuropatia periférica/óptica em uso prolongado, se combinada com antidepressivos, pode levar à síndrome serotoninérgica (58,59) .
- Quinolonas: ruptura de tendões, tendinite, neuropatia periférica, alterações glicêmicas (60).
- Vancomicinas: lesão renal aguda (61).

1.6 Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

No tratamento de infecções, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) apresenta características favoráveis quando comparada a métodos tradicionais, como amplo espectro de ação sobre bactérias, fungos, vírus e parasitas. Esta terapia também não considera a resistência dos microrganismos a antibióticos, antifúngicos e antivirais; baixo potencial de mutação e de seleção de resistência em microrganismos tratados (62).

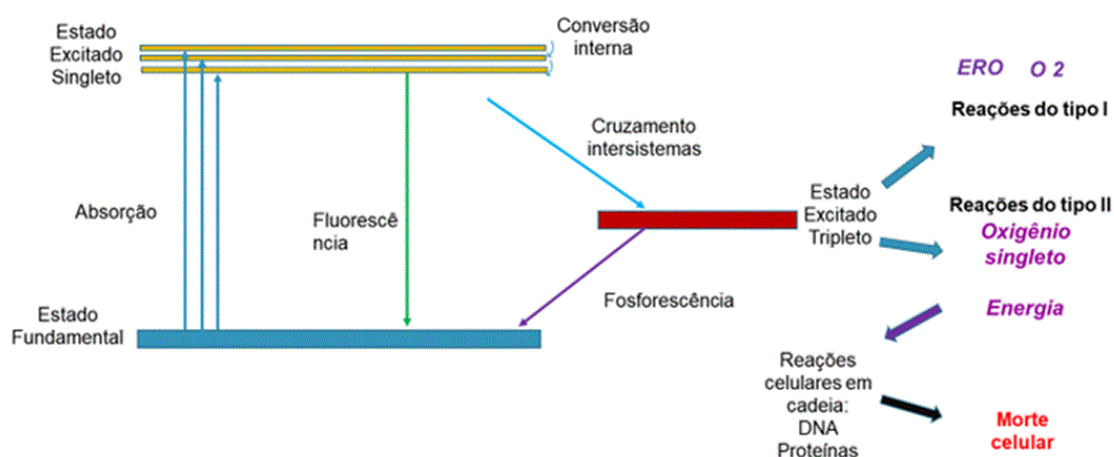
O princípio da aPDT é baseado em três componentes: uma molécula chamada fotossensibilizador, luz com uma faixa espectral capaz de ativar o fotossensibilizador e o oxigênio molecular (48,63). Na aplicação do fotossensibilizador, a sua internalização com acúmulo no tecido alvo e a irradiação são as etapas propostas desta terapia, a qual possibilita conjugar com outras técnicas como a quimioterapia e a imunoterapia (63). De modo local ou sistêmico (62), a aPDT tem sido usada com sucesso na dermatologia, oncologia, ginecologia, urologia e odontologia (62,64) .

Seguindo etapas específicas, o sensibilizador pode ser de uso sistêmico ou tópico, que possui retenção seletiva no tecido alvo. A irradiação é realizada empregando-se uma fonte de luz e a destruição dos tecidos danificados por uma reação fotoquímica (65).

Em seu estado fundamental, o fotossensibilizador apresenta dois elétrons com spins opostos na camada orbital mais inferior. Ao absorver a luz, o fotossensibilizador sai de seu estado fundamental, ocorrendo a excitação de um destes elétrons para uma camada orbital de energia mais alta (66–68), sem alterar a direção dos spins (68). Este é o chamado estado excitado singleto, no qual o fotossensibilizador apresenta um tempo de vida muito curto, impossibilitando-o de participar de reações com substratos celulares. No processo de retorno ao estado fundamental, o fotossensibilizador libera energia na forma de luz fluorescente, ou na forma de energia térmica por meio da conversão interna. O estado singleto também pode sofrer cruzamento espontâneo entre sistemas nos quais ocorre inversão do spin do elétron

excitado, dando origem ao estado excitado tripleto com vida mais duradoura. Para retornar ao seu estado fundamental, o estado tripleto também dissipa sua energia através da fosforescência (68,69). No estado tripleto excitado pode ocorrer dois tipos de reação. Na primeira, o substrato recebe elétrons do fotossensibilizador excitado ocorrendo oxirredução com biomoléculas. Na segunda, uma molécula de oxigênio recebe energia da molécula do fotossensibilizador. Assim, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila e o superóxido na reação Tipo I, e a formação de oxigênio singlete na reação Tipo II. Nesta última, o oxigênio é quimicamente muito ativo induzindo várias reações celulares em cadeia, como em DNA e proteínas, entre outros, resultando na morte celular (62,67,69) (Figura 4).

Figura 4: Diagrama de Jablonski.



Fonte: o autor (2025).

Os fotossensibilizadores têm como primeira característica a ser observada a capacidade de absorver luz, pois conhecendo a faixa do espectro eletromagnético no qual cada um deles absorve luz, é possível escolher a fonte de ativação adequada para obter o efeito fotodinâmico (62). Por exemplo, o azul de metileno é capaz de absorver luz no intervalo de 610-660 nm de comprimento de onda, promovendo reações fotoquímicas e fotofísicas (62). Propriedades farmacocinéticas, baixa toxicidade no escuro, fácil manuseio e alta capacidade de ativação são características importantes de um fotossensibilizador para promover um tratamento antimicrobiano eficiente (70).

A eficácia da aPDT contra o *S. aureus* não depende do perfil de resistência a antibióticos de uma cepa, podendo ser aplicada tanto em cepas sensíveis quanto resistentes a metilina, por exemplo (32). Dado o seu uso para tratar infecções localizadas, observa-se que o risco de toxicidade no ser humano e o prejuízo da microbiota natural são inferiores aos antibióticos de uso sistêmico (32).

1.7 Azul de metileno como fotossensibilizador

Apresentado na medicina como a primeira droga totalmente sintética em uso, o azul de metileno foi preparado pela primeira vez em 1876 pelo químico alemão Heinrich Caro (71–73). Em 1870, Robert Koch utilizou o azul de metileno como corante para visualizar os bacilos da tuberculose por microscopia (73).

Trata-se de um composto aromático (73), fenotiazínico, que pode ser utilizado por via oral, subcutânea ou intravenosa (71). Tem como características ser seguro quando utilizado na dose recomendada – menor que 40mg/kg de peso corporal, não altera a função endotelial, mostra-se presente em casos de regulação positiva de óxido nítrico e não atua como vasoconstritor em doses baixas e em curto prazo (74). Sua concentração em nível plasmático é reduzida de modo acentuado nos primeiros quarenta minutos, apresentando meia vida de 5 a 6,5 horas e excreção entre 4 e 24 horas pós-administração (71).

1.8 Terapia Fotodinâmica associada ao azul de metileno

Di Poto *et al.* (2009), empregaram a aPDT combinada com vancomicina ou fagócitos para eliminar biofilmes maduros formados por *S. aureus* MRSA180. Nos experimentos *in vitro*, azul de metileno foi adicionado aos microrganismos, que foram irradiados com uma fonte de luz de 400-800nm, 100mW/cm², e com uma dose de 50-150J/cm², aplicada perpendicularmente à placa. Os autores concluíram que a aPDT associada à vancomicina resultou em uma redução de

10^3 a 10^4 vezes maior do o fármaco isoladamente. De modo similar, a combinação de aPDT com os fagócitos reduziu com sucesso a sobrevivência de *S. aureus* no biofilme (75).

Em 2009, Donnelly *et al.*, investigaram o uso de hidrogéis de polivinil álcool como plataforma de entrega de substâncias fotossensibilizadoras no tratamento de feridas infectadas com *S. aureus*. Utilizou-se luz vermelha de 635nm, com fluência de 100mW/cm², e dose de 110-200J/cm², aplicada perpendicularmente a 1 cm da placa de cultura, em combinação com o azul de metileno 1mg/ml. Os pesquisadores observaram que, apesar de alcançarem uma redução superior a 95% no número de bactérias, houve também a persistência de bactérias residuais (76).

Com o objetivo de avaliar o efeito da aPDT, utilizando nanopartículas de ouro conjugadas ao azul de metileno e um laser diodo (660 nm, 200mW, por 2 minutos, totalizando 24J/cm²), em *S. aureus* isolados de lesões de impetigo, que são lesões presentes faciais altamente contagiosas. Tawfic *et al.* (2015), dividiram as amostras em 4 grupos experimentais: grupo nanopartículas de ouro azul de metileno, grupo nano partículas de ouro, grupo azul de metileno e grupo controle. Os autores concluíram que, ao realizar aPDT utilizando nanopartículas de ouro azul de metileno como fotossensibilizador, o efeito inibitório do crescimento de microrganismos foi superior aos observados nos demais grupos, resultando em apenas 3% de bactérias viáveis remanescentes na amostra (77).

Kashef *et al.* (2017), objetivaram determinar a eficácia da aPDT associada à linezolidina na erradicação de biofilmes de *S. aureus*. Para tanto, selecionaram como fotossensibilizadores o azul de metileno e o azul de toluidina O utilizando dois tipos de laser diodo: um com 660nm, 35mW e 91mW/cm² (diâmetro do feixe no alvo de 7mm); e outro com 630nm, 26mW/cm² (diâmetro do feixe no alvo de 7mm). A amostra contendo azul de metileno foi irradiada com uma dose de 54,6 J/cm² por 10 m e a amostra que continha azul de toluidina O foi irradiada com 15,6 J/cm² pelo mesmo tempo. Subsequentemente, os autores adicionaram antibióticos em concentrações significativamente inferiores aos valores convencionalmente utilizados para erradicação de biofilmes, e as amostras

foram retornadas para a incubadora. Consideraram-se bactericidas as amostras que apresentaram $\geq 3 \log_{10}$ UFC/ml. Este estudo demonstrou que o pré-tratamento dos biofilmes de *S. aureus* com aPDT (utilizando azul de metileno ou azul de toluidina O), seguido pela adição de linezolida, resultou em uma eficácia superior na eliminação bacteriana no biofilme, quando comparado ao uso isolado do antibiótico (78).

Pérez-Laguna *et al.* (2017), avaliaram a eficácia *in vitro* da aPDT, utilizando azul de metileno ou rosa bengala (em concentrações variando de 0,03 a 10µg/L), isoladamente ou em associação com antibióticos como mupirocina ou linezolida (em concentração variando de 0,03 a 10µg/L). Nessas suspensões, foram adicionados *S. aureus* ATCC29213, contendo aproximadamente 10^8 células/mL. Como fonte de luz, utilizaram um haleto metálico branco (λ 420-700nm) ou lâmpada de diodo emissor de luz (λ 515-625nm). Como resultado, as combinações de antibióticos e fotossensibilizadores promoveram uma redução de $6 \log_{10}$ na contagem de microrganismos. O uso isolado dos fotossensibilizadores promoveu a mesma redução, contudo, foi necessário que estes estivessem em uma concentração mais elevada (79).

A fim de avaliar a interação entre a aPDT (utilizando azul de metileno e laser) e diferentes antibióticos e laser na inativação de *S. aureus* MRSA, Feng *et al.* (2022) conduziram um estudo. Para isso, utilizaram irradiação com laser (670nm, 3mW/cm², por 60 m, resultando em uma dose de 10 J/cm²). As amostras de tecido suíno (pele) infectadas foram divididas em três grupos: grupo antibiótico, grupo azul de metileno + luz, e grupo antibiótico + azul de metileno +luz. Os autores observaram que a aPDT com azul de metileno e amoxicilina promoveu uma redução superior a 99% nas UFC, independentemente da resistência antibiótica (80).

Maliszewska *et al.* (2023), compararam a eficácia de vários protocolos utilizando azul de metileno (em concentrações de até 62,5 mg/mL e ≥ 125 mg/mL) e um laser diodo (665 nm, 40mW, com dose de 189 J/cm²) para eliminar biofilmes formados em superfície de vidro ou aço inoxidável por *S. aureus* MRSA. Inicialmente, os autores compararam o azul de metileno e as nanopartículas de

ouro baseando-se no seu efeito sinérgico e na influência da concentração. Em seguida, realizaram procedimentos de múltiplas etapas que não incluíam a fotossensibilização de bactérias nem a remoção de células mortas do biofilme (lavagem). Concluíram que a destruição do biofilme depende da natureza da superfície, do tempo de formação do biofilme e da concentração do azul de metileno. A presença das nanopartículas de ouro aumentou a eficiência na destruição do biofilme. Foi possível eliminar o biofilme com eficácia superior a 99,9%, desde que a concentração do azul de metileno fosse de, no mínimo, 125mg/ml, ou, alternativamente, com a realização de 3 sessões de aPDT em uma concentração não tóxica de 31,25 mg/ml² (81).

Park *et al.* (2023) objetivaram avaliar o efeito da aPDT, utilizando azul de toluidina O e azul de metileno, na eliminação de *S. aureus* na superfície do titânio. Discos de titânio foram jateados e tratados com ácido, simulando a superfície de implantes, e subsequentemente divididos em 6 grupos: solução salina tamponada com fosfato (PBS), azul de toluidina O, azul de metileno, PBS + laser, azul de toluidina+ laser e azul de metileno + laser. As amostras foram irradiadas com laser (670 nm, 160mW, por 60 segundos, em modo contínuo). Os resultados obtidos mostraram que o grupo azul de metileno + laser apresentou uma redução significativa de UFC, contudo, o grupo azul de toluidina + laser mostrou-se mais eficaz (82).

De Brito Junior *et al.* (2025), investigaram o efeito da aPDT, utilizando azul dimetilmetileno e LED vermelho (630 ± 20 nm, 125mW, área de irradiação de 2 cm², com uma dose de 12 J/cm², por 192 segundos) em *S. aureus* presentes em culturas planctônicas e feridas cutâneas contaminadas. As amostras foram divididas em 4 grupos: controle, LED, azul dimetilmetileno e LED + azul dimetilmetileno. Os autores concluíram que a associação LED + azul dimetilmetileno reduziu em 99,943% o número de UFC *in vitro* e 99,994% *in vivo*, em comparação com o grupo controle (83).

Uma revisão de literatura realizada por Pérez *et al.* (2021), afirmou que as evidências mostram que a aPDT é um complemento seguro e útil à terapia antibiótica tradicional no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*(84).

Por esta razão, houve o interesse em avaliar a ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, associada ao azul de metileno, no tratamento da EI por *Staphylococcus aureus*.

1.9 Penetração da luz nos tecidos biológicos

Salehpour *et al* (2016), utilizaram cabeças frescas de 3 ratos Wistar machos com 12 semanas pesando de 180 a 200 mg. Eles removeram os cérebros intactos imediatamente após eutanásia e utilizaram um medidor de potência do driver do laser de 630 e 810 nm, para medir a potência do laser transmitida através do couro cabeludo tricotomizado, membranas de revestimento e crânio até o lobo pré-frontal. Observaram que a densidade de energia aproximada que atingiu a superfície do córtex pré-frontal do cérebro dos ratos foi de $1,18 \pm 0,01 \text{ J/cm}^2$ (85).

Ash *et al* (2017), utilizando simulações pelo método de Transporte Radiativo de Monte Carlo em 2D, a irradiação com LED de 650 nm apresentou aproximadamente 1% de luz remanescente a uma profundidade de cerca de 4,75 mm (86). Empregando o mesmo tipo de simulação, Finlayson *et al* (2021), demonstraram que 1% da luz pode atingir profundidades superiores a 5 mm (87).

Hu *et al* (2019), utilizando LED 660 nm e irradiâncias variando entre 15 e 500 mW/cm², avaliaram a quantidade de luz transmitida através de tecidos vivos e de tecidos obtidos de cadáveres provenientes das regiões de crânio, coluna e membros. Os autores concluíram que a profundidade de penetração é maior em tecidos vivos comparado a *ex-vivos* (88).

De forma complementar, Lanzafame (2020), em sua revisão de literatura, afirma que arranjos de LED associados a irradiância elevada são capazes de promover transmissão luminosa superior a 5 mm (89).

Zhang *et al* (2021) investigaram os efeitos da fotobiomodulação sobre a síntese de ATP em ratos com insuficiência cardíaca e, para isso, irradiaram o

coração por via transtorácica na região da quinta costela com LED vermelho (630 nm, 2,5 mW/cm² ou 3mW/cm², 600s, 7 vezes por semana), observando a melhora da função cardíaca, a remodelação miocárdica, a redução da fibrose causada pela insuficiência cardíaca, a angiogênese miocárdica, além do aumento de ATP e da contratilidade dos cardiomiócitos, bem como do ATP do tecido cardíaco (90).

1.10 Efeitos adversos do LED

Em 2020, dois ensaios clínicos randomizados, controlados foram realizados em indivíduos saudáveis que receberam irradiação com LED ou irradiação simulada no antebraço durante 7 vezes por semana, por trinta minutos cada sessão, durante três semanas. Para todos os fototipos utilizaram 160-640 J/cm², e para os indivíduos caucasianos não hispânicos de 480 -640 J/cm². O aparecimento de bolhas e eritema prolongado ocorreram com 480 J/cm² no grupo todos os fototipos, e com 640 J/cm² em indivíduos caucasianos não hispânicos. Estes eventos adversos não apresentaram gravidade (91).

Simões *et al* (2022), desejaram avaliar a cicatrização de queimaduras de terceiro grau na pele de ratos Wistar, utilizando LED 630 nm $\pm$ 10, 300mW, 9 J/cm² por ponto (4 pontos ao redor da ferida), durante 30 segundos, ao sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia. Observaram um maior número de neutrófilos e linfócito nos grupos irradiados em comparação ao grupo controle, sendo maior no grupo 14 dias. Concluíram que o LED vermelho pode não ser eficaz em estágios mais avançados da reparação (92).

