UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUISA ANDRADE VALLE

Efeito de diferentes protocolos de terapia fotodinâmica antimicrobiana na eliminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans in vitro*

BAURU
2016

LUISA ANDRADE VALLE

Efeito de diferentes protocolos de terapia fotodinâmica antimicrobiana na eliminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans in vitro*

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral, linha de pesquisa em Periodontia

Orientador: Prof[a]. Dr[a]. Carla Andreotti Damante

BAURU
2016

V242e

Valle, Luísa Andrade
Efeito de diferentes protocolos de terapia fotodinâmica antimicrobiana na eliminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans in vitro* / Luísa Andrade Valle. – Bauru, 2016.
119 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Carla Andreotti Damante

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Luisa Andrade Valle

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

NÃO SE APLICA

Dados curriculares

Luísa Andrade Valle

Nascimento	28 de junho de 1989
Naturalidade	Brasília-DF
Filiação	Sérgio Henrique Rezende Valle
	Marieta Andrade Valle
2007 – 2012	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)
2008 - 2009	Monitoria em Anatomia aplicada à odontologia/ Instituto de Ciências Biológicas (UFJF)
2010 – 2010	Treinamento Profissional em Radiologia/ Faculdade de Odontologia (UFJF)
2010 – 2011	Bolsista do Projeto de Extensão em Estudos avançados em anatomia cirúrgica e dissecação de cabeça e pescoço/ Instituto de ciências biológicas (UFJF)
2011 – 2011	Bolsista do Projeto de Extensão no Serviço de Diagnóstico e Orientação a Pacientes com Desordens Temporomandibulares/ Faculdade de Odontologia (UFJF)
2011 – 2011	Monitoria em Periodontia I e II/ Faculdade de Odontologia (UFJF)
2011-2011	Projeto de Extensão Serviço Especial em Cirurgia Oral/ Faculdade de Odontologia (UFJF)
2012 – 2012	Treinamento Profissional de Ortodontia/ Faculdade de Odontologia (UFJF)

2012 – 2012	Aperfeiçoamento em Periodontia e Prótese dentária pela Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (SUPREMA)
2013 - 2013	Monitoria em Dentística III/ Faculdade de Odontologia (UFJF)
2013-2014	Especialização em Odontologia Legal pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)
2014 – 2016	Especialização em Prótese Dentária pela Fundação Bauruense de Estudos Odontológicos (FUNBEO)
2014 – 2016	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia, pela FOB-USP, como bolsista CAPES.
Associações	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu realizasse todos os meus sonhos

AGRADECIMENTOS

Impossível começar sem agradecer primeiramente aos meus pais, ***Sérgio e Leila***. Sempre foram meus exemplos de garra, dedicação e caráter. Obrigada por sempre me incentivarem a ser quem sou, a fazer o que gosto e valorizar os meus dons. Agradeço também pelo tempo e investimento, sem vocês eu não conseguiria realizar esse meu grande sonho. Sempre levarei todos os ensinamentos comigo para que eu me torne uma pessoa cada vez melhor e orgulhe vocês. Essa vitória não é somente minha, compartilho-a com vocês! Só tenho que agradecer a Deus por ter pais tão maravilhosos...Amo vocês!

Ao ***Diogo***, meu grande companheiro. Obrigada pela paciência, carinho e por sempre incentivar os meus sonhos e vida profissional. Tenho certeza que isso será passageiro e que viveremos inúmeros momentos um ao lado do outro. Você foi muito importante nessa fase da minha vida...Nosso encontro não foi ao acaso. Te amo!

Às minhas grandes amigas, ***Helena*** e ***Mari***. Amigas que a vida me deu e que sempre estão ao meu lado, mesmo com essa grande distância. Cada uma com uma personalidade, mas ambas de extrema importância na minha vida. Obrigada por cada palavra de incentivo nessa fase da minha vida, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui!