1.11 Escolha dos parâmetros do LED

Na aPDT, a escolha do laser e do LED deve ser baseada no fotossensibilizador escolhido selecionado e em sua capacidade de penetrar nos tecidos biológicos. O comprimento de onda selecionado deve corresponder ao pico de absorção do fotossensibilizador (62). Para o fotossensibilizador azul de metileno, o comprimento de onda adequado situa-se na faixa de 610–660 nm (62). Além disso, a luz vermelha é menos absorvida por cromóforos endógenos, como a hemoglobina e a melanina (em comparação à luz azul ou verde). Isso significa que mais energia luminosa chegue ao azul de metileno, minimizando a perda de luz (93–95). Fatores como o modo de irradiação, diâmetro do feixe e irradiância (mW/cm^2) contribuem para a exposição radiante (J/cm^2), que determina o efeito fototóxico e o consequente sucesso do tratamento (96).

1.12 Modelo animal para estudo da EI

Para estudos da EI, os ratos já eram utilizados em 1950 (97), representando um bom modelo para simular doenças cardiovasculares (98–100), no qual o acesso cirúrgico às valvas é eficaz e seguro (101). Esses animais possibilitam maiores opções de análises, como exames de imagem, exames biomoleculares e avaliação histológica (com o uso de agentes moleculares e anticorpos) (101). Além disso, oferecem a variabilidade de cepas geneticamente modificadas, que permite estudos com focos específicos, e representam fácil manutenção, baixo custo de alimentação e alojamento (101,102).

Coelhos (30) e camundongos também são utilizados como modelo de EI, seguindo o mesmo modelo de indução que o dos ratos (103), descrito em 1977 (104). Neste estudo, Santoro *et al.*, geraram uma lesão na valva cardíaca inserindo um cateter de polietileno estéril através da artéria carótida direita (105,106). Após 1 a 7 dias, eles infectaram os animais (105,106) por via intravenosa, pela veia caudal (106) ou via cutânea (97). Desta forma,

observaram a presença de colônias nas valvas dos animais eutanasiados entre 16h até 3 dias após a última intervenção (49).

Estes estudos estão de acordo com o modelo animal de EI desenvolvido por Schwarz *et al.* (2020), no qual foi necessário gerar um dano endotelial introduzindo um cateter na artéria carótida direita até a valva aórtica e, após 24 horas, promover uma fonte de infecção, condição necessária para manifestar a doença (103). Köse *et al.* (2021) propõem um novo modelo animal de EI, no qual 24 horas após colocar um cateter através da artéria carótida direita até atingir a valva aórtica, inocularam *S. aureus* pela veia caudal de 7 ratos Wistar, os quais apresentaram EI após 3 dias (107).

No modelo animal, a gravidade da EI por *S. aureus* depende do grau de irritação do endotélio e dos fatores de virulência bacteriana (103). Na literatura, o tempo médio de sobrevida é de 2 a 5 dias, de acordo com a carga bacteriana (107–109).

1.13 Estado da arte

Nos últimos 10 anos, estudos de EI utilizando modelos animais têm buscado comparar a eficácia do uso de antibióticos. Singh *et al.* (2017), utilizaram ratos como modelo animal para avaliar a eficácia da ceftarolina, nafcilina e da cefazolina contra 17 cepas de *S. aureus* suscetíveis à metilicina apresentando efeito auto-inóculo à cefazolina. Os resultados observados indicaram que a ceftarolina e a nafcilina reduziram consideravelmente a contagem bacteriana; porém, a cefazolina apresentou um significativo efeito auto-inóculo, ou seja, o microrganismo foi capaz de se manter resistente e ativo, mesmo após o tratamento (100).

Lerche *et al.* (2019), utilizaram este modelo animal para avaliar a eficácia do anticoagulante dabigatrana, associado à gentomicina, na eliminação das vegetações de *S. aureus* em valvas cardíacas. Foi observada a redução do tamanho da vegetação e da carga bacteriana nas valvas, além da redução do

número de hemoculturas persistentes após o tratamento, embora não tenha sido possível eliminá-las completamente (110).

Singh *et al.* (2020), utilizando ratos como modelo animal, compararam o uso da tedizolida como terapia de redução gradual após daptomicina em comparação com o uso isolado da daptomicina. O uso da tedizolida como terapia de redução gradual mostrou eficácia na redução da recidiva bacteriana de *Enterococos sp.* e *S. aureus* resistentes à meticilina e vancomicina, em comparação com o uso isolado da daptomicina (111).

Save *et al.* (2022), estudaram a potencial eficácia da vancomicina combinada com um coquetel de bacteriófagos líticos. No modelo animal, o coquetel de bacteriófagos isolado não foi capaz de controlar o crescimento bacteriano. Quando associado à vancomicina, foi observado importante redução da infecção *in situ* por cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (112).

Em 2024, Takigawa *et al.* realizaram um estudo *in vitro* no qual adicionaram um ativador de plasminogênio tecidual recombinante à cefazolina por 7 dias para avaliar se essa união colabora com o tratamento da EI. Observaram que essa associação apresentou maior eficácia na remoção de *S. aureus* quando comparada ao uso isolado da cefazolina ou do ativador de plasminogênio tecidual recombinante (113).

Lu *et al.* (2025), avaliaram se a presença do ácido chiquímico aumenta a eficácia da vancomicina em um modelo de rato com EI por *S. aureus* resistentes à meticilina. Após 3 dias de tratamento, observaram acentuada redução dos exsudatos inflamatórios, bem como uma modesta, mas significativa, diminuição nas densidades de *S. aureus* resistentes à meticilina e na formação de vegetações nas valvas aórticas, pois o ácido chiquímico potencializou a ação da vancomicina (46).

Para avaliar o efeito da aPDT sobre o biofilme de 1, 3 e 6 dias de formação, constituído por *S. aureus* resistentes à meticilina, Nikinmaa *et al.* (2021) utilizaram luz de 810 e 405 nm, isoladamente ou em uso simultâneo.

Ambas foram aplicadas com energia constante de 100 ou 200J/cm² e indocianina-verde como fotossensibilizador. Este estudo mostrou que a terapia de luz dupla foi mais eficaz na ação antibacteriana quando comparada ao uso isolado das fontes de 810 e 405 nm. Quando utilizada energia constante de 200J/cm², o impacto bacteriano alcançado foi no nível de desinfecção para todos os grupos de tratamento (114).

Ghaiyoomi *et al.* (2025) desejaram investigar o efeito da aPDT (com laser de 660 nm e azul de metileno) associada à terapia com atmosférico frio em *Streptococcus sanguinis*. O estudo *in vitro* compreendeu oito grupos de amostras diluídas em solução salina e cultivadas em uma placa de Petri contendo ágar-sangue. As culturas foram mantidas em ambiente anaeróbico por 48 horas e, em seguida, foram incubadas em ambiente aeróbico a 37°C. Com o auxílio de uma alça estéril, as colônias foram coletadas e transferidas para um meio líquido de tripsina. A absorbância inicial para cada amostra foi ajustada para 0,09 por meio de espectrofotometria, seguida por diluições em série. Os pesquisadores observaram que a associação de azul de metileno, laser de 660 nm (com potência radiante de 110mW, exposição radiante de 15,6 J/cm² por 60 segundos) e a terapia com plasma atmosférico resultou em uma redução na contagem de colônias. Essa redução foi comparada aos grupos controle e aos grupos tratados com penicilina, azul de metileno, grupo aPDT + azul de metileno, plasma + azul de metileno, plasma + aPDT e grupo plasma isolado. Ao comparar o grupo tratado com azul de metileno + aPDT + grupo plasma com o grupo aPDT + azul de metileno, este último apresentou um crescimento bacteriano com média logarítmica de 1,54 log UFC/mL, enquanto o grupo plasma+aPDT+ azul de metileno apresentou 1,59 log UFC/mL (115).

A maior parte dos estudos que relacionam a aPDT e a EI não aborda diretamente a endocardite, mas sim os microrganismos que podem vir a causá-la (115,116). Esses estudos foram realizados *in vitro* ou *ex vivo*. Até o momento, as pesquisas realizadas *in vivo* estão relacionadas a microrganismos presentes em lesões na pele e mucosa de um modelo animal, que causam EI (117). Contudo, quanto ao uso da aPDT (utilizando o laser ou LED) para avaliar a

redução de microrganismos ou tratamento da EI em modelos animais, não foram encontrados estudos publicados.

1.14 Justificativa

A EI é uma doença grave, com alta letalidade em curto prazo e com consideráveis consequências durante e após o tratamento. Pode ser causada por múltiplos microrganismos, sejam eles antibiótico-resistentes ou não. O isolamento e os testes de sensibilidade desses microrganismos são necessários para determinar o tratamento indicado, o que frequentemente implica a internação hospitalar mínima superior a duas semanas após o estabelecimento da terapêutica. Além disso, a resistência microbiana aos antibióticos e seus efeitos colaterais interferem, não apenas na evolução do tratamento, mas também na qualidade de vida do indivíduo.

No contexto da EI, a literatura científica é vasta em estudos que investigam a eficácia dos tratamentos antibióticos tradicionais na redução dos microrganismos. No entanto, uma lacuna significativa persiste: há uma escassez de pesquisas que avaliem a eficácia da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), especificamente no tratamento *in vivo* da EI. Dessa forma, torna-se essencial a avaliação dessa terapia. Nosso objetivo é explorar o potencial da aPDT para eliminar microrganismos, o que, por sua vez, poderia promover a redução do tempo de tratamento, a diminuição dos custos hospitalares e uma melhoria substancial na qualidade de vida do paciente. Dessa forma, é possível minimizar os riscos frequentemente associados às abordagens terapêuticas convencionais.

1.15 Hipótese da pesquisa:

H₀: a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana transtorácica utilizando o azul de metileno associado ao LED 660 (± 20) nm para o tratamento da EI por *Staphylococcus aureus* em um modelo animal é ineficaz.

H₁: a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana transtorácica utilizando o azul de metileno associado ao LED 660 (± 20) nm para o tratamento da EI por *Staphylococcus aureus* em um modelo animal é eficaz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana em um modelo animal de EI induzida por *Staphylococcus aureus* utilizando o fotossensibilizador azul de metileno associado ao LED 660 nm.

2.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um modelo de estudo “*in vivo*” para analisar o efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana utilizando Azul de Metileno associado ao LED 660 nm na taxa de sobrevivência de ratos acometidos por EI induzida por *Staphylococcus aureus*.
- b) Desenvolver um modelo de estudo “*in vivo*” para analisar o impacto da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana utilizando Azul de Metileno associado ao LED 660 nm na quantidade de unidades formadoras de colônia em ratos acometidos por EI induzida por *Staphylococcus aureus*.
- c) Desenvolver um modelo de estudo “*in vivo*” para avaliar as alterações histológicas do coração de ratos acometidos por EI induzida por *Staphylococcus aureus* antes e após a aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana utilizando Azul de Metileno associado ao LED 660 nm.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) sob o número 38/22.

3.2 Análise estatística

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade da distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para a análise de sobrevivência, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier, seguida pelo teste do qui-quadrado (χ^2) para comparação entre grupos. Os dados com distribuição aproximadamente normal foram analisados pelo teste de ANOVA, complementado pelo teste de Tukey quando identificadas diferenças significativas. Já os dados categóricos foram avaliados por meio do teste de McNemar nas análises intragrupos e do teste exato de Fisher nas análises entre grupos. O nível de significância adotado em todas as análises foi de $\alpha = 0,05$.

3.3 Tamanho amostral

O cálculo amostral foi feito baseado no uso racional de animais bem como nos modelos preconizados pela literatura. Foi utilizado durante todo o procedimento experimental 72 animais. O número de animais foi obtido a partir de cálculo amostral estatístico, considerando-se um grau de confiança de 95%, determinado através da seguinte equação:

$$N = Z^2 \cdot p(1-p)/d^2$$

Onde N é o número de animais; p refere-se à potência estatística (85%); d é o desvio padrão (30%, baseado na literatura), e Z equivale a 1,96, escore para um grau de confiança de 95% (118). Assim, foram necessários 6 animais

por grupo. Neste estudo foram utilizados 24 animais por grupo e 6 animais por subgrupo.

3.4 Inteligência artificial

Foi utilizada AdaptaOne, para revisão gramatical e para auxiliar na inteligibilidade e clareza do texto. Todos os conceitos científicos e achados desta tese foram elaborados pelos autores.

3.5 Modelo Animal

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos e saudáveis com peso variando de 300 a 420 gramas e idade média de 4 meses, obtidos e acompanhados durante a pesquisa no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP). Os animais foram acondicionados em caixas plásticas apropriadas, em temperatura controlada entre 22°C e 25°C, controle de luminosidade em ciclos de 12 h claro/escuro e umidade relativa de 50-60% com ventilação artificial. Foi oferecida ração e água “*ad libitum*”. A identificação dos animais foi realizada por meio de código alfanumérico.

Após a indução da EI, 72 animais com EI estabelecida foram então randomicamente divididos, com estratificação por peso para garantir a homogeneidade entre os grupos, em 03 grupos principais, (24 animais/grupo), conforme a modalidade de intervenção: a) Grupo controle (EI): não recebeu tratamento. b) Grupo PDT1: recebeu 1 única sessão de aPDT. c) Grupo PDT3: recebeu 3 sessões de aPDT.

Dentro de cada grupo principal, os animais foram subdivididos em 4 subgrupos (6 animais/subgrupo) para avaliação em diferentes pontos temporais:

1. **Subgrupo de Análise Imediata Microbiológica:** eutanásia imediatamente após o tratamento (ou não – grupo controle) para coleta do coração e exame microbiológico.
2. **Subgrupo de Análise Imediata Histológica:** eutanásia imediatamente após o tratamento (ou não – grupo controle) para coleta do coração e exame histológico.
3. **Subgrupo Sobrevida de Análise Microbiológica:** eutanásia ao 20º dia dos animais sobreviventes para coleta do coração e exame microbiológico.
4. **Subgrupo Sobrevida de Análise Microbiológica:** eutanásia ao 20º dia dos animais sobreviventes para coleta do coração e exame microbiológico.

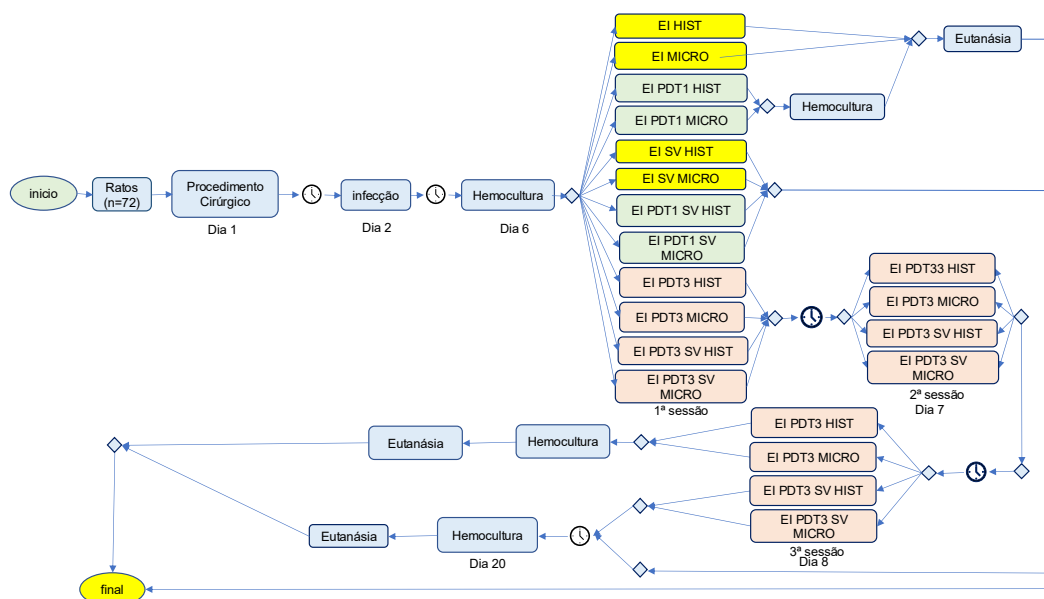
Exceto em casos em que o animal apresentava sofrimento, o momento da eutanásia foi determinado segundo os objetivos específicos de cada grupo, a saber imediatamente após a conclusão do tratamento proposto, ou ao 20º dia, como demonstrado no fluxograma a seguir (Figura 5).

Os animais foram submetidos a exames de sangue no 6º dia para avaliar a presença de disseminação hematogênica (5). O peso e a temperatura dos animais foram aferidos diariamente até o final do estudo. Da mesma forma, foram observados a respiração, a aparência física, o comportamento e o reparo do acesso cirúrgico.

3.6 Fluxograma do estudo

A Figura 5 exibe o fluxo da pesquisa a ser realizada.

Figura 5: Fluxograma do estudo. A cor amarela indica o grupo controle; a cor verde indica o grupo 1 sessão de tratamento e a cor salmão indica 3 sessões tratamento.



Fonte: o autor (2025).

3.7 Procedimento de calibração e validação do modelo experimental de endocardite infecciosa.

Para o diagnóstico da EI em modelos animais, a hemocultura é utilizada para indicar a etiologia microbiológica (119). No entanto, considerando o tempo necessário para obtenção do resultado da hemocultura (4 a 8 dias), o elevado índice de resultado falso-negativo (2-40% dos casos) (30,119), podendo atingir 71% dos casos (120–123), e o tempo limitado de acompanhamento dos animais durante a pesquisa (até 20 dias); tornou-se essencial a obtenção e validação de um grupo de referência com EI.