À ***Roberta***, irmã que a vida me deu a chance de escolher. Obrigada por sempre torcer por mim e me incentivar a ser uma grande profissional. Sempre levo um pouco de você em casa fase da minha vida. Estaremos sempre juntas! Amo você. Agradeço também a seus pais, que sempre torceram por mim e me apoiaram nas minhas decisões.

Às famílias **"Andrade"** e **"Valle"** que sempre estiveram ao meu lado, torcendo e apoiando os meus sonhos. Além de fazer cada volta para casa regada de momentos bons!

Ao primos **Léo**, **Paula** e **Camila** que me auxiliaram na minha vinda e moradia em Bauru. Serei eternamente grata.

Às grandes amigas que a odonto me deu na graduação e que sempre levarei para vida. ***Juliana***, ***Kamila***, ***Laís*** e ***Ligiane***, vocês sempre estiveram comigo mesmo que muito longe! Cada conselho e apoio foram essenciais para que eu chegasse aqui. Algumas mais próximas e outras mais distantes. Mas todas sendo especiais para que eu me tornasse mais forte e capaz de lutar por meus objetivos! Sempre levo vocês em meu coração. Agradeço também a **Larissa**, amiga desde a graduação e que me traz alegria em suas vindas à Bauru.

Aos meus grande companheiros de mestrado: ***Andréia***, ***Gustavo***, ***Raphaella*** e ***Vitor***. Família-Perio foi de extrema importância pra que eu concluísse essa etapa da minha vida. O apoio de cada um foi o meu incentivo em momentos difíceis e o meu sorriso nas comemorações.

Andréia, pelo seu carisma cativante. Obrigada pelo seu carinho e inúmeros favores. Sempre com um sorriso e uma rápida solução para tudo. Sempre levarei um pouco da sua disciplina e obrigada por me ajudar em diversos momentos.

Gustavo, mais que um entretenimento, um grande amigo. Com sua alegria e grande incentivo durante meus seminários não tem como ser grata por ter um amigo como você. Saiba que você me ensinou muito e que esse ensinamentos foram muito preciosos para que eu chegasse aqui!

Raphaella, minha raphinha. Me ensinou o quanto devemos ser otimistas em todas as situações. Vivemos tantos momentos, né?! Mas sempre juntas, uma apoiando a outra, sendo amigas, confidentes e parceiras. Obrigada pelos seus ensinamentos, sua experiência e sua alegria nos meus dias em Bauru. Aprendi muito com você e sempre estarei por perto!

Vitor, um exemplo de cordialidade. Obrigada por sua amizade, carinho e abraços em momentos de tensão. Saiba que me ensinou muito e que torço muito por você! Continue sendo essa pessoa de ouro que todos admiram. Obrigada pelo carinho e apoio de sua família também!

Nessa caminhada também pude compartilhar diversos momentos com amigos da pós-graduação que foram muito importantes nessa fase:

Ao ***Poma***, Rafael, pominha. Tantas qualidades numa pessoa. Meu grande amigo, sempre me ensinando sobre PDT, tirando minhas dúvidas e dando incentivo durante minha pesquisa. Além de inúmeros momentos de alegrias no nosso cotidiano. Saiba que é especial para mim e minha turma...Te admiro muito pelo grande ser humano que é!

À ***Paula Cunha***, o grande começo de tudo! Sem você eu não estaria aqui...Obrigada por todos os momentos de alegria e apoio. Serei eternamente grata por me apresentar Bauru, cuidar de mim e compartilhar seus conhecimentos. Te adoro!

À ***Paula Karam***, por sempre compartilhar seus conhecimentos e estar ao lado nos grandes momentos! Minha dupla de prótese, obrigada por tudo!

À ***Bruna***, que considero minha professora! Obrigada por sempre estar presente e nos ensinar (de uma forma meiga) e nos incentivar a serem grandes profissionais. Te admiro muito!