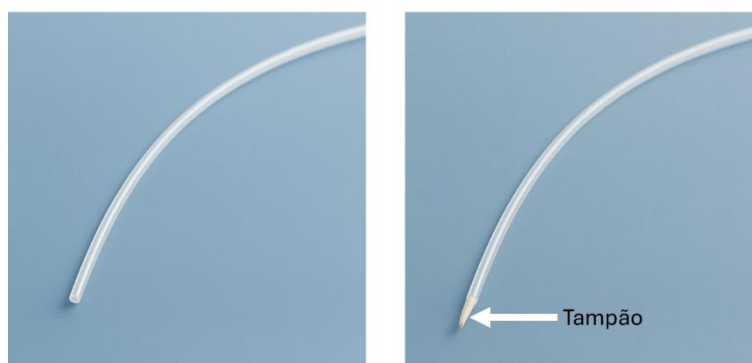
Para tanto, um grupo inicial de doze animais, foi submetido sequencialmente à cirurgia de indução do modelo de indução da doença preconizado por Hady *et al.* (2012) (106) e, 24 h após, à inoculação de microrganismos via cateter. Após 4 dias, foi realizada a eutanásia e exame microbiológico e histológico das valvas cardíacas, confirmando que todos os

animais haviam sido infectados com sucesso. O biomédico e patologista foram mantidos cegos para a realização das análises pelo Laboratório de Controle Sanitário e Genético do ICB – USP São Paulo e pela Histocell Soluções em Anatomia Patológica.

3.8 Preparo do cateter para cirurgia

O cateter de polietileno PE10 - BD foi preparado com comprimento de 10 cm, adequado para a faixa de tamanho dos animais selecionados, e uma das extremidades foi selada com tampão confeccionado manualmente em madeira compactada, a fim de evitar o sangramento durante o cateterismo (Figura 6).

Figura 6: Modelo de preparo do cateter



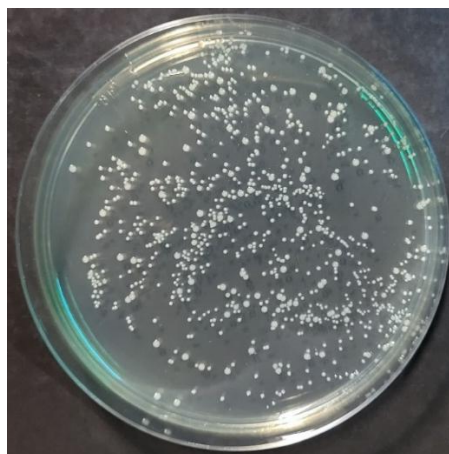
Fonte: o autor (2025).

3.9 Preparo dos microrganismos

Os microrganismos de eleição foram os *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, por se tratar de um microrganismo utilizado rotineiramente em testes de sensibilidade microbiana como controle positivo (124), sendo sensíveis a antibióticos padrão em testes de controle de qualidade (125). Apresentam-se como Cocos Gram positivos em cachos (“em cachos de uva”) (125).

Os microrganismos foram adquiridos no Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energético Nucleares da Universidade de São Paulo e preparado conforme Hady *et al.* (2012) (106). Em uma placa de ágar BHI foi inoculada uma porção de *S. aureus* com uma alça e incubada a 37°C durante 24 horas (Figura 7).

Figura 7: Cultura matriz de *Staphylococcus aureus*.



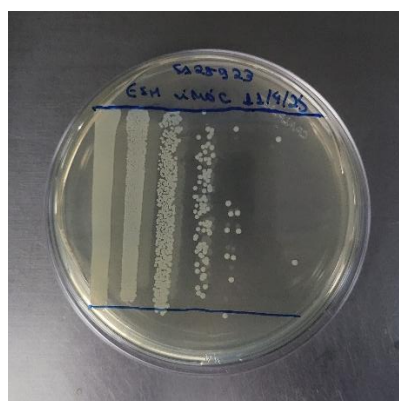
Fonte: o autor (2025).

Foi escolhida uma colônia da placa e inoculada em 5ml de caldo de BHI em um tubo Falcon de 15ml com tampa e incubada a 37°C, com 150 rpm durante 24 h. Então foi preparado o inóculo de uma suspensão bacteriana em tampão fosfato salino (PBS 1X). O meio de cultura contendo as bactérias foi centrifugado a 1.500 rpm a 24°C durante 10 m, o líquido foi descartado e o pellet de bactérias foi novamente suspenso em 5ml de PBS 1X, homogeneizado no vórtex. A concentração do inóculo bacteriano foi padronizada através do ajuste de 20% de transmitância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 640 nm. O volume dos inóculos foi de 50µl para cada animal na contagem de 10^4 a 10^6 UFC por animal.

Para quantificação dos microrganismos inoculados, foram realizadas diluições seriadas em uma placa de microtitulação. Inicialmente, 200µL do inóculo foram adicionados ao primeiro alvéolo. Nos alvéolos subsequentes 180 µL de solução PBS 1X foram previamente dispensados. O processo de diluição

seriada foi conduzido da seguinte forma: 20µL do inóculo foram transferidos do primeiro para o segundo alvéolo, resultando em uma diluição de 1:10. Após homogeneização, 20µL do segundo alvéolo foram transferidos para o terceiro, e assim sucessivamente, até completar um total de sete diluições seriadas. As sete diluições foram então semeadas em três placas de Petri contendo ágar, utilizando a técnica de gota (drop plate method). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada nas placas (Figura 8).

Figura 8 Contagem de Unidades formadoras de Colônia

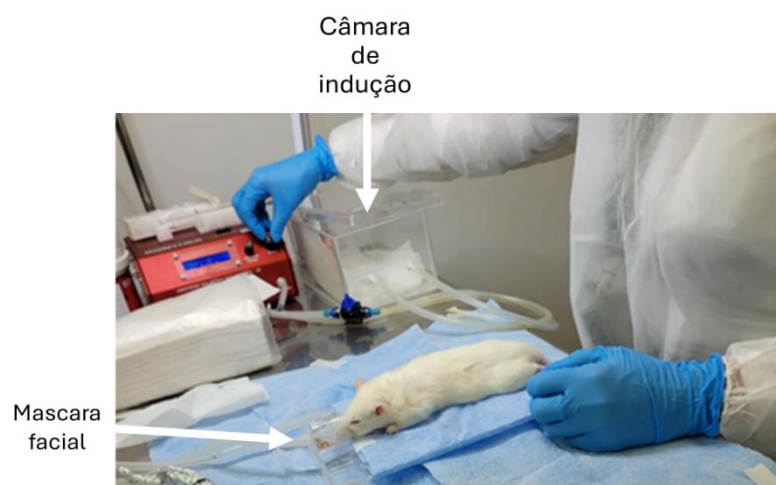


Fonte: o autor

3.10 Preparo pré-operatório e Anestesia

Os animais foram anestesiados por indução com Isoflurano a 2,5% (v/v) em uma mistura gasosa de 45% de oxigênio pela via inalatória. A indução anestésica foi realizada na câmara de indução e mantida por meio de máscara facial durante todo o procedimento (Sistema de anestesia inalatória de baixo fluxo por infusão – Bonther®) (Figura 9). O animal teve sua frequência respiratória e reflexos monitorados durante todo o procedimento.

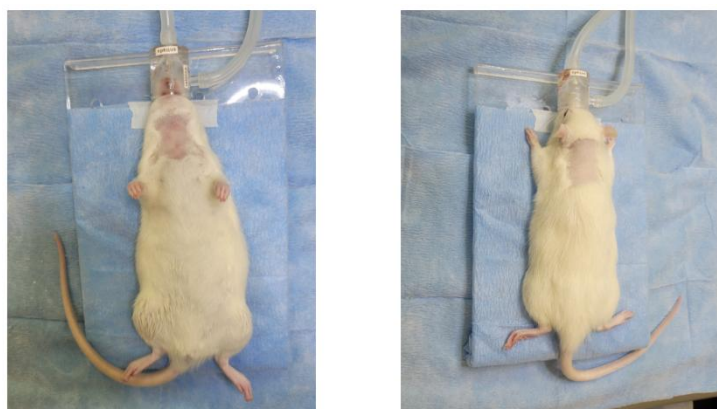
Figura 9 Mostra indução anestésica do rato, pesquisadora calibrando o sistema de anestesia.



Fonte: o autor (2025).

Após tricotomia, a área do pescoço, do queixo até logo abaixo do osso esterno, foi preparada com antissepsia e solução de iodopolvidona e etanol 70%. Foi realizada tricotomia também na região na região cervical, onde o cateter foi exteriorizado (Figura 10).

Figura 10: Mostra tricotomia realizada no pescoço e na região cervical.



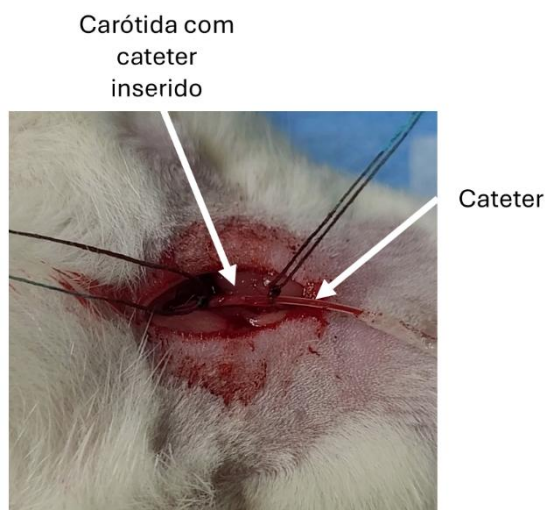
Fonte: o autor (2025).

3.11 Procedimento cirúrgico:

Este procedimento foi conduzido conforme o modelo experimental de Hady *et al.* 2012 (106). Utilizou-se uma técnica estéril durante todo o processo cirúrgico. Inicialmente, realizou-se uma incisão vertical (1-1,5 cm) transpassando apenas a camada dérmica, na região do pescoço, acima do osso esterno.

Com uma tesoura de dissecação romba, a fáscia foi cuidadosamente dissecada para expor a artéria carótida direita, utilizando 2 pares de pinças dentadas curvas. A artéria carótida direita foi então delicadamente elevada da cavidade cervical, e dois fios de seda de 10 cm foram colocados sob a artéria. A artéria foi ligada na sua extremidade cefálica exposta, e um clipe temporário foi aplicado na região proximal para controlar o sangramento. Em seguida, realizou-se uma pequena arteriotomia na parede anterior da artéria e, utilizando um introdutor de cateter (Becton Dickinson), um cateter (PE 10 Becton Dickinson) de forma retrógrada (contra o fluxo do sangue) até a valva aórtica (Figura 11).

Figura 11: Visão transoperatória a instalação do cateter na artéria carótida direita.

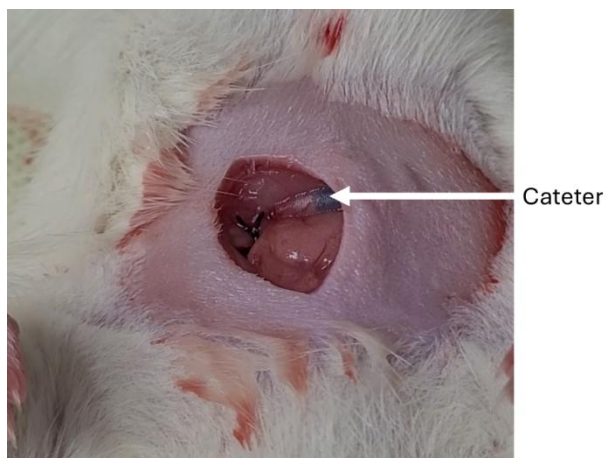


Fonte: o autor (2025).

O cateter foi fixado com fio de sutura de seda na extremidade caudal da artéria. A correta inserção e posição do cateter foram guiados e confirmados pelos seguintes critérios: a) o comprimento inserido (4 a 6 cm) ajustado ao

tamanho do animal; b) resistência percebida ao avanço; e c) pulsação do cateter em sincronia com os batimentos cardíacos (Figura 12).

Figura 12: Cateter posicionado e fixado na artéria carótida direita.



Fonte: o autor (2025).

Os excedentes de sutura foram aparados e a hemostasia no sítio de inserção do cateter foi certificada. As pontas livres dos fios de sutura foram posicionadas sob a pele, e a incisão cervical foi suturada com fio de seda Ethicon® 4.0. A extremidade distal do cateter foi exteriorizada no dorso do animal por meio de acesso subcutâneo e fixada à pele com sutura para manter sua posição (Figura 13).

Figura 13: Mostra uma extremidade do cateter exposta no dorso do animal, fixada por sutura.



Fonte: o autor (2025).

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, mantidos em ambiente aquecido e com acesso *ad libitum* a água e alimento até completa recuperação anestésica. Durante e após a recuperação da anestesia, os ratos foram monitorados continuamente.

Todos os animais receberam analgesia pós-operatória consistindo em Cloridrato de Tramadol 2% (Cronidor®) na dose de 15mg/kg de peso corporal, associado a Meloxicam 0,2% na dose 04mg/kg de peso corporal. Ambos os fármacos foram administrados por via subcutânea a cada 24 h iniciando imediatamente após o procedimento cirúrgico e continuando até o quinto dia pós-operatório (126).

3.12 Infecção com microrganismos

A infecção com *S. aureus* foi realizada 24 h após a colocação do cateter (103), com o animal anestesiado com Isoflurano volume de 2,5 em oxigênio a 50%.

Após realizar a antissepsia da região do cateter no dorso do animal com etanol 70%, foram inoculados 50 µl de microrganismos em uma concentração de 10^4 e 10^6 . A inoculação foi feita via extremidade dorsal do cateter, utilizando uma agulha hipodérmica (Figura 14). É importante salientar que devido à classificação de *Staphylococcus spp.* como microrganismo de nível de biossegurança 2 (BSL2), com risco potencialmente moderado para o pessoal e o meio ambiente, todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com as rigorosas diretrizes de biossegurança.

Figura 14: Inoculação via cateter.



Fonte: o autor (2025).

3.13 Tratamento preconizado para EI

A fim de avaliar o efeito isolado da aPDT, nenhum animal recebeu tratamento antibiótico adicional.

3.14 Hemocultura

Para avaliar a presença de infecção (30), a coleta de amostras de sangue foi realizada em momentos distintos. A primeira coleta ocorreu no 4º dia após a inoculação dos microrganismos. Nos grupos de tratamento, uma coleta adicional foi feita após a conclusão da única ou última sessão de tratamento. Em todos os

animais, a última coleta foi feita no momento da eutanásia, via punção cardíaca. Para cada coleta, 1 mL de sangue foi colhido da veia lateral caudal, após anestesia com 2,0% de Isoflurano e 80% de oxigênio. Considerando o alto índice de possíveis resultados falso-negativos (entre 2 e 40% dos casos) (119), as amostras de sangue foram mantidas em incubadoras por um período de 1 a 8 dias, para confirmar a formação ou ausência de colônias (119).

Assim, para confirmar a veracidade dos resultados, as análises microbiológicas do sangue e das valvas dos animais foram conduzidas no Centro de Laser e Aplicações – IPEN e no Laboratório de Controle Sanitário e Genético do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (LCS-USP).

3.15 Definindo o momento da irradiação

Com base na análise de sobrevida dos ratos Wistar com EI, nos resultados da hemocultura apresentados e em dados da literatura (49), determinou-se que o sexto dia era o momento ideal para iniciar a aPDT. Neste ponto, a maioria dos animais encontrava-se infectada e viva. O cronograma experimental é detalhado na Tabela 2.

Tabela 2: Cronograma da prática em Biotério. EI (EI), aPDT 1 sessão (PDT1), aPDT 3 sessões (PDT3) e sobrevida (SV).

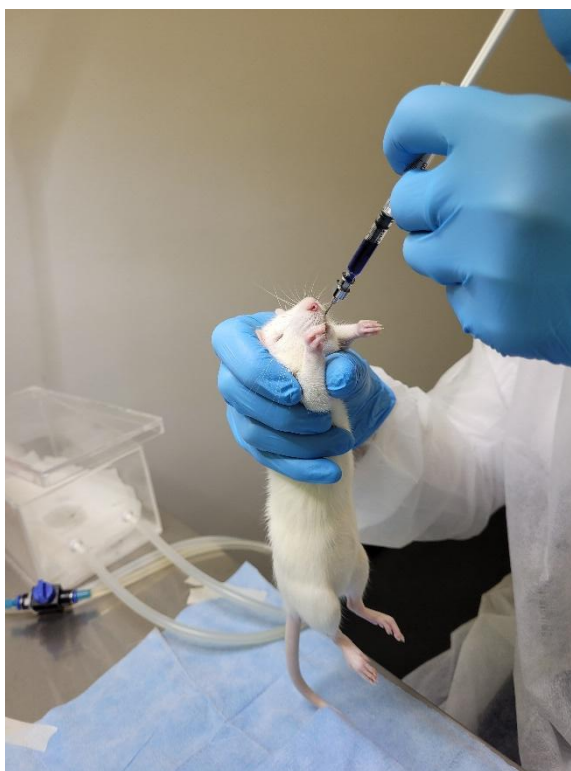
Grupos	Dias / Procedimento											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	20
EI	CIRURGIA	INFECÇÃO				EUTANASIA						
EI SV	CIRURGIA	INFECÇÃO										EUTANASIA
PDT 1 sessão	CIRURGIA	INFECÇÃO				PDT +EUTANASIA						
PDT1 sessão SV	CIRURGIA	INFECÇÃO				PDT SV						EUTANASIA
PDT 3 sessões	CIRURGIA	INFECÇÃO				PDT	PDT	PDT+EUTANASIA				
PDT 3 sessões SV	CIRURGIA	INFECÇÃO				PDT	PDT	PDT				EUTANASIA

Fonte: o autor (2025).

3.16 Administração do fotossensibilizador:

Nos grupos submetidos à aPDT, o azul de metileno foi administrado via oral, por gavagem (Figura 15). A concentração utilizada foi de 10mg/kg de peso corporal, diluída em solução salina a 0,9%, resultando em um volume final de 1mL/kg de peso do animal. A administração ocorreu 60 min antes da irradiação, em dose única por sessão, a fim de alcançar a concentração máxima do fotossensibilizador no coração e na circulação sanguínea (127,128).

Figura 15: Administrando azul de metileno via gavagem.



Fonte: o autor (2025).