Aos colegas do "mestrado novo", ***Erika***, ***Ísis***, ***Giovana*** e ***Matheus***. Valeu pelos momentos de alegria e de apoio compartilhados. Saiba que nossa perio ficou mais alegre e unida com a entrada de vocês. Cada um com seu jeitinho, mas que me cativaram de diversas maneiras. Vocês são muito especiais para mim!

Aos demais colegas da pós- graduação da periodontia. Meus eternos agradecimentos pelos momentos vividos!

Aos funcionários da Periodontia. Sempre atenciosos e dispostos a ajudar no que fosse!

Edilaine, sempre atenciosa e me ajudando a resolver diversos problemas. Gosto muito de você e obrigada por tudo nessa fase da minha vida.

Ivânia, minha mãezona em Bauru. Sempre cuidando de mim e preocupada com tudo. Valeu por tudo, pela pessoa que é comigo. Saiba que seus puxões de orelha sempre serão válidos e mesmo quando eu for embora, levarei um pouquinho de você! É muito especial pra mim!

Marcela, pessoa atenciosa e querida por todos. Sua gargalhada foi muito importante nessa etapa, sempre me animando e salvando nas diversas situações. Obrigada pelos conselhos e sempre estar disposta a me ouvir.

Marcão, obrigada por tudo e por alegrar nossos dias na perio. Sua ajuda foi imprescindível na pesquisa. Sempre levarei um pouco da sua alegria e disposição em nos ajudar!

À **Asascleide Vital** (Cleidinha), sempre tão carinhosa e companheira. Nossas conversas foram valiosas nesse tempo! Obrigada pela amizade.

A todos os **funcionários da FOB**, em especial quero agradecer a ajuda e carinho de sempre.

Aos queridos professores do departamento de Periodontia FOB/USP

À Professora **Adriana**, que com seu jeito meigo e sempre alegre nos cativa a cada dia. Obrigada pela ajuda em alguns momentos que contribuíram para que eu finalizasse essa etapa da minha vida.

À Professora **Malu**, pelos ensinamentos e disponibilidade na clínica para nos ajudar a aprimorar nossos conhecimentos e destreza clínica. Além de contribuir significantemente durante nossos seminários. Agradeço também pelo momentos compartilhados no dia-a-dia, conselhos e bolo de limão!

À querida professora **Mariana**. Uma pessoa muito importante para mim, saiba que me espelho bastante na senhora. Admiro-a profissionalmente e como pessoa. Nossa convivência trouxe aprendizados muito importantes durante todo o mestrado, tanto pelas nossas discussões em seminários quanto em práticas clínicas. Além de ser minha psicóloga em alguns momentos, fazendo com algumas decisões e situações se tornassem mais fáceis. Obrigada por tudo nessa fase da minha vida!

Ao Professor **Sebastião**, sempre com um sorriso e uma novidade contagiante para deixar nosso dia mais alegre. Seus casos do passado e do presente servem para que nosso conhecimento seja enriquecido. Obrigada pelos conselhos que nos motivam a amar o que fazemos e pelos ensinamentos que serão levados eternamente.

Um agradecimento especial deve ser dado à minha querida orientadora, Professora **Carla**. Saiba que teve um importante papel para que eu me tornasse uma profissional melhor. Sei que tenho muitas dificuldades e a senhora soube me guiar em todas. Obrigada pela atenção, paciência e compreensão, além dos conhecimentos fornecidos. Tenho muito orgulho em ser orientada da senhora e espero que ainda tenhamos um belo caminho juntas. Desculpe por alguns deslizes, pela falação e por ser muito emocional em alguns momentos. Tenho uma grande admiração pela senhora...Obrigada por ser a pessoa que me guiou na realização de um sonho!

Agradeço também aos outros professores da FOB-USP pelo momentos de aprendizagem e convívio. Em especial aos professores da disciplina de prótese dentária.