3.17 Terapia Fotodinâmica Transtorácica.

O tratamento foi realizado com LED com potência radiante média de 600 mW, operando em um comprimento de onda de 660 (± 20) nm. Este comprimento de onda possui maior absorção pelo azul de metileno, além de ser menos absorvida por cromóforos endógenos. Cada sessão teve duração de 600 s.

Conforme o grupo experimental (Tabela 3), o regime de tratamento consistiu em uma única sessão no 6º dia após a cirurgia ou em três sessões consecutivas (6º, 7º e 8º dias após a cirurgia). O aparelho utilizado foi um protótipo desenvolvido pelo Prof. Dr. Alessandro Melo Deana para este projeto. A escolha dos parâmetros radiométricos foi baseada em trabalhos pregressos do grupo nos quais foi necessária a irradiação através dos tecidos (129).

Tabela 3 Parâmetros do LED

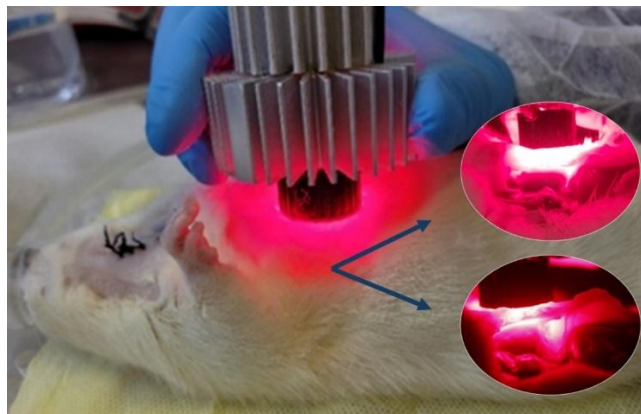
Parâmetro	LED
Comprimento de onda central (nm)	660±20
Largura espectral - FWHM (nm)	20
Modo de operação	Continuous
Potência radiante média (mW)	600
Polarização	Random
Diâmetro da abertura (cm)	0.95
Perfil do feixe	Top hat
Área do feixe no alvo (cm ²)	2.8
Irradiância no alvo (mW/cm ²)	214
Tempo de exposição (s)	600
Exposição radiante (J/cm ²)	129
Energia radiante (J)	360
Técnica de aplicação	Transtorácica, em contato
Número e frequência das sessões	1 ou 3 sessões, diariamente.

Fonte: o autor (2025)

Após anestesia, o rato foi posicionado em decúbito dorsal, foi realizada tricotomia no tórax para otimizar o contato entre a ponta ativa do LED e a pele do animal e realizado a higiene com álcool 70%. O aparelho calibrado foi então acionado e a irradiação foi aplicada sobre a área cardíaca correspondente a uma

área de 2,8 cm², com o objetivo de irradiar a estrutura infectada (Figura 16). Com auxílio de termômetro, observou-se o não aquecimento da área durante a irradiação.

Figura 16: Mostra a aPDT transtorácica realizada na região das valvas cardíacas.



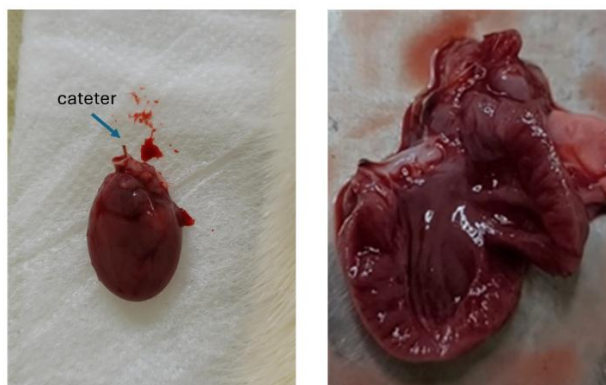
Fonte: o autor (2025).

3.18 Término do tratamento.

Ao 20º dia, após coleta de sangue por punção cardíaca, todos os animais pertencentes aos grupos de sobrevida foram eutanasiados por meio da administração intraperitoneal de uma dose letal de anestésico (Cetamina 300 mg/kg + Xilazina 30 mg/kg). Após eutanásia, as valvas cardíacas foram coletadas e acondicionadas em Eppendorf contendo 1 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) para análise histológica ou microbiológica conforme a designação de cada grupo (Figura 17).

Para remoção do coração, o animal foi posicionado em decúbito dorsal, e o tórax higienizado com álcool 70%. Em seguida, foi realizada uma incisão em forma de V no peito, abaixo do osso esterno. Mediante ao corte da cartilagem das costelas bilateralmente ao esterno, o coração foi exposto. Para dissecar e liberar o órgão, ele foi tracionado superiormente e o corte final foi efetuado próximo à aorta (Figura 17).

Figura 17: Remoção do coração e valvas para análise histológica e microbiológica.



Fonte: o autor (2025).

Os animais que exibiam sinais de sofrimento agudo decorrente de um quadro infeccioso, independentemente da fase experimental, foram eutanasiados e suas amostras foram coletadas para análise.

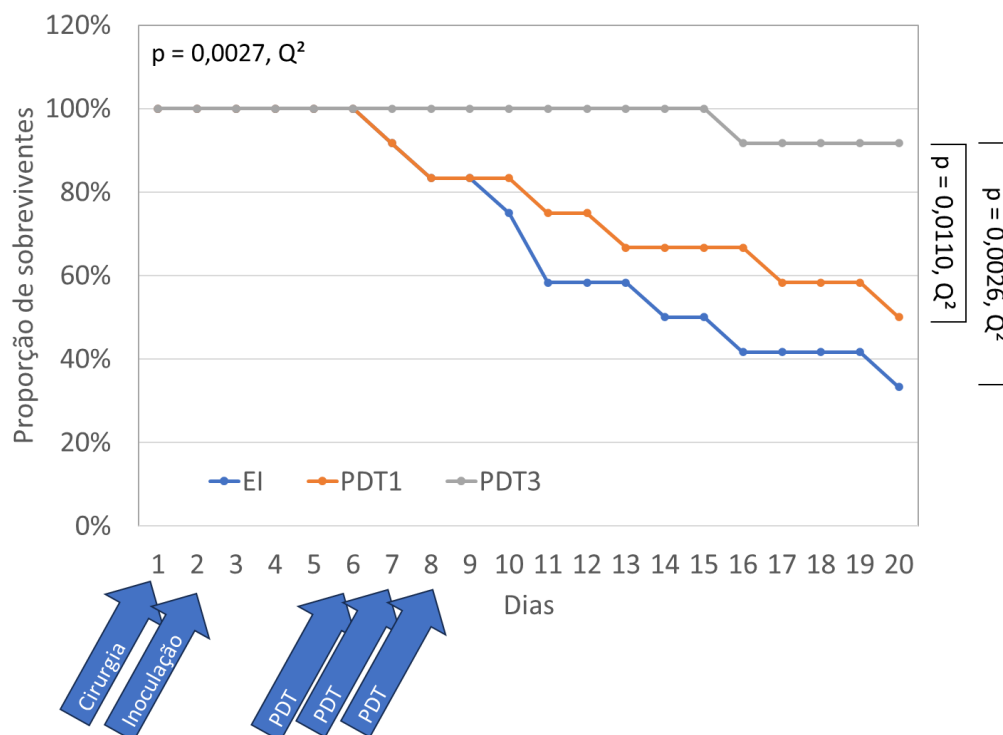
4 RESULTADOS

4.1 Análise de sobrevida

Para análise de sobrevida, os grupos observados referem-se aos animais acompanhados durante 20 dias, período estabelecido pela pesquisa, pertencentes aos três modos de tratamento (EI n=12, PDT1 n=12 e PDT3 n=12). No grupo EI (EI), os animais exibiram uma sobrevida média de aproximadamente seis dias. A eutanásia foi realizada ao surgimento dos primeiros sinais clínicos de infecção, que incluíam perda de peso superior a 20%, postura encolhida, prostração, tremores e letargia. A infecção foi posteriormente confirmada por exames microbiológicos e histológicos das valvas cardíacas.

A análise de Kaplan-Meier (Figura 18) demonstrou taxas de sobrevida de 33,33% no grupo EI, 50% no PDT1 e 91,66% no PDT3. O teste do qui-quadrado indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0027$). A análise *post-hoc* revelou diferença significativa entre PDT3 e EI ($p = 0,0026$, teste de qui-quadrado), e entre PDT1 e PDT3 ($p=0,0110$, teste Q^2), enquanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos EI e PDT1 ($p = 0,3800$, teste qui-quadrado).

Figura 18: Curva de Kaplan Meier compara o tempo sobrevida dos animais.



Fonte: o autor (2025).

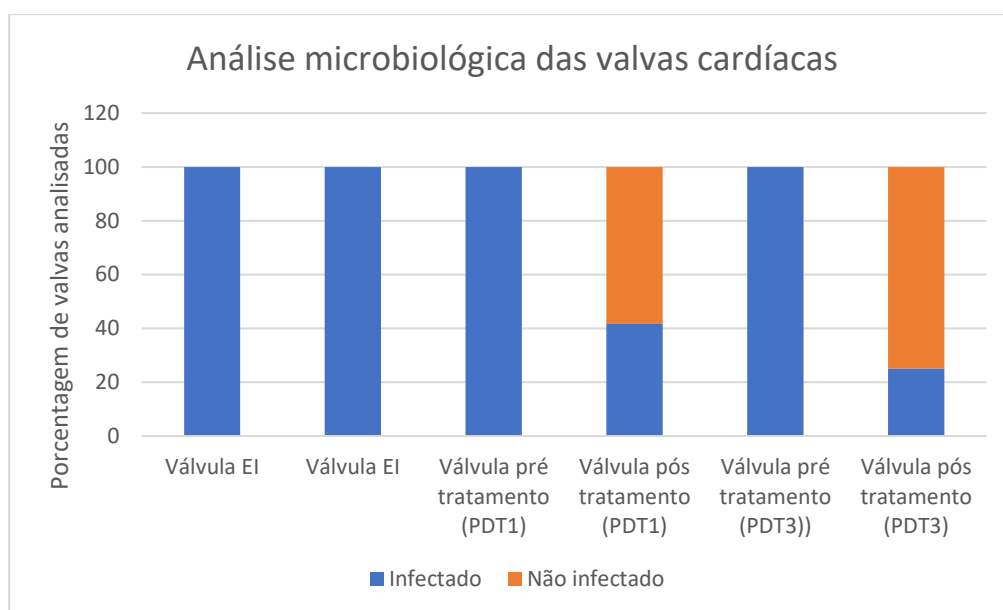
4.2 Análise microbiológica

Foi realizada uma análise microbiológica das valvas aórticas de todos os animais pertencentes aos grupos de sobrevida, coletadas em ambiente estéril. A análise considerou os três folhetos valvares, pois, no momento cirúrgico, não foi possível pré-determinar em qual folheto valvar o cateter ficaria justaposto. Após coleta, as valvas foram maceradas e colocadas em um Eppendorf com um mililitro de meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI). Foram incubadas por 24 horas a 37°C em 150 rotações por minuto. Então, 50 µL foram semeados em placa de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente, permanecendo na incubadora a 37°C de 1 a 8 dias. A porcentagem de valvas isentas de

microrganismos nos grupos EI, PDT1 e PDT3 foi de 0%, 58,33% e 75% respectivamente, independentemente de o animal ter sobrevivido até o 20º dia.

A Figura 19 apresenta um gráfico de barras que ilustra a porcentagem de animais com infecção bacteriana valvar confirmada (Figura 19).

Figura 19: Gráfico de barras da porcentagem de animais infectados antes e após o tratamento a partir da análise microbiológica das valvas cardíacas.



Fonte: o autor (2025).

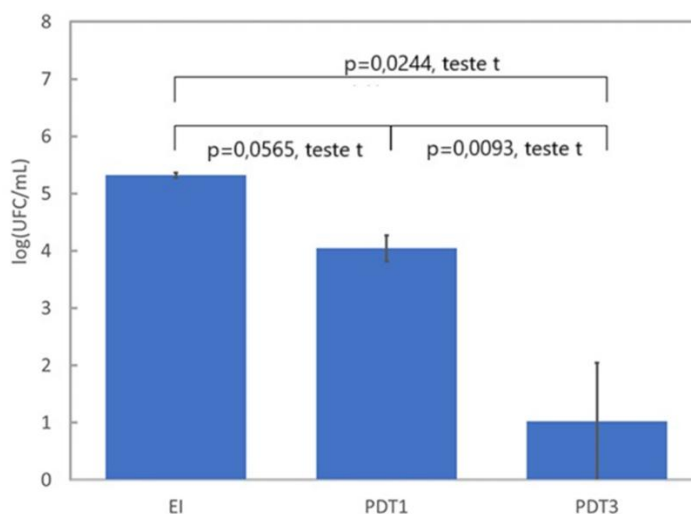
Na análise intragrupos, observamos que não há indícios de diferença significativa no grupo EI entre os animais infectados do início e no final dos 20 dias ($p = 1,0000$, teste de McNemar). Inicialmente, o hemograma mostrou que todos os 72 animais estavam infectados. No exame das valvas cardíacas *post mortem*, todos os animais do grupo EI estavam infectados. Após 20 dias, a análise das valvas cardíacas do grupo PDT1 pós-tratamento mostrou 5 animais infectados e 7 não infectados ($p = 0,233$, teste de McNemar). No grupo PDT3, foram observados apenas 3 animais ainda infectados após 20 dias ($p = 0,0077$, teste de McNemar), sugerindo uma redução significativa de animais infectados após uma e três sessões de aPDT.

Na análise entre grupos no final do período, observou-se uma diferença significativa entre a porcentagem de valvas infectadas entre o grupo controle e

os grupos tratados ($p = 0,0046$ e $p = 0,0003$ para a comparação com o grupo PDT1 e PDT3, respectivamente, Teste de Fisher), entretanto foi observada ausência de diferença significativa entre os grupos PDT1 e PDT3 ($p = 0,6668$, Teste de Fisher).

Para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), considerando que o tempo de incubação das hemoculturas variou entre um e oito dias, adotou-se uma padronização: apenas as colônias que apresentaram crescimento após 24 h de incubação a 37°C, foram incluídas na análise microbiológica. Inicialmente, alíquotas de 10 μL foram empregadas para o plaqueamento. Contudo, no caso em que as amostras não exibiam UFC, uma alíquota maior (50 μL) era então utilizada, visando otimizar a precisão e a confiabilidade da contagem (130). Por fim, foi realizada uma mudança de variável para UFC/mL e obtido o logaritmo de base 10 e calculadas as médias das contagens, conforme pode ser observado nas figuras (Figura 20).

Figura 20: Concentração de UFC após 24h.



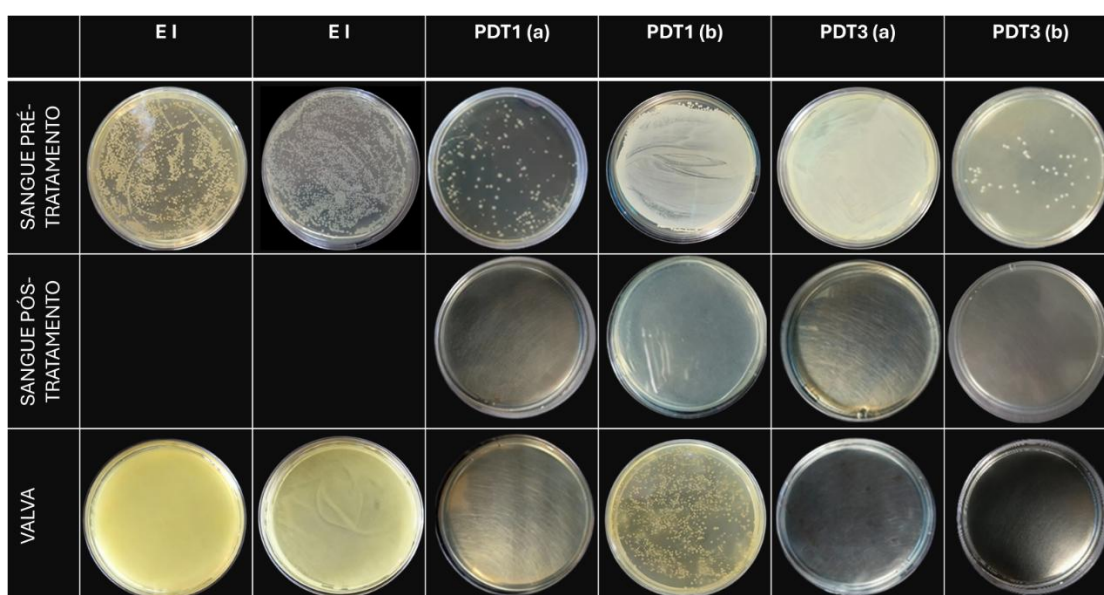
Fonte: o autor (2025).

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para comparar as médias entre três grupos experimentais: EI, PDT1 e PDT3. O teste indicou diferença

estatisticamente significativa entre os grupos ($F = 13,32$; $p = 0,0020$), evidenciando que pelo menos uma das médias difere das demais.

Para identificar quais grupos apresentaram diferenças específicas, foi aplicado o teste post hoc de Tukey (HSD). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos EI e PDT1 ($p = 0,056$), indicando comportamento semelhante entre essas duas condições. No entanto, observou-se diferença estatisticamente significativa entre EI e PDT3 ($p = 0,002$) e entre PDT1 e PDT3 ($p = 0,009$), demonstrando que o grupo PDT3 apresentou valores médios significativamente menores que os demais. A Figura 21 mostra uma imagem representativa das placas de hemocultura.

Figura 21: Crescimento bacteriano após 24 h na incubadora.



Fonte: o autor (2025).

A Figura 21 apresenta o crescimento bacteriano em placas de Petri, discriminado para 3 de coleta diferentes (pré-tratamento, pós-tratamento e valvas cardíacas), e abrangendo os grupos de tratamento PDT1 e PDT3, além do grupo controle EI. No grupo EI observou-se bacteremia sanguínea com uma quantidade tão elevada de UFC que resultou em confluência na placa.