À professora **Flaviana**, do departamento de Endodontia, pela atenção e disponibilidade em cooperar com minha pesquisa. Os agradecimentos se estendem aos pós-graduandos do departamento **Murilo** e **Raquel** pelos auxílios durante a pesquisa.

À professora **Vanessa Lara** pela disponibilização das cepas de bactérias.

À professora **Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado** pelo empréstimo do LED para essa pesquisa.

Aos professores da graduação da faculdade de Odontologia pelos conhecimentos dados, pelo incentivo a vida docente e à pesquisa. Obrigada por me apresentarem esse mundo apaixonante. Em especial aos professores **Sônia**, **Roberto** e **Josemar**. Serei ternamente grata ao professor **Evandro**, o qual foi responsável por despertar em mim a paixão pela periodontia e me incentivar a me especializar na área.

À **Zarife**, quem considero minha maior professora. Obrigada por estar ao meu lado mesmo na distância e me incentivar a melhorar os meus dons.

Um agradecimento especial ao **Marcelo Milanda**, um dos responsáveis pelo andamento e conclusão da pesquisa. Obrigada pela paciência, disponibilidade e contribuição com seus conhecimentos para que minha pesquisa desse certo. Saiba que serei eternamente grata e desejo que você sempre tenha sucesso e continue sendo essa pessoa especial, querida por todos ao seus redor. Todos admiram a pessoa e o profissional que é. E que essa sua luz nunca se apague e que tenhamos ainda muitos experimentos a serem compartilhados. É uma honra poder ter trabalhado e aprendido com você.

Ao **André Oliveira**, pela ajuda na pesquisa desde o início e pelo incentivo sempre dado mesmo em momentos difíceis.

Ao professor **Rodrigo Cardoso**, pela atenção de sempre e por apoiar minha pesquisa no CIP.

Aos pós- graduandos do CIP, **Cínthia**, **Gabi** e **Nara** pela alegria e incentivo nessa fase. Em especial, à Rafaela Alavarce, que é muito especial para mim. Obrigada pelas conversas a judas nessa reta final.

Aos professores Dr. **Heitor Marques de Honório** e o Prof. Dr. **José Roberto Pereira Lauris**, pela contribuição da realização e supervisão da análise estatística.

À **Dê Alegria** por toda a ajuda desempenhada, e por todo o carinho compartilhado na pós- graduação.

À todos os meus **pacientes**, que me deram a oportunidade do aprendizado para tornar-me uma melhor cirurgiã-dentista e pelos quais fiz o melhor que pude. Muito obrigado pela confiança.

A todas a pessoas que participaram dessa fase da minha vida, mesmo que com uma passagem rápida. Saiba que serei eternamente grata a todos. Pois ninguém chega a lugar nenhum sem que tenha pessoas especiais ao seu lado.

E por fim agradeço a **Deus e aos meus santinhos** por me ajudar e proteger para que eu fosse capaz de realizar esse sonho e por ter me tornado uma pessoa melhor. Além deles, agradeço aos meus anjos, **Vó Inah**, **Henrique** e **Minnie** que sempre estarão ao meu lado me protegendo e me guiando para o melhor.

"A coisa não está nem na partida nem na chegada, está é na travessia..."

João Guimarães Rosa

Agradecimentos Institucionais

À esta **Faculdade**, em nome da diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado** e ao vice-diretor **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, por nos oferecer a melhor infra-estrutura possível.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Janson**, presidente da Comisão de Pós-Graduação por todo o auxílio e atenção dissipada.

Ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, ex- chefe do departamento de Prótese por toda ajuda dissipada. E ao atual chefe, **Prof. Dr. José Henrique Rubo** pela ajuda prestada.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela disponibilidade da bolsa de estudo.