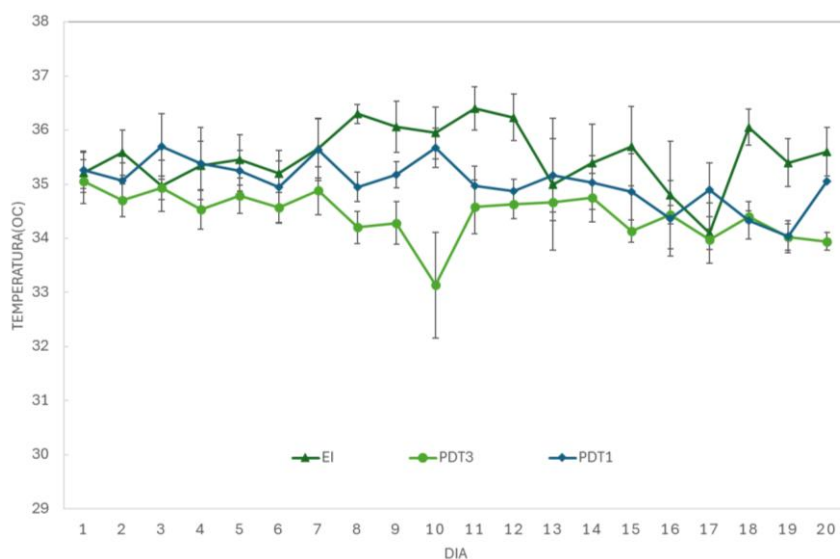
Para o grupo PDT1 (uma sessão de tratamento) a análise do animal (a) apresentou uma carga microbiana reduzida na amostra de sangue inicial. Na amostra de sangue pós-tratamento e nas valvas não se revelou o crescimento de UFC. Neste caso, uma única sessão de PDT pareceu eliminar os microrganismos do sangue e valvas. Entretanto, a análise do outro animal do mesmo grupo, PDT1(b), mostrou uma significativa bacteremia inicial, que foi reduzida na amostra de sangue pós-tratamento e valvas, indicando que 1 sessão de aPDT não foi suficiente para eliminar os microrganismos.

No grupo PDT3 (três sessões de tratamento), o animal (a), apesar de apresentar elevada concentração de UFC no sangue pré-tratamento, demonstrou que 3 sessões de aPDT foram capazes de eliminar os microrganismos. Similarmente, o animal do grupo PDT3 (b), que exibiu um pequeno crescimento bacteriano reduzido na amostra pré-tratamento, as 3 sessões de aPDT também resultaram na eliminação dos microrganismos.

4.3 Análise da Temperatura e Peso

A temperatura retal e o peso corporal foram aferidos diariamente. Para a mensuração da temperatura, os animais foram colocados em um tubo de contenção (Restrainer), permanecendo imobilizados para a introdução segura do termômetro veterinário. Para aferir o peso corporal, o imobilizador foi pesado previamente, permitindo o desconto do seu valor no cálculo final. Considerando os valores médios diário dos grupos, embora o grupo EI tenha apresentado valores mais elevados de temperatura, apresentou certa estabilidade ao longo do período. O grupo PDT1 apresentou temperaturas mais baixas com acentuada queda nos dias 5 e 10. O grupo PDT3 foi mais estável que o grupo PDT 1, com valores médios de temperaturas pouco superiores a PDT1, porém mais baixas que o grupo EI (Figura 22)

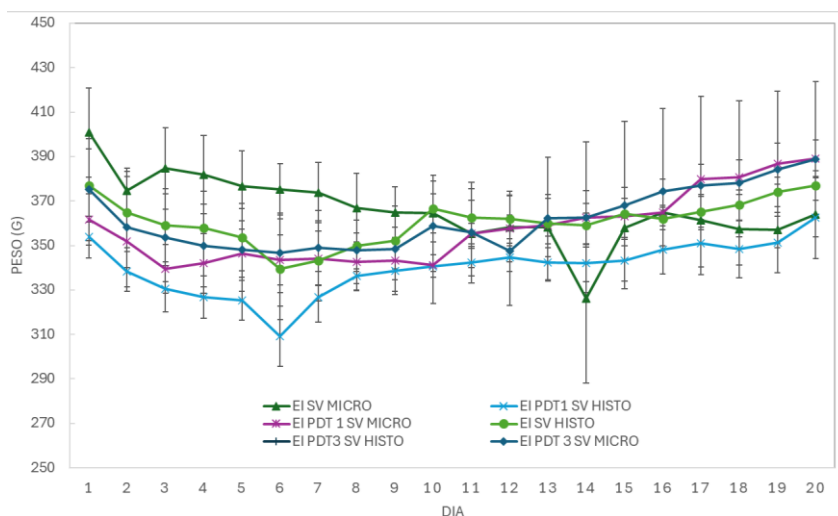
Figura 22: Gráfico apresenta a média dos valores da temperatura retal dos grupos EI, PDT1 e PDT3 ao longo de 20 dias.



Fonte: o autor (2025).

A média diária do peso dos animais mostrou que o grupo EI apresentou acentuada perda de peso e não foi capaz de recuperá-lo. Os grupos PDT1 e PDT3 apresentaram inicialmente perda de peso, mas no 20º dia, não apenas recuperaram seu peso, como ultrapassaram o peso inicial, superando o desempenho do grupo EI (Figura 23).

Figura 23: Gráfico apresenta a média de peso corporal dos grupos EI, PDT1 e PDT3 ao longo de 20 dias.

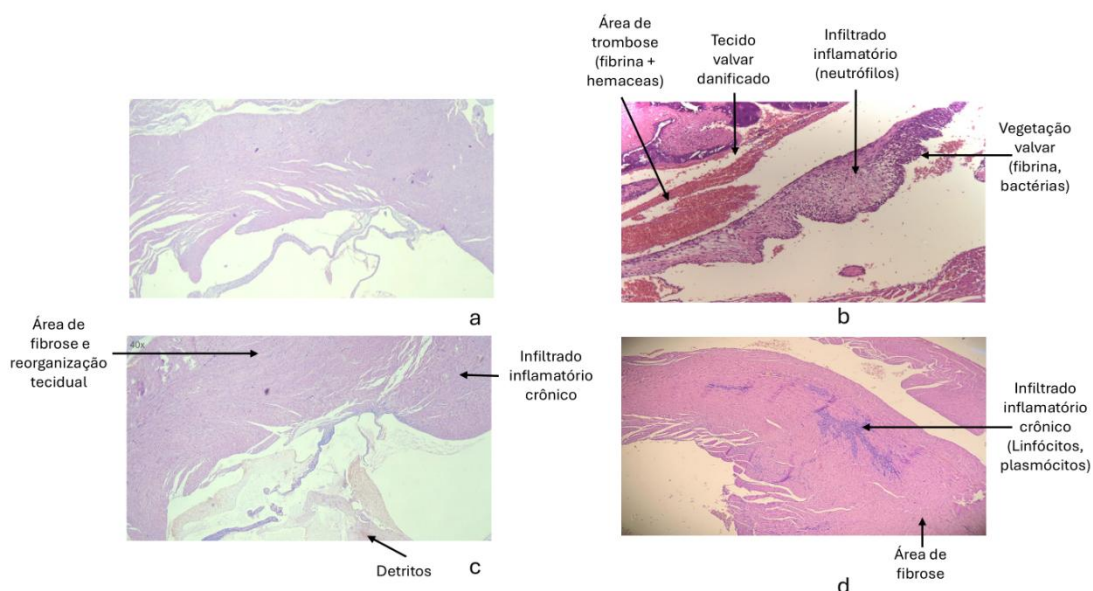


Fonte: o autor (2025).

4.4 Análise Histológica

A Figura 23 compara os achados histológicos de uma valva saudável, com aqueles observados nos grupos EI, grupo que recebeu 1 sessão de tratamento (PDT1) e grupo que recebeu 3 sessões de tratamento. A análise considerou os três folhetos da valva aórtica, escolhendo sua porção mais afetada. Empregou-se a coloração hematoxilina e eosina (HE). Foram realizadas capturas representativas, pois a posição de cada amostra utilizando o sistema Optican O500R, objetiva de 4X, aumento total de 40 vezes (Figura 24).

Figura 24: Análise histológica das valvas nos diferentes grupos: a) valva saudável; b) grupo EI; c) grupo PDT1 e d) grupo PDT3.



Fonte: o autor (2025).

Na análise da figura 23 observa-se:

- a) A valva exibe arquitetura e contornos preservados, com espessura delgada. Não há evidência de infiltrado inflamatório, trombos, material fibroso, necrótico, vegetações ou colônias bacterianas. O aspecto rosa homogêneo é indicativo de colágeno organizado e tecido conjuntivo fibroso denso.
- b) A valva com EI exibe arquitetura desorganizada devido à atividade, além de espessamento significativo. Observa-se a presença de

infiltrado inflamatório exuberante predominantemente composto por neutrófilos, característico da fase aguda. Há também um acúmulo amorfo eosinofílico, misturado a glóbulos vermelhos, fibrina e detritos celulares, componentes típicos da vegetação infecciosa. Adicionalmente, são notados material necrótico e trombos.

- c) A valva submetida a uma sessão de tratamento (PDT1), apresenta área de fibrose e reorganização tecidual na região superior direita, a presença de detritos e fibrina no terço inferior direito e centro, que sugere persistência bacteriana ou sequela.
- d) A valva submetida a três sessões de tratamento (PDT3), apresenta infiltrado inflamatório crônico, caracterizado pela presença de linfócitos e plasmócitos. Observam-se áreas de fibrose, compatíveis com reparo tecidual pós-infeccioso e substituição por colágeno (hipocelular). Não há evidência de colônias bacterianas.

5 DISCUSSÃO

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com cerca de quatro meses e 420g. Observou-se mortalidade de 45% relacionada à anestesia durante os procedimentos cirúrgicos e experimentais, pois a contenção manual do animal em vigília, poderia levar a ruptura da sutura cirúrgica, além do posicionamento da porção exteriorizada do cateter. De acordo com Gibson *et al.* (2007) cerca de 30% dos animais podem evoluir ao óbito devido a complicações anestésicas (131), indicando uma limitação do estudo. Doze animais foram necessários para estabelecer o modelo experimental e quatro não sobreviveram às 24 horas pós-cirurgia. Houve necessidade de solicitar ao Comitê de Ética no Uso de Animais IPEN/CNEN-SP um acréscimo de 67% no número de animais inicialmente aprovados.

A padronização de um modelo animal de EI foi necessária devido ao tempo necessário para detecção da infecção por hemocultura (1 a 8 dias). Como descrito na literatura, o trauma valvar causado pelo cateter, associado à infecção por *S. aureus* favorece o desenvolvimento de EI (74), conforme já demonstrado em modelos animais (132). Assim, adotou-se o modelo proposto por Hady *et al.* (2012) (106), validado pela análise microbiológica das valvas cardíacas em laboratório independente (LCS, ICB – USP).

Estudos prévios demonstram eficácia da aPDT contra *S. aureus* e MRSA. Maliszewska *et al.* (2023) observaram que três sessões de aPDT com azul de metileno e laser de 665 nm, promovem redução expressiva de MRSA. Em concordância, o presente estudo demonstrou que uma única sessão de PDT é suficiente para reduzir significativamente a concentração de UFC (92%), no entanto, três sessões de aPDT resultam em uma redução média de 99,99% das UFC, incluindo erradicação completa da infecção em parte dos animais.

Com relação à sobrevida, segundo a literatura, 30% dos pacientes com EI vão a óbito nos primeiros 30 dias (1) e o uso prolongado de antibióticos específicos pode elevar a sobrevida em até 50% (133). Neste estudo, a aPDT com LED 660 nm e azul de metileno resultou em 50% de sobrevida após uma

sessão (PDT1) e 91,66% após três sessões (PDT3), sem necessidade de identificação prévia do microrganismo. Estes achados sugerem uma redução significativa no tempo terapêutico, tradicionalmente de duas a seis semanas (19).

A contagem das unidades formadoras de colônias é o método padrão-ouro para a quantificação de microrganismos viáveis. Em modelos animais de EI, Ring *et al.* (2014), demonstraram que inoculações entre 10^4 e 10^6 UFC, realizadas 24 horas após a cirurgia, induzem infecção valvar com cargas elevadas (134), enquanto Köse *et al.* (2021) e Schwartz *et al.* (2020), relataram crescimento bacteriano expressivo após a inoculação de 10^5 UFC (107), (103). No presente estudo, inoculações de 10^4 e 10^6 UFC, produziram médias de log10 de 5,32 UFC/mL no grupo EI, comprovando o estabelecimento da infecção inicial.

Köse *et al.* (2021) relataram 28,5% de mortalidade no 3° dia pós-infecção (107), enquanto Santoro *et al.* (1978), observaram taxas de 19%, 42% e 82% após 7, 10 e 14 dias, respectivamente. No presente estudo, a mortalidade no grupo sem tratamento (EI) foi de 91,66%, 50% e 33,33% na primeira, segunda e terceira semanas após a inoculação de 10^4 e 10^5 UFC, respectivamente. A média de sobrevida foi de 8,45 dias, corroborando e ampliando dados prévios que relatam sobrevida entre dois a cinco dias em modelos experimentais sem tratamento específico (107–109,134,135)

Salehpour *et al.* (2016) mostrou que a irradiação transcraniana com laser 630 nm foi capaz de atravessar as camadas de revestimento do crânio bem como a cortical óssea e chegar ao lobo pré-frontal com energia igual a $1,18 \pm 0,01$ J/cm² (85). Zhang *et al.* (2021), observou através da irradiação transtorácica com LED 630 nm, que fatores de melhora da insuficiência cardíaca em ratos são promovidos (90). Durante este experimento, foi utilizado um LED 660 nm, aplicado sobre o tórax do animal. Embora parte da energia seja absorvida ou desviada pelos tecidos da pele ou dos músculos, uma porção dessa luz conseguiu atravessar o tórax do animal, penetrar entre as costelas e chegar ao coração. Na fotobiomodulação, cálculos baseados em modelos de propagação

da luz em tecidos (136,137), indicam que, nas condições utilizadas – potência de 600mW, irradiância de 214mW/cm² e aplicação de 600 segundos – entre cinco e vinte por cento de luz pode chegar até as valvas cardíacas dos ratos. Essa quantidade de energia corresponde a uma dose de 6 e 26 J/cm² (138,139).

A taxa de sobrevida dos animais tratados com três sessões de aPDT (PDT3) foi de 91,66% ao 20° dia, significativamente superior ao grupo controle (EI), cuja sobrevida média foi de apenas seis dias e 33,33% ao 20° dia. O grupo PDT1 apresentou 50% de sobrevida, valor semelhante ao melhores resultados relatados na literatura obtidos em estudos com uso prolongado de antibióticos específicos (107,133). A aPDT realizada em três sessões elevou a sobrevida em 83,32% em relação à terapia antibiótica, sugerindo potencial clínico relevante, especialmente frente à infecção por *S. aureus*, uma vez que a aPDT não induz resistência microbiana (140,141). Até onde sabemos, esta é a maior taxa de sobrevivência já reportada na literatura para esta patologia.

A eliminação completa de bactérias em valvas cardíacas infectadas é um desafio clínico, já que os protocolos convencionais com uso de antibióticos exigem de duas a seis semanas de tratamento contínuo (142), devido à presença de biofilme (11,25). No presente estudo, a aPDT reduziu significativamente a carga bacteriana, com eliminação total em 75% dos animais do grupo PDT3 e redução significativa no grupo PDT1. Esses achados corroboram estudos *in vitro* que demonstram a eficácia da aPDT contra *S. aureus* e cepas resistentes à meticilina (MRSA) (143). A originalidade deste estudo está em demonstrar pela primeira vez (até onde sabemos), a eficácia da aplicação *in vivo* e transcutânea da aPDT, no tratamento de EI, evidenciando seu potencial translacional.

Neste estudo, a contagem de UFC em amostras obtidas antes da eutanásia do animal e que foram incubadas por 24 h após coleta, revelou que a média logarítmica dos grupos EI, PDT1 e PDT3 foi log 5,32, log 4,13 e log 4,09, respectivamente, sendo maior o número de UFC no grupo EI e menor no grupo PDT3. Ghaiyoomi *et al.* (2025), observara maior redução do número de UFC de *Streptococcus sanguinis* tratados *in vitro* com aPDT com laser 660 nm associada ao azul de metileno. A menor média logarítmica obtida (log 1,54) em comparação

aos demais tratamentos, incluindo o principal tratamento do estudo que associava aPDT, azul de metileno e plasma atmosférico frio no tratamento *in vitro* (log 1,59) (115).

Na análise das placas de Petri, o grupo PDT1 apresentou crescimento denso na hemocultura pré e após o tratamento, enquanto outro, com menor densidade inicial, não apresentou crescimento bacteriano pós-tratamento nem nas valvas. Esses achados corroboram literatura, que destaca a influência da carga bacteriana na eficácia terapêutica (103,107–109). No grupo PDT3 independentemente da carga inicial, não houve crescimento bacteriano após o tratamento evidenciando maior efetividade da aPDT.

A análise histológica das valvas reforçou a eficácia da terapia. Embora a literatura descreva que, mesmo após a eliminação microbiológica, podem persistir nas valvas, alterações estruturais e vegetações sem infecção ativa (144), e que os antibióticos podem limitar a destruição tecidual, mas não restaurar sua integridade (25,28,45). Os animais do grupo PDT3 apresentaram valvas com arquitetura preservada, sinais de reparo, ausência de inflamação, ausência de colonização bacteriana e necrose. Já o grupo PDT1 exibiu necrose e desorganização estrutural, porém menos intensas do que no grupo controle. Assim, a terapia não apenas reduz a carga bacteriana, mas favorece a preservação e recuperação tecidual. Esse efeito é coerente com evidências de que a aPDT gera espécies reativas de oxigênio capazes de ativar células-tronco, modular a inflamação e promover remodelação de colágeno contribuindo para a cicatrização (145,146). Este é um achado relevante.

Infecções por *S. aureus* são consideradas difíceis de tratar. Estes microrganismos são reconhecidos por sua grande capacidade de tornar-se rapidamente resistente aos tratamentos antibióticos (147). Desta forma, foi necessário conter o uso indiscriminado de antibióticos, os quais tornaram o microrganismo resistente aos antibióticos padrão (147), sendo necessário desenvolver novos antibióticos. Mas, com o tempo, esses são vencidos pela resistência microbiana. Segundo Grunenwald *et al.* (2018), a aPDT não considera o perfil de resistência do microrganismo (32), bem como não favorece

mutações ou que o microrganismo se torne resistente a terapia (148). Neste estudo o tratamento realizado em três sessões, a aPDT eliminou o microrganismo, independentemente de o perfil de resistência poder ser alterado nas sessões anteriores.

Na cirurgia cardiológica, o azul de metileno está presente em procedimentos onde é necessário restaurar o tônus vascular, sendo um agente evidenciador seguro, com farmacocinética bem estabelecida (149–152). Sabe-se que, por via gastroesofágica, atinge a concentração ideal no coração em cerca de uma hora (128). Assim, foi escolhido como fotossensibilizador, dada a sua forte absorção por LEDs entre 600-700 nm (153–155), faixa pouco absorvida pela melanina e hemoglobina, favorecendo a penetração tecidual. Esse espectro se mantém dentro da janela equilibrando eficácia e toxicidade (156–158), além de ser compatível com equipamentos de baixo custo e dispositivos customizáveis, como fibra óptica (159). A literatura também apoia de uso da via gastroesofágica (160) e o desenvolvimento de micro LEDs para aPDT em regiões específicas do corpo (161). Desta forma, a administração via oral do azul de metileno associada ao LED 660 nm confere ao protocolo segurança e viabilidade clínica.

Na análise da energia incidente nas valvas cardíacas, embora uma pequena fração da radiação aplicada à superfície torácica alcance o coração, essa quantidade foi suficiente para ativar o fotossensibilizador nas valvas e reduzir as UFC. A transmissão observada da luz de 660 nm através da parede torácica sugere que a energia foi capaz de gerar espécies reativas de oxigênio e promover efeito antimicrobiano. Assim, mesmo com perdas ópticas, o efeito fotodinâmico eficaz em modelos pequenos, devido a menor espessura torácica.

Kose *et al.* (2021) (107), relataram temperatura retal máxima de 38,4°C em um modelo animal com EI. Neste estudo, a temperatura retal foi semelhante (38,1°C) no grupo EI sobrevida. Não foram encontrados outros trabalhos que avaliassem a temperatura e peso corporal em modelos semelhantes. Neste estudo, observou-se perda inicial de peso em todos os grupos, seguida de

recuperação nos grupos PDT1 e PDT3 (+ 22,46 g e +7,45 g, respectivamente), enquanto o EI apresentou perda média de -33,05 g.

Para este estudo, foi realizada uma cuidadosa revisão de literatura. Nela, constatou-se que não há registros de pesquisa *in vivo* que abordem a aPDT com o uso de LED em combinação com o azul de metileno e *S. aureus* no contexto da EI, não foram realizados *in vivo*. Desse modo, o presente estudo assume grande importância, pois demonstra a possibilidade de conduzir experimentos *in vivo* relacionados a EI.

É importante destacar que todos os animais que apresentaram sinais evidentes de sofrimento foram submetidos à eutanásia humanitária, conforme os critérios éticos previamente estabelecidos, a saber: perda de peso rápida e progressiva acima de 20% do valor inicial, diarreia, letargia, dispneia, tremor (162). Em decorrência dessa conduta, alguns grupos experimentais não apresentaram uniformidade no número de dias de vida, sendo este considerado seu último dia de vida.

Considerando que a EI é uma doença de carácter sistêmico, com disseminação dos microrganismos pela corrente sanguínea, torna-se relevante considerar a possibilidade de atuação sistêmica da aPDT por meio da irradiação do sangue circulante. Em ratos, a frequência cardíaca varia entre 250 e 493 batidas por minuto (163), enquanto o volume sanguíneo total corresponde a aproximadamente 50 – 70mL/kg de massa corporal, o que equivale a cerca de 17 – 21 mL em um animal de 300mg (164). O tempo de transito do sangue pela aorta é estimado em aproximadamente 22 segundos (165), permitindo inferir um tempo total de circulação sanguínea de 18 a 30 segundos, considerando os parâmetros débito cardíaco e volume sanguíneo total. Desta forma, ao longo de 600 segundos de irradiação cardíaca realizados neste estudo, o sangue contendo fotossensibilizador atravessou repetidamente a região irradiada, contemplando cerca de 20 ciclos de circulação, sendo submetido a ação de aPDT a cada passagem, o que contribuiu para sua progressiva descontaminação.

Atualmente, a cardiologia já emprega amplamente o azul de metileno, especialmente no tratamento da síndrome vasoplégica, o que possibilita associar esse uso clínico como fotossensibilizador. Uma vez injetado na corrente sanguínea, mistura-se imediatamente a circulação sistêmica, com mistura completa no volume sanguíneo ao longo de ciclos cardíacos consecutivos, estando presente em todo o sistema circulatório em menos de um minuto (166). Ademais, procedimentos cardiológicos que utilizam acesso intravenoso as valvas cardíacas, como as cirurgias de troca valvar transcatheter (conhecidas como Transcatheter Aortic Valve, TAV) incluindo a técnica *valve-in-valve*, demonstram a viabilidade da condução de dispositivos até o sítio valvar por meio de cateteres intravasculares. De forma análoga, é plausível a introdução de uma fibra óptica condutora de luz até a região valvar para fins de irradiação, evidenciando o potencial translacional da técnica, fundamentado em abordagens já consolidadas na prática cardiológica.

Todos os animais dos grupos de tratamento receberam exclusivamente a aPDT, sem antibióticos, para isolar seus efeitos terapêuticos, embora a literatura, ainda a descreva como adjuvante (167). A eficácia isolada demonstrada neste estudo é inédita para o contexto da EI, reforça o potencial translacional da técnica diante do crescente cenário de resistência antimicrobiana.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A EI é uma doença com alta taxa de mortalidade que atinge todas as faixas etárias, sem predileção por sexo. A inespecificidade do microrganismo, bem como seu potencial de resistência a antibiótica aumentam o tempo de espera para início do tratamento devido à necessidade de identificar o agente infeccioso e realizar testes terapêuticos até obter o antibiótico ou a combinação antibiótica adequada. Assim, é considerada uma doença de difícil e prolongado tratamento.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a aPDT Antimicrobiana Transtorácica, utilizando azul de metileno como fotossensibilizador e LED 660 nm com 600mW, 129 J/cm², por 600 s, modo contínuo, como fonte de luz, promoveu efeitos significativos sobre a evolução da EI induzida por *S. aureus* em modelo animal. Em especial, observou-se aumento da taxa de sobrevivência, redução do número de colônias bacterianas presentes nas valvas cardíacas e melhora da integridade tecidual conforme evidenciado nas análises histológicas.

Observamos que três sessões foram mais eficazes na redução da carga microbiana e, até mesmo, na eliminação, além de promoverem o início do reparo do tecido valvar. Seu início não requer o conhecimento do perfil de resistência microbiana ou de testes de sensibilidade a antibióticos. Dessa forma, o tempo de espera para o início do tratamento é imediato, reduzindo o tempo de internação hospitalar. A técnica aqui apresentada resultou em uma sobrevivência superior a 90% no grupo tratado com três sessões, o que representa, até onde sabemos, o melhor resultado já reportado na literatura para esta patologia.

Como limitações da técnica, observa-se a elevada mortalidade dos animais associada aos agentes anestésicos utilizados na cirurgia e a ocorrência de taquicardia durante a fase de recuperação pós-anestésica. Por este motivo, faz-se necessário avaliar um modelo de sedação diferente ao preconizado pela literatura para a obtenção de um modelo animal de EI.

Neste estudo, até o momento, observamos que a aPDT pode ser uma forte aliada no tratamento da EI. Considerando-se a metodologia empregada, este protocolo poderia ser considerado um coadjuvante interessante no tratamento da doença. Novos estudos considerando a aPD e as diferentes cepas, são necessários para definir um protocolo ideal para tratar a doença e eliminar os microrganismos por meio desta técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rajani R, Klein JL. Infective endocarditis: A contemporary update. Clin Med [Internet]. 2020 Jan [cited 2022 July 3];20(1):31–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6964163/>
2. Cahill TJ, Baddour LM, Habib G, Hoen B, Salaun E, Pettersson GB, et al. Challenges in Infective Endocarditis. J Am Coll Cardiol [Internet]. 2017 Jan [cited 2022 June 17];69(3):325–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109716371121>
3. Bussani R, De-Giorgio F, Pesel G, Zandonà L, Sinagra G, Grassi S, et al. Overview and Comparison of Infectious Endocarditis and Non-infectious Endocarditis: A Review of 814 Autoptic Cases. In Vivo [Internet]. 2019 [cited 2022 June 17];33(5):1565–72. Available from: <http://iv.iarjournals.org/lookup/doi/10.21873/invivo.11638>
4. Oury C, Meyers S, Jacques N, Leeten K, Jiang Z, Musumeci L, et al. Protective Effect of Ticagrelor Against Infective Endocarditis Induced by Virulent Staphylococcus aureus in Mice. JACC Basic Transl Sci [Internet]. 2023 May 24 [cited 2025 Sept 4];8(11):1439–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10714181/>
5. Teixeira J, Marques A. Profilaxia da Endocardite Bacteriana: Estado da Arte. Rev Soc Port Anestesiol [Internet]. 2019 Aug 27 [cited 2022 July 26];28(3):174–80. Available from: <https://revistas.rcaap.pt/anestesiologia/article/view/17746>
6. Cuervo G, Escrihuela-Vidal F, Gudiol C, Carratalà J. Current Challenges in the Management of Infective Endocarditis. Front Med [Internet]. 2021 Feb 22 [cited 2026 Jan 8];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2021.641243/full>
7. Lefter CL, Poddi S, Rungatscher A, Lefter CL, Poddi S, Rungatscher A. Endocarditis: Rising Incidence in the Post-COVID-19 Pandemic Era: A Narrative Review. J Clin Med [Internet]. 2025 Oct 14 [cited 2026 Jan 8];14(20). Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/14/20/7274>
8. Vicent L, Luna R, Martínez-Sellés M. Pediatric Infective Endocarditis: A Literature Review. J Clin Med [Internet]. 2022 June 5 [cited 2026 Jan 8];11(11):3217. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9181776/>
9. Long B, Koyfman A. Infectious endocarditis: An update for emergency clinicians. Am J Emerg Med [Internet]. 2018 Sept [cited 2022 Aug 6];36(9):1686–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735675718305564>

10. Hubers SA, DeSimone DC, Gersh BJ, Anavekar NS. Infective Endocarditis: A Contemporary Review. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2020 May [cited 2022 July 4];95(5):982–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002561961931081X>
11. Cahill TJ, Harrison JL, Jewell P, Onakpoya I, Chambers JB, Dayer M, et al. Antibiotic prophylaxis for infective endocarditis: a systematic review and meta-analysis. *Heart* [Internet]. 2017 June [cited 2021 Dec 28];103(12):937–44. Available from: <https://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heartjnl-2015-309102>
12. Lemos LHB, Silva LR da, Correa MG, Golebiovski W, Weksler C, Garrido RQ, et al. El em Idosos: Características Distintas. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2021 Oct 25 [cited 2021 Dec 28];117:775–81. Available from: <http://www.scielo.br/j/abc/a/rfDvRrRX5P438cygp5KYsgv/?lang=pt>
13. Amir M, Djaharuddin I, Sudharsono A, Ramadany S. COVID-19 concomitant with infective endocarditis: A case report and review of management. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020 Sept [cited 2021 Dec 28];98:109–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7305871/>
14. Matos JYC de, Santos ABM dos, Abreu CS, Barbosa EB, Rodrigues HMT dos S, Andrade IR de, et al. Manejo do paciente com EI: uma revisão narrativa. *Rev Eletrônica Acervo Méd* [Internet]. 2022 May 11 [cited 2022 July 3];8:e10107–e10107. Available from: <https://acervomais.com.br/index.php/medico/article/view/10107>
15. Mgbojikwe N, Jones SR, Leucker TM, Brotman DJ. Infective endocarditis: Beyond the usual tests. *Cleve Clin J Med* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Dec 28];86(8):559–67. Available from: <https://www.ccjm.org/content/86/8/559>
16. Luque Paz D, Lakbar I, Tattevin P. A review of current treatment strategies for infective endocarditis. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2021 Mar 4 [cited 2022 Feb 10];19(3):297–307. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1822165>
17. Hannachi N, Habib G, Camoin-Jau L. Aspirin Effect on Staphylococcus aureus—Platelet Interactions During Infectious Endocarditis. *Front Med* [Internet]. 2019 [cited 2022 June 17];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2019.00217>
18. Mang-de la Rosa Mr, Castellanos-Cosano L, Romero-Perez Mj, Cutando A. The bacteremia of dental origin and its implications in the appearance of bacterial endocarditis. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal* [Internet]. 2014 [cited 2021 Dec 29];e67–74. Available from: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv19_i1_p67.pdf

19. Kuttamperoor F, Yandrapalli S, Siddhamsetti S, Frishman WH, Tang GHL. Infectious Endocarditis After Transcatheter Aortic Valve Replacement: Epidemiology and Outcomes. *Cardiol Rev* [Internet]. 2019 Sept [cited 2022 June 17];27(5):236–41. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/CRD.0000000000000244>
20. Sanar R. Valvulopatias: o que é, causas, diagnóstico e tratamento [Internet]. Sanarmed. 2022 [cited 2025 Oct 7]. Available from: <https://sanarmed.com/valvulopatias-o-que-e-causas-diagnostico-e-tratamento-projetoq2-2022/>
21. Cuervo G, Escrihuela-Vidal F, Gudiol C, Carratalà J. Current Challenges in the Management of Infective Endocarditis. *Front Med* [Internet]. 2021 [cited 2022 Aug 25];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.641243>
22. Coração | Parede cardíaca [Internet]. Anatomia papel e caneta. [cited 2022 Aug 25]. Available from: <https://anatomia-papel-e-caneta.com/coracao-parede-cardiaca/>
23. Brasil C. Seu Amigo Farmacêutico. [cited 2022 Aug 25]. Mecanismo de coagulação do sangue defeituoso pode explicar a gravidade do COVID-19. Available from: <https://www.seuamigofarmaceutico.com.br/artigos-e-variedades/mecanismo-de-coagulacao-do-sangue-defeituoso-pode-explicar-a-gravidade-do-covid-19/524>
24. VALVOPATIAS - Insuficiência e estenose da tricúspide [Internet]. Clínica Dr. Alberto Caldeira. 2016 [cited 2022 Sept 24]. Available from: <https://albertoecmelo.com/valvopatia-insuficiencia-tricuspid/>
25. Pettersson GB, Hussain ST. Current AATS guidelines on surgical treatment of infective endocarditis. *Ann Cardiothorac Surg* [Internet]. 2019 Nov [cited 2021 Dec 30];8(6):630–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6892713/>
26. Fortes CQ, Fortes NRQ. Managing Patients with Infectious Endocarditis and Neurological Complication — The Big Dilemma that Persists Until these Days. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2021 [cited 2025 Sept 4];116:692–4. Available from: <https://www.scielo.br/j/abc/a/HcLfgfbwYmjDvFVqSWMbVN/?lang=en>
27. Tarasoutchi F, Montera MW, Ramos Al de O, Sampaio RO, Rosa VEE, Accorsi TAD, et al. Atualização das Diretrizes Brasileiras de Valvopatias – 2020. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2020 Oct 23 [cited 2022 July 12];115:720–75. Available from: <http://www.scielo.br/j/abc/a/ZQhHYbGRF9RM5PTb8c8M8Xs/?lang=pt>
28. Wang A, Gaca JG, Chu VH. Management Considerations in Infective Endocarditis: A Review. *JAMA* [Internet]. 2018 July 3 [cited 2021 Dec

- 30];320(1):72. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2018.7596>
29. Veloso TR, Que YA, Chaouch A, Giddey M, Vouillamoz J, Rousson V, et al. Prophylaxis of Experimental Endocarditis With Antiplatelet and Antithrombin Agents: A Role for Long-term Prevention of Infective Endocarditis in Humans? *J Infect Dis* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Jan 27];211(1):72–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu426>
 30. Liesenborghs L, Meyers S, Vanassche T, Verhamme P. Coagulation: At the heart of infective endocarditis. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2023 Aug 30];18(5):995–1008. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1538783622003038>
 31. Pettersson GB, Coselli JS, Pettersson GB, Coselli JS, Hussain ST, Griffin B, et al. 2016 The American Association for Thoracic Surgery (AATS) consensus guidelines: Surgical treatment of infective endocarditis: Executive summary. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2017 June 1 [cited 2021 Dec 30];153(6):1241-1258.e29. Available from: [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(17\)30116-2/fulltext](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(17)30116-2/fulltext)
 32. Grunenwald CM, Bennett MR, Skaar EP. Non-conventional therapeutics against *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2018 Nov [cited 2022 Jan 26];6(6):10.1128/microbiolspec.GPP3-0047–2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6296826/>
 33. Kwapisz E, Garbacz K, Kosecka-Strojek M, Schubert J, Bania J, Międzobrodzki J. Presence of egc-positive major clones ST 45, 30 and 22 among methicillin-resistant and methicillin-susceptible oral *Staphylococcus aureus* strains. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Nov 3 [cited 2022 Mar 26];10(1):1–10. Available from: <https://www-nature.ez345.periodicos.capes.gov.br/articles/s41598-020-76009-1>
 34. Patil A, Namineni S, Cheruku S, Penmetsa C, Penmetcha S, Mallineni S. Prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in oral and nasal cavities of 4 to 13-year-old rural school children: A cross-sectional study. *Contemp Clin Dent* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Mar 26];10(1):99–99. Available from: <https://go-gale.ez345.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=0976237X&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA609556700&sid=googleScholar&linkaccess=abs>
 35. Jamil S, Saad U, Hafiz S. Can amoxicillin clavulanate be used for treating MRSA? :3.
 36. Comeaux S, Jamison K, Voeltz M. Contemporary Features and Management of Endocarditis. *Diagnostics* [Internet]. 2023 Jan [cited 2025 Sept 4];13(19):3086. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/13/19/3086>