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

Antoine Lavoisier

RESUMO

O tratamento da doença periodontal consiste na remoção mecânica do biofilme, sendo que terapias complementares como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) podem melhorar os resultados obtidos. Este trabalho avaliou *in vitro* o efeito dos corantes azul de toluidina e azul de metileno com distintos parâmetros de laser (70; 100mW) e LED em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) em suspensão. O primeiro experimento avaliou efeito bactericida de diferentes concentrações dos dois corantes sozinhos (0,05; 0,1; 0,5, 1,0; 2,0; 5,0; 10 mg/ml). O segundo foi dividido nos seguintes grupos: controles positivo e negativo (gentamicina), grupos somente com luz aplicada, grupos com três concentrações (0,05; 0,1; 10 mg/ml) de corante sozinhos ou associados ao laser de baixa intensidade (660 nm; 2,91 e 4,16 W/cm^2; 70 e 100mW; 45 J/cm^2; 0,024 cm^2; 12 e 18s) e LED (627 ± 10 nm; 150mW/cm^2; 10,5 mW; 20 J/cm^2; 0,07cm^2; 123s). Os dados foram analisados pelo teste ANOVA complementado por Tukey ($p<0,05$). Os resultados demonstraram que ambos os corantes na concentração de 10 mg/ml sozinhos ou associados com laser (ambas as potências) ou LED causaram 100 % de morte bacteriana semelhante ao controle negativo ($p>0,05$). Com isso, pode-se concluir que aPDT pode eliminar o *A.a.* de forma dependente da concentração do corante.

Palavras-chave: Doenças Periodontais. Fármacos Fotossensibilizantes. Fotoquimioterapia.

ABSTRACT

Effect of different protocols of antimicrobial photodynamic therapy on elimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans in vitro*

The main treatment of periodontal disease is the mechanical removal of biofilm. Adjuvant therapies as antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) may offer better results. The aim of this *in vitro* study was to evaluate the effect of toluidine and methylene blue dyes, associated to red laser (70; 100mW) and LED on elimination of a suspension of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*). A first test evaluated the bactericidal effect of various concentrations of both dyes (0.05; 0.1; 0.5, 1.0; 2.0; 5.0, 10 mg/ml) in absence of light. In the second test, the experimental groups consisted of positive and negative (gentamicin) controls, groups with three concentrations (0.05; 0.1,10 mg/ml) of dyes alone of associated to low level laser (660 nm; 2.91 and 4.16 W/cm^2; 70 and 100mW; 45 J/cm^2; 0.024 cm^2; 12 and 18s) and LED (627 ± 10 nm; 150mW/cm^2; 10.5 mW; 20 J/cm^2; 0.07cm^2; 123s). Data were analyzed by ANOVA complemented by Tukey's test ($p<0.05$). The results showed that both dyes, with 10 mg/ml, alone or associated to laser and LED caused 100% of death as the negative control ($p>0.05$). It can be concluded that aPDT is capable of eliminate *A.a* depending of the dye concentration.

Key words: Periodontal Diseases. Photosensitizing Agents. Photochemotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação da aPDT 30

Figura 2 - Sal azul de metileno *Sigma-Aldrich* 64

Figura 3 - Sal azul de Toluidina O *Sigma-Aldrich* 64

Figura 4 - Aplicação do LED 68

Figura 5 - Aplicação do Laser 68

Figura 6 - Fluxograma da divisão dos grupos experimentais (Metileno) 68

Figura 7 - Fluxograma da divisão dos grupos experimentais (Toluidina) 68

Figura 8 - Placa de Petri dividida em quadrantes 70

Figura 9 - Curva de concentração de corantes – Azul de Metileno 73

Figura 10 - Curva de concentração de corantes – Azul de Toluidina 74

Figura 11 - Ação bactericida do corante azul de metileno perante terapia fotodinâmica 75

Figura 12 - Placas de Petri com cultura de bactérias após 24 horas (Azul de metileno)) 76

Figura 13 - Ação bactericida do corante azul de toluidina perante terapia fotodinâmica 76