37. Ferro JM, Fonseca AC. Chapter 7 - Infective endocarditis. In: Biller J, Ferro JM, editors. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2025 Sept 4]. p. 75–91. (Neurologic Aspects of Systemic Disease Part I; vol. 119). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702040863000072>
38. Poorzand H, Hamidi F, Sheybani F, Ghaderi F, Fazlinezhad A, Alimi H, et al. Infective Endocarditis: Clinical Characteristics and Echocardiographic Findings. Front Cardiovasc Med [Internet]. 2022 Apr 4 [cited 2025 Sept 4];9:789624. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9014855/>
39. Regueiro A, Linke A, Latib A, Ihlemann N, Urena M, Walther T, et al. Association Between Transcatheter Aortic Valve Replacement and Subsequent Infective Endocarditis and In-Hospital Death. JAMA [Internet]. 2016 Sept 13 [cited 2022 July 27];316(10):1083. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.12347>
40. Holland TL, Baddour LM, Bayer AS, Hoen B, Miro JM, Fowler VG. Infective endocarditis. Nat Rev Dis Primer [Internet]. 2016 Sept 1 [cited 2021 Dec 28];2:16059. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5240923/>
41. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta JP, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). Eur Heart J. 2015 Nov 21;36(44):3075–128.
42. Tarasoutchi F, Montera MW, Ramos AIDO, Sampaio RO, Rosa VEE, Accorsi TAD, et al. Atualização das Diretrizes Brasileiras de Valvopatias – 2020. Arq Bras Cardiol [Internet]. 2020 Oct 13 [cited 2026 Jan 9];115(4):720–75. Available from: <http://abccardiol.org/en/article/update-of-the-brazilian-guidelines-for-valvular-heart-disease-2020/>
43. Glenny AM, Oliver R, Roberts GJ, Hooper L, Worthington HV. Antibiotics for the prophylaxis of bacterial endocarditis in dentistry. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 2013 [cited 2021 Dec 29];(10). Available from: <https://www.readcube.com/articles/10.1002%2F14651858.cd003813.pub4>
44. Ovid [Internet]. [cited 2026 Jan 10]. Antibiotic Prophylaxis and Infective Endocarditis... : JAMA Cardiology. Available from: <https://www.ovid.com/journals/jamac/fulltext/10.1001/jamacardio.2024.0873~antibiotic-prophylaxis-and-infective-endocarditis-incidence>
45. Hezzy Shmueli, Thomas F, Flint N, Setia G, Janjic A, J. Siegel R. Right-Sided Infective Endocarditis 2020: Challenges and Updates in Diagnosis

- and Treatment [Internet]. 2020 [cited 2025 Sept 4]. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/JAHA.120.017293>
46. Lu TY, Zhong LG, Liu JQ, Zhang CJ, Zhu ZZ, Tao MT, et al. Shikimic acid enhances vancomycin efficacy in experimental MRSA-induced infective endocarditis. *J Infect* [Internet]. 2025 Feb 1 [cited 2025 Aug 13];90(2). Available from: https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453%2824%2900324-4/fulltext?utm_source=chatgpt.com
 47. Vincent LL, Otto CM. Infective Endocarditis: Update on Epidemiology, Outcomes, and Management. *Curr Cardiol Rep* [Internet]. 2018 Oct [cited 2021 Dec 30];20(10):86. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11886-018-1043-2>
 48. Galo IDC, Lima BED, Santos TG, Braoios A, Prado RP, Santos WGD. Staphylococcus aureus growth delay after exposure to low fluencies of blue light (470 nm). *Braz J Biol Rev Brasileira Biol*. 2021 May;81(2):370–6.
 49. Hanses F, Roux C, Dunman PM, Salzberger B, Lee JC. Staphylococcus aureus gene expression in a rat model of infective endocarditis. 2014;16.
 50. Fortes CQ, Fortes NRQ. Abordagem ao Paciente com EI e Complicação Neurológica – O Grande Dilema que Persiste até Hoje. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2021 Apr [cited 2022 July 2];116(4):692–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8121385/>
 51. Farahani P, Ruffin F, Taherahmadi M, Webster M, Korn RE, Cantrell S, et al. Combination Therapy Is Not Associated with Decreased Mortality in Infectious Endocarditis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms* [Internet]. 2024 Nov 2 [cited 2025 Oct 27];12(11):2226. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11596167/>
 52. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation* [Internet]. 2015 Oct 13 [cited 2025 Aug 31];132(15):1435–86. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000296>
 53. Le TA, Hiba T, Chaudhari D, Preston AN, Palowsky ZR, Ahmadzadeh S, et al. Aminoglycoside-Related Nephrotoxicity and Ototoxicity in Clinical Practice: A Review of Pathophysiological Mechanism and Treatment Options. *Adv Ther*. 2023 Apr;40(4):1357–65.
 54. admin. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review [Internet]. *European Review*. 2015 [cited 2025 Aug 31]. Available from: <https://www.europeanreview.org/article/8585>

55. Beloor Suresh A, Rosani A, Patel P, Wadhwa R. Rifampin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Aug 31]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557488/>
56. Kishimoto E, Ota L, Solomon C. Daptomycin and Incidence of Elevated Creatinine Phosphokinase (CPK) Levels: A Case Report and Case Series Review. *Hawaii J Med Public Health* [Internet]. 2013 Aug [cited 2025 Aug 31];72(8 Suppl 3):42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727605/>
57. Patel S, Saw S. Daptomycin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Sept 4]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470407/>
58. Shahbazi F. Linezolid Related Adverse Effects in Different Populations: A Practical Review. *Curr Drug Saf*. 2025 Mar 25;
59. Greenfield A, Deja E, Lee K, Sastry S, Rittmann B. Linezolid and tedizolid adverse effects: a review on serotonin syndrome, myelosuppression, neuropathies, and lactic acidosis. *Antimicrob Steward Healthc Epidemiol ASHE* [Internet]. 2025 Jan 27 [cited 2025 Aug 31];5(1):e20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11795451/>
60. Delgado V, A. Marsan N, Waha S, Bonaros N, Brida M, Burri H, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of endocarditis | *European Heart Journal* | Oxford Academic [Internet]. 2023 [cited 2025 Aug 31]. Available from: https://academic.oup.com/eurheartj/article/44/39/3948/7243107?utm_source=chatgpt.com&login=false
61. Kunming P, Ying H, Chenqi X, Zhangzhang C, Xiaoqiang D, Xiaoyu L, et al. Vancomycin associated acute kidney injury in patients with infectious endocarditis: a large retrospective cohort study. *Front Pharmacol* [Internet]. 2023 Nov 13 [cited 2025 Oct 27];14:1260802. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10679345/>
62. Nunez S, Garcez AS, Ribeiro MS. PDT-Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia. Elsevier Brasil; 2015. 312 p.
63. Sansaloni-Pastor S, Bouilloux J, Lange N. The Dark Side: Photosensitizer Prodrugs. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2019 Dec [cited 2022 June 30];12(4):148. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/12/4/148>
64. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018 Oct [cited 2021 Dec 31];106:1098–107. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218341611>

65. Prażmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ*. 2016 Aug;25(4):799–807.
66. Nunes LP, Chalub LO, Strazzi-Sahyon HB, dos Santos PH, Cintra LTÂ, Sivieri-Araujo G. Photodynamic therapy as a potential oral disinfection protocol during COVID-19 outbreak. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2021 Mar [cited 2022 Feb 22];33:102187. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7825898/>
67. Eduardo C de P. *Fundamentos De Odontologia Lasers Em Odontologia*. 1st ed. GUANABARA KOOGAN LTDA; 2010. 256 p.
68. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem Rec* [Internet]. 2017 Aug [cited 2022 June 22];17(8):775–802. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tcr.201600121>
69. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2018 Sept 3 [cited 2022 June 23];44(5):571–89. Available from: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>
70. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem* [Internet]. 2021 [cited 2022 June 23];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2021.691697>
71. Cwalinski T, Polom W, Marano L, Roviello G, D'Angelo A, Cwalina N, et al. Methylene Blue—Current Knowledge, Fluorescent Properties, and Its Future Use. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Nov 2 [cited 2022 July 1];9(11):3538. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7693951/>
72. Saha BK, Burns SL. The Story of Nitric Oxide, Sepsis and Methylene Blue: A Comprehensive Pathophysiologic Review. *Am J Med Sci* [Internet]. 2020 Oct [cited 2022 July 1];360(4):329–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962920302494>
73. Lo JCY, Darracq MA, Clark RF. A Review of Methylene Blue Treatment for Cardiovascular Collapse. *J Emerg Med* [Internet]. 2014 May [cited 2022 July 2];46(5):670–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736467913010950>
74. Evora PRB, Alves Junior L, Ferreira CA, Menardi AC, Bassetto S, Rodrigues AJ, et al. Twenty years of vasoplegic syndrome treatment in heart surgery. Methylene blue revised. *Braz J Cardiovasc Surg* [Internet]. 2015 Mar [cited 2025 June 4];30:84–92. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbccv/a/5spsJkmh5V4CzyVCqr36Z6h/?lang=en>

75. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. 2009 June;30(18):3158–66.
76. Donnelly RL, Cassidy orona M, Loughlin RG. Delivery of Methylene Blue and meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate from cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogels: A potential means of photodynamic therapy of infected wounds - ScienceDirect [Internet]. 2009 [cited 2025 Oct 21]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134409001201>
77. Aa T, J A, M M. Photodynamic antibacterial enhanced effect of methylene blue-gold nanoparticles conjugate on *Staphylococcal aureus* isolated from impetigo lesions in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2015 June [cited 2025 Oct 21];12(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25827622/>
78. Kashef N, Akbarizare M, Razzaghi MR. In vitro Activity of Linezolid in Combination with Photodynamic Inactivation Against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Avicenna J Med Biotechnol* [Internet]. 2017 [cited 2025 Oct 21];9(1):44–8. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5219822/>
79. Pérez-Laguna V, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, García-Luque I, Ballesta S, Nonell S, et al. Bactericidal Effect of Photodynamic Therapy, Alone or in Combination with Mupirocin or Linezolid, on *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 May 31 [cited 2025 Oct 21];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01002/full>
80. Feng Y, Tonon CC, Hasan T. *Destrução dramática de infecções por Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina com uma combinação simples de amoxicilina e azul de metileno ativado por luz. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2025 Oct 21];235:112563. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134422001774>
81. Maliszewska I, Zdubek A. On the Photo-Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Using Methylene Blue. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jan [cited 2025 Oct 21];24(1):791. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/1/791>
82. Park GH, Lee SY, Lee JB, Chang BS, Lee JK, Um HS. Efeito da terapia fotodinâmica de acordo com diferenças nos fotossensibilizadores no biofilme de *Staphylococcus aureus* em titânio. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Oct 21];41:103317. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100023000455>

83. de Brito Júnior AA, Crugeira PJL, Barbosa AV, Costa WLR, Cangussu MCT, de Oliveira SCPS, et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by antimicrobial photodynamic therapy using 1,9-Dimethyl-Methylene Blue: in vitro and in vivo studies. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2025 Feb 25 [cited 2025 Oct 21];40(1):117. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-025-04362-6>
84. Pérez C, Zúñiga T, Palavecino CE. Photodynamic therapy for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2021 June [cited 2022 Aug 30];34:102285. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100021001113>
85. Salehpour F, Rasta SH, Mohaddes G, Sadigh-Eteghad S, Salarirad S. Therapeutic effects of 10-Hz Pulsed wave lasers in rat depression model: A comparison between near-infrared and red wavelengths. *Lasers Surg Med* [Internet]. 2016 [cited 2025 Nov 6];48(7):695–705. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lsm.22542>
86. Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci*. 2017 Nov;32(8):1909–18.
87. Finlayson L, Barnard IRM, McMillan L, Ibbotson SH, Brown CTA, Eadie E, et al. Depth Penetration of Light into Skin as a Function of Wavelength from 200 to 1000 nm. [cited 2025 Nov 10]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/php.13550>
88. Hu D, van Zeyl M, Valter K, Potas JR. Sex, but not skin tone affects penetration of red-light (660 nm) through sites susceptible to sports injury in lean live and cadaveric tissues. *J Biophotonics* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 30];12(7):e201900010. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbio.201900010>
89. Lanzafame R. Light Dosing and Tissue Penetration: It Is Complicated. *Photobiomodulation Photomed Laser Surg* [Internet]. 2020 July 1 [cited 2025 Nov 10];38(7):393–4. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7374595/>
90. Zhang W, Gao X, Wang X, Li D, Zhao Y, Zhang T, et al. Light Emitting Diodes Photobiomodulation Improves Cardiac Function by Promoting ATP Synthesis in Mice With Heart Failure. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2021 Dec 2 [cited 2025 Nov 30];8:753664. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8674466/>
91. Jagdeo J, Nguyen JK, Ho D, Wang EB, Austin E, Mamalis A, et al. Safety of light emitting diode-red light on human skin: two randomized controlled trials. *J Biophotonics* [Internet]. 2020 Mar [cited 2026 Jan 22];13(3):e201960014. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8887049/>

92. Simões TMS, de Alencar Fernandes Neto J, Nonaka CFW, de Vasconcelos Catão MHC. Effects of photobiomodulation therapy with red LED on inflammatory cells during the healing of skin burns. *Lasers Med Sci*. 2022 Sept;37(7):2817–22.
93. Visible Light Spectroscopic Analysis of Methylene Blue in Water; What Comes after Dimer? | ACS Omega [Internet]. [cited 2025 Oct 22]. Available from: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c03830?utm_source=chatgpt.com
94. Frontiers | Absorption, scattering, and refractive index of blood and its components: a review [Internet]. [cited 2025 Oct 22]. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/photonics/articles/10.3389/fphot.2025.1636398/full?utm_source=chatgpt.com
95. Henderson TA, Morries LD. Near-infrared photonic energy penetration: can infrared phototherapy effectively reach the human brain? *Neuropsychiatr Dis Treat* [Internet]. 2015 Aug 21 [cited 2025 Oct 22];11:2191–208. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4552256/>
96. Karuppan Perumal MK, Rajan Renuka R, Manickam Natarajan P. Evaluating the potency of laser-activated antimicrobial photodynamic therapy utilizing methylene blue as a treatment approach for chronic periodontitis. *Front Oral Health* [Internet]. 2024 May 30 [cited 2025 Oct 14];5:1407201. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11169725/>
97. Clawson BJ. Experimental endocarditis with fibrinoid degeneration in the heart valves of rats. *Arch Pathol* [Internet]. 1950 [cited 2022 Jan 4];50:68–74. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19512200917>
98. Channabasappa S, Durgaiah M, Chikkamadaiah R, Kumar S, Joshi A, Sriram B. Efficacy of Novel Antistaphylococcal Ectolysin P128 in a Rat Model of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 Jan 25 [cited 2025 Aug 16];62(2):10.1128/aac.01358-17. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.01358-17>
99. Millar BC, Habib G, Moore JE. New diagnostic approaches in infective endocarditis. *Heart* [Internet]. 2016 May 15 [cited 2024 Oct 6];102(10):796–807. Available from: <https://heart-bmj-com.ez345.periodicos.capes.gov.br/content/102/10/796>
100. Singh KV, Tran TT, Nannini EC, Tam VH, Arias CA, Murray BE. Efficacy of Ceftaroline against Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Exhibiting the Cefazolin High-Inoculum Effect in a Rat Model of Endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 June 27 [cited 2025 Aug

- 13];61(7):10.1128/aac.00324-17. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00324-17>
101. Sugimura Y, Schmidt AK, Lichtenberg A, Assmann A, Akhyari P. A Rat Model for the In Vivo Assessment of Biological and Tissue-Engineered Valvular and Vascular Grafts. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Dec 22];23(12):982–94. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.TEC.2017.0215>
 102. Liang H, Wang Y, Liu F, Duan G, Long J, Jin Y, et al. The Application of Rat Models in *Staphylococcus aureus* Infections. *Pathogens* [Internet]. 2024 June [cited 2025 June 10];13(6):434. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/13/6/434>
 103. Schwarz C, Hoerr V, Töre Y, Hösker V, Hansen U, Van de Vyver H, et al. Isolating Crucial Steps in Induction of Infective Endocarditis With Preclinical Modeling of Host Pathogen Interaction. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 June 18 [cited 2024 Dec 2];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.01325/full>
 104. Santoro J, Levison ME. Portal .periodicos. CAPES - Acervo [Internet]. 1978 [cited 2022 Apr 15]. Available from: <https://www-periodicos-capes-gov-br.ez345.periodicos.capes.gov.br/index.php/buscaador-primo.html>
 105. Nomura R, Matayoshi S, Otsugu M, Kitamura T, Teramoto N, Nakano K. Contribution of Severe Dental Caries Induced by *Streptococcus mutans* to the Pathogenicity of Infective Endocarditis. *Infect Immun* [Internet]. 2020 Apr 20 [cited 2021 Dec 22]; Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/IAI.00897-19>
 106. Hady WA, Bayer AS, Xiong YQ. Experimental Endocarditis Model of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Rat. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 2012 June 4 [cited 2021 Dec 22];(64):3863. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3471301/>
 107. Köse Ş, Kış TT, Yılmaz C, Kış M, Barış MM, Diniz G, et al. An Experimental Infective Endocarditis Model in Rats. *J Basic Clin Health Sci* [Internet]. 2021 Sept 20 [cited 2025 June 29];5(3):93–9. Available from: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jbachs/issue/64953/915263>
 108. Santoro J, Levison ME. Rat model of experimental endocarditis. *Infect Immun*. 1978 Mar;19(3):915–8.
 109. Mitov G, Kilgenstein R, Partenheimer P, Ricart S, Ladage D. Infective endocarditis: prevention strategy and risk factors in an animal model. *Folia Med (Plovdiv)* [Internet]. 2023 Oct 31 [cited 2025 June 10];65(5):788–99. Available from: <https://foliamedica.bg/article/99682/>

110. Lerche CJ, Christophersen LJ, Goetze JP, Nielsen PR, Thomsen K, Enevold C, et al. Adjunctive dabigatran therapy improves outcome of experimental left-sided *Staphylococcus aureus* endocarditis. *PLOS ONE* [Internet]. 2019 Apr 19 [cited 2022 Jan 4];14(4):e0215333. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0215333>
111. Singh KV, Arias CA, Murray BE. Tedizolid as Step-Down Therapy following Daptomycin versus Continuation of Daptomycin against Enterococci and Methicillin- and Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Rat Endocarditis Model. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020 Apr 21 [cited 2025 Aug 13];64(5):e02303-19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7179605/>
112. Save J, Que YA, Entenza J, Resch G. Subtherapeutic Doses of Vancomycin Synergize with Bacteriophages for Treatment of Experimental Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infective Endocarditis. *Viruses* [Internet]. 2022 Aug 16 [cited 2025 Aug 13];14(8):1792. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9412893/>
113. Takigawa T, Miyahara S, Ishii H, Ogawa M, Fukuda K, Nishimura Y, et al. Fibrinolytic treatment using recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) for staphylococcal infective endocarditis. *Microb Pathog* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Aug 13];197:107013. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401024004807>
114. Nikinmaa S, Podonyi A, Raivio P, Meurman J, Sorsa T, Rantala J, et al. Daily Administered Dual-Light Photodynamic Therapy Provides a Sustained Antibacterial Effect on *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* [Internet]. 2021 Oct 13 [cited 2025 Aug 31];10(10):1240. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8533018/>
115. Ghaiyoomi S, Shokouhi Mostafavi SK, Manavi A, Lawaf S, Azizi A. Investigating the Effect of Photodynamic Therapy With a 660 nm Laser With Methylene Blue and Cold Atmospheric Plasma Therapy on *Streptococcus sanguinis*. *J Lasers Med Sci* [Internet]. 2025 Mar 11 [cited 2025 Aug 31];16:e7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12261001/>
116. N. S. Rastelli A, Amaral D, Melo B, C. A. Bernardi A. Antimicrobial Photodynamic Therapy Associated to Blue®m Over Oral Biofilms Responsible by Endocarditis | Request PDF. *ResearchGate* [Internet]. 2025 Aug 6 [cited 2025 Sept 2]; Available from: https://www.researchgate.net/publication/369563988_Antimicrobial_Photodynamic_Therapy_Associated_to_BlueRm_Over_Oral_Biofilms_Responsibl_e_by_Endocarditis
117. Ishiwata N, Tsunoi Y, R. Sarker R, Aruyama Y, Kawaushi S, Sekine Y, et al. Control of Burn Wound Infection by Methylene Blue-Mediated Photodynamic Treatment With Light-Emitting Diode Array Illumination in Rats [Internet].

- 2021 [cited 2025 Sept 2]. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lsm.23395?utm_source=chatgpt.com
118. Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Rahimzadeh M. Sample size calculation in medical studies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* [Internet]. 2013 [cited 2025 Oct 4];6(1):14–7. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4017493/>
 119. Liesman RM, Pritt BS, Maleszewski JJ, Patel R. Laboratory Diagnosis of Infective Endocarditis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Aug 23 [cited 2024 Dec 1];55(9):2599–608. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.00635-17>
 120. Fournier PE, Gouriet F, Casalta JP, Lepidi H, Chaudet H, Thuny F, et al. Blood culture-negative endocarditis: Improving the diagnostic yield using new diagnostic tools. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017 Nov [cited 2024 Oct 6];96(47):e8392. Available from: https://journals.lww.com/md-journal/FullText/2017/11270/Blood_culture_negative_endocarditis__Improving_the.7.aspx
 121. Lamas C da C, Fournier PE, Zappa M, J. D. Brandão T, A. Januário-da-Silva C, G. Correia M, et al. Diagnosis of blood culture-negative endocarditis and clinical comparison between blood culture-negative and blood culture-positive cases [Internet]. 2015 [cited 2024 Dec 1]. Available from: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Diagnosis+of+blood+culture-negative+endocarditis+and+clinical+comparison+between+blood+culture-negative+and+blood+culture-positive+cases&author=CC+Lamas&author=PE+Fournier&author=M+Zappa&author=TJ+Brandao&author=CA+Januario-da-Silva&author=MG+Correia&author=GI+Barbosa&author=WF+Golebiovski&author=C+Weksler&author=H+Lepidi&author=D+Raoult&publication_year=2016&journal=Infection&pages=459-466&doi=10.1007%2Fs15010-015-0863-x&pmid=26670038
 122. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, et al. Clinical Presentation, Etiology, and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century: The International Collaboration on Endocarditis–Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med* [Internet]. 2009 Mar 9 [cited 2024 Oct 6];169(5):463–73. Available from: <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2008.603>
 123. Topan A, Carstina D, Slavcovici A, Rancea R, Capalneau R, Lupse M. Assesment of the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis after twenty-years. An analysis of 241 cases [Internet]. 2015 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4632890/>

124. Derakhshan S, Navidinia M, Haghi F. Antibiotic susceptibility of human-associated *Staphylococcus aureus* and its relation to agr typing, virulence genes, and biofilm formation. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2021 July 1 [cited 2026 Jan 20];21:627. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8247160/>
125. *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 | PDF | *Staphylococcus* | Organisms [Internet]. [cited 2026 Jan 20]. Available from: https://pt.scribd.com/document/630956556/Staphylococcus-aureus-ATCC-25923?utm_source=chatgpt.com
126. Mori CMC, Zanatto DA, Laporte JMA. Boas práticas em experimentação animal: procedimentos em ratos de laboratório [Internet]. Portal de Livros Abertos da USP. Portal de Livros Abertos da USP; 2024 [cited 2025 Oct 18]. Available from: <https://www.livrosabertos.abcd.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/1226>
127. Shin SY, Kim TH, Wu H, Choi YH, Kim SG. SIRT1 activation by methylene blue, a repurposed drug, leads to AMPK-mediated inhibition of steatosis and steatohepatitis. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2022 Dec 10];727:115–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001429991400065X>
128. Peter C, Hongwan D, Küpfer A, Lauterburg BH. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2000 June 19 [cited 2023 Sept 9];56(3):247–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002280000124>
129. de Santi MESO, Prates RA, França CM, Lopes RG, Sousa AS, Ferreira LR, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach for the treatment of vulvovaginal candidiasis: preliminary results. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 Nov 8];33(9):1925–31. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2557-y>
130. Hazan R, Que YA, Maura D, Rahme LG. A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012 Nov 13 [cited 2025 Oct 13];12(1):259. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-259>
131. Gibson GW, Kreuser SC, Riley JM, Rosebury-Smith WS, Courtney CL, Juneau PL, et al. Development of a Mouse Model of Induced *Staphylococcus aureus* Infective Endocarditis. *Comp Med*. 2007 Dec 1;57(6):563–9.
132. Wang M lian, Zhang Y, Fan M, Guo Y jun, Ren W dong, Luo E jie. A rabbit model of right-sided *Staphylococcus aureus* endocarditis created with echocardiographic guidance. *Cardiovasc Ultrasound* [Internet]. 2013 Jan 14

- [cited 2025 June 5];11:3. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3598207/>
133. WEISS W. Efficacy of Tigecycline and Vancomycin in a Rat *Staphylococcus aureus* Endocarditis Model. 2011 [cited 2025 June 10]; Available from: <https://www.academia.edu/download/109386868/B046-Rat-endocarditis-ICAAC-2011.pdf>
 134. Ring J, Hoerr V, Tuchscher L, Kuhlmann MT, Löffler B, Faber C. MRI Visualization of *Staphylococcus aureus*-Induced Infective Endocarditis in Mice. PLOS ONE [Internet]. 2014 Sept 17 [cited 2025 Oct 18];9(9):e107179. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0107179>
 135. Bartsch B, Ackerschott A, Zaidi MA, Jamin RN, Nazir MLF, Altrogge M, et al. A novel approach to studying infective endocarditis: Ultrasound-guided wire injury and bacterial challenge in mice. PLOS ONE [Internet]. 2025 Apr 7 [cited 2025 Oct 19];20(4):e0318955. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0318955>
 136. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. Phys Med Biol [Internet]. 2013 June 7 [cited 2025 Oct 19];58(11):R37–61. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/58/11/R37>
 137. Yaroslavsky AN, Schulze PC, Yaroslavsky IV, Schober R, Ulrich F, Schwarzmaier HJ. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. Phys Med Biol [Internet]. 2002 June 21 [cited 2025 Oct 19];47(12):2059–73. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/47/12/305>
 138. Hamblin MR. Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. BBA Clin [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2025 Oct 19];6:113–24. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5066074/>
 139. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. J Photochem Photobiol B. 1999 Mar;49(1):1–17.
 140. Chen P, Zou Y, Liu Y, Han W, Zhang M, Wu Y, et al. Low-level photodynamic therapy in chronic wounds. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2024 Apr [cited 2025 Oct 12];46:104085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100024001224>
 141. dos Anjos C, Sellera FP, Ribeiro MS, Baptista MS, Pogliani FC, Lincopan N, et al. Antimicrobial blue light and photodynamic therapy inhibit clinically relevant β -lactamases with extended-spectrum (ESBL) and carbapenemase activity. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 29];32:102086. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100020304403>

142. cardiologiahmt. Diretrizes ESC 2023 para o tratamento da endocardite » Centro de Cardiologia [Internet]. Centro de Cardiologia. 2023 [cited 2025 June 12]. Available from: <https://cardiologiahmt.com.br/artigos-cientificos/diretrizes-esc-2023-para-o-tratamento-da-endocardite>
143. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, et al. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Feb [cited 2025 June 12];17(2):e49–55. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5280084/>
144. Hoda SA, Hoda RS. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. [cited 2025 June 7]; Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/ajcp/aqaa163>
145. Vallejo MCS, Moura NMM, Gomes ATPC, Joaquineto ASM, Faustino MAF, Almeida A, et al. The Role of Porphyrinoid Photosensitizers for Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jan [cited 2025 Oct 12];22(8):4121. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/4121>
146. Chen P, Zou Y, Liu Y, Han W, Zhang M, Wu Y, et al. Low-level photodynamic therapy in chronic wounds. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2025 Oct 12];46:104085. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100024001224>
147. Channabasappa S, Durgaiah M, Chikkamadaiah R, Kumar S, Joshi A, Sriram B. Efficacy of Novel Antistaphylococcal Ectolysin P128 in a Rat Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 Jan 25 [cited 2025 June 29];62(2):10.1128/aac.01358-17. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.01358-17>
148. Nunez SC, Ribeiro MS, Garcez AS. PDT TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NA ODONTOLOGIA. 2nd ed. São Paulo: ELSEVIER EDITORA LTDA; 2019. 280 p.
149. Evora PRB, Soares ROS, Bassetto S, Auxiliadora-Martins M, Luis-Silva F, Basile-Filho A. After Thirty Years, We Still Cannot Understand Why Methylene Blue is not a Reference to Treat Vasoplegic Syndrome in Cardiac Surgery. *Braz J Cardiovasc Surg* [Internet]. 2021 [cited 2025 Oct 8];36:406–11. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbccv/a/S3cSHxRzkmpnpyf3zPywCWS/?format=html&lang=en>
150. Kofler O, Simbeck M, Tomasi R, Hinske LC, Klotz LV, Uhle F, et al. Early Use of Methylene Blue in Vasoplegic Syndrome: A 10-Year Propensity Score-Matched Cohort Study. *J Clin Med* [Internet]. 2022 Jan [cited 2025 Oct 8];11(4):1121. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/11/4/1121>

151. Zhu MZL, Scullion J, Stroebel A, He C. Does methylene blue improve outcomes in patients with post-cardiac surgery vasoplegic syndrome? *Interdiscip Cardiovasc Thorac Surg* [Internet]. 2025 Jan 1 [cited 2025 Oct 8];40(1):ivae221. Available from: <https://doi.org/10.1093/icvts/ivae221>
152. Oz M, E. Lorke D, Hasan M, A. Petroianu G. Cellular and Molecular Actions of Methylene Blue in the Nervous System [Internet]. 2011 [cited 2025 June 12]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3005530/>
153. Law SK, Leung AWN, Xu C. Photodynamic Action of Curcumin and Methylene Blue against Bacteria and SARS-CoV-2—A Review. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2023 Dec 25 [cited 2025 Oct 8];17(1):34. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10818644/>
154. Oliveira HHC, Chicrala-Toyoshima GM, Damante CA, Ferreira R. Blue Photosensitizer, Red Light, Clear Results: An Integrative Review of the Adjunctive Periodontal Treatment with Methylene Blue in Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Dent J* [Internet]. 2025 July [cited 2025 Oct 8];13(7):289. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6767/13/7/289>
155. Cardozo APM, da Silva D de FT, Fernandes KPS, Ferreira R de C, Lino-dos-Santos-Franco A, Rodrigues MFSD, et al. Antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue and its derivatives in animal studies: Systematic review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* [Internet]. 2024 [cited 2025 Oct 8];40(4):e12978. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/phpp.12978>
156. Baron E, editor. *Light-Based Therapies for Skin of Color* [Internet]. London: Springer London; 2009 [cited 2025 Oct 8]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-84882-328-0>
157. Austin E, Geisler AN, Nguyen J, Kohli I, Hamzavi I, Lim HW, et al. Visible light. Part I: Properties and cutaneous effects of visible light. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 Oct 8];84(5):1219–31. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC8887026>
158. Photobiological Basics and Clinical Indications of Phototherapy for Skin Rejuvenation | IntechOpen [Internet]. [cited 2025 Oct 8]. Available from: https://www.intechopen.com/chapters/54924?utm_source=chatgpt.com
159. Rödiger T, Endres S, Konietzschke F, Zimmermann O, Sydow HG, Wiegand A. Effect of fiber insertion depth on antibacterial efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in rootcanals. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2017 June 1 [cited 2025 Oct 8];21(5):1753–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1948-3>
160. Grapsa J, Blauth C, Chandrashekhara YS, Prendergast B, Erb B, Mack M, et al. *Staphylococcus Aureus* Infective Endocarditis. *JACC* [Internet]. 2022 Jan

- 4 [cited 2025 Oct 11];79(1):88–99. Available from: <https://www.jacc.org/doi/10.1016/j.jacc.2021.10.015>
161. Kim J, Lee HK, Park J, Jeon SI, Lee IS, Yun WS, et al. Implantable MicroLED-Mediated Chemo-Photodynamic Combination Therapy for Glioma Treatment. *Adv Funct Mater* [Internet]. 2024 [cited 2025 Oct 8];34(30):2316386. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.202316386>
 162. Olfert ED, Godson DL. Humane Endpoints for Infectious Disease Animal Models. *ILAR J* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2026 Jan 7];41(2):99–104. Available from: <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.99>
 163. Vital Statistics in Rats – Rat Guide [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: https://ratguide.com/health/basics-health/vital_statistics_in_rats.php?utm_source=chatgpt.com
 164. Darya G, Mohammadi H, Dehghan Z, Nakhaei A, Derakhshanfar A. Animal models of hemorrhage, parameters, and development of hemostatic methods. *Lab Anim Res* [Internet]. 2025 Dec 1 [cited 2026 Jan 15];41(1):5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s42826-025-00239-5>
 165. Quantitative blood flow measurements in the small animal cardiopulmonary system using digital subtraction angiography - PMC [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2780468/>
 166. methylene blue [Internet]. medtigo. [cited 2026 Jan 16]. Available from: <https://medtigo.com/drug/methylene-blue/>
 167. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* [Internet]. 2004 May [cited 2025 June 12];3(5):436–50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071049/>

ANEXO A

CHECKLIST ARRIVE 2.0 - ESTUDOS EM ANIMAIS

Este checklist é baseado nas diretrizes ARRIVE 2.0 para assegurar a qualidade, reprodutibilidade e transparência em estudos pré-clínicos com animais.

Item	Atende (Sim/Não)	Comentário
Título descreve claramente o estudo (espécie, intervenção, desfecho)	SIM	
Resumo inclui objetivo, métodos, resultados e conclusões	SIM	
Introdução apresenta contexto científico e justificativa	SIM	
Objetivos são claramente definidos (hipóteses específicas)	SIM	
Desenho experimental descrito (grupos, controles, n por grupo)	SIM	
Informações sobre os animais (espécie, linhagem, sexo, idade, peso, origem)	SIM	
Procedimentos detalhados (intervenções, anestesia, analgesia, técnicas cirúrgicas, cronograma)	SIM	

Desfechos definidos (o que, como, quando e por quem)	SIM	
Análise estatística (cálculo do tamanho amostral, métodos, software)	SIM	
Resultados claros (dados, variabilidade, perdas, eventos adversos)	SIM	
Discussão interpreta resultados, limitações e relevância translacional	SIM	
Generalização e relevância para outros contextos	SIM	
Protocolos pré-registrados (se aplicável)	N/A	
Materiais/dados/códigos disponíveis para reprodutibilidade	SIM	
Aprovação ética (número de protocolo, conformidade com normas)	SIM	
Randomização e cegamento descritos para evitar vieses	N/A	
CrITÉrios de exclusão de animais/dados definidos previamente	N/A	
Declaração de conflitos de interesse e fontes de financiamento	SIM	