Figura 14 - Placas de Petri com cultura de bactérias após 24 horas (Azul de toluidina) 77

Figura 15 - Imagens ilustrativas de colônias de *A.a* em microscopia invertida (40X) 119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos in vitro de aPDT em Aa 41

Quadro 2 - Ensaios clínicos de aPDT 46

Quadro 3 - Ensaios clínicos que avaliaram resultados clínicos com resultados microbiológicos 50

Quadro 4 - Parâmetros de laser e LED 67

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A.a	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
aPDT	terapia fotodinâmica antimicrobiana
C.s.	*Capnocytophaga* sp
cm	centímetro
cm^2	centímetro quadrado
d	dias
DP	doença periodontal
E.c	*Escherichia coli*
E.cs.	*Eikenela corrodens*
E.f	*Enterococcus faecalis*
En	*Eubacterium nodatum*
FDA	*Food and Drug Administration*
FGF2	fator de crescimento de fibroblastos 2
FS	fotossensibilizador
F.n	*Fusobacterium nucleatum*
HbA1c	hemoglobina glicolisada
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IL-1β	Interleucina β
J	Joule
L	litro
LED	Light Emitting Diode
LPS	lipopolissacarídeos
m	meses
MB	azul de metileno
mg	miligramas
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
MMP-2	metaloproteínase 2
MMP-8	metaloproteínase 2
ms	milissegundos

mW	miliwatts
nm	nanômetro
µg	microgramas
µmol	micromol
µmol L-1	micromolar por litro
NCI	nível de inserção clínica
O_2^-	superóxido
OH^-	hidroxila
OPG	osteoprotegerina
p	nível de significância
P.g	*Porphyromonas gingivalis*
P.i	*Prevotella intermedia*
PI	pré-irradiação
PS	profundidade de sondagem
RANKL	ligante do receptor do fator nuclear kapa B
RAR	raspagem e alisamento radicular
ROO^-	peróxidos
PS	fotossensibilizador
s	segundos
S.a	*Staphylococcus aureus*
SS	sangramento à sondagem
T.f	Tannerella forsythia
TBO	azul de toluidina
TIMP-2	inibidor de metaloproteínase 2 no tecido
TNFα	fator de necrose tumoral α
TNFβ	fator de necrose tumoral β
TSB	Meio Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade formadora de colônia
W	Watt
$^1O_2$	singleto
$^3O_2$	tripleto

LISTA DE SÍMBOLOS

x	vezes
=	igual
>	maior
≥	maior ou igual
<	menor
%	porcentagem
[ ]	Concentração
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

2 REVISÃO DE LITERATURA 27

2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) 29

2.1.1 Princípios da aPDT 29

2.1.2 Corantes Fenotiazínicos: Azul de Toluidina e Azul de Metileno 32

2.2 TRABALHOS *IN VITRO* 35

2.2.1 Bactérias e aPDT 35

2.2.2 *Aa* e aPDT 38

2.3 TRABALHOS *IN VIVO* 43

2.3.1 Uso da aPDT no tratamento periodontal 43

2.3.2 Estudos clínicos 45

2.3.3 Revisões sistemáticas de aPDT 54

3 PROPOSIÇÃO 57

4 MATERIAL E MÉTODOS 61

4.1 MATERIAIS 63

4.1.1 Amostras biológicas utilizadas 63

4.1.2 Materiais de consumo 63

4.1.3 Instrumentos 64

4.1.4 Equipamentos 64

4.2 MÉTODOS 65

4.2.1 Preparo dos materiais microbiológicos 65

4.2.2 Teste I: Efeito bactericida do azul de metileno e de toluidina sozinhos e em diferentes concentrações 66

4.2.3 Teste II: Procedimento de terapia fotodinâmica 66

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 70

5 RESULTADOS 71
5.1 AVALIAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE METILENO E TOLUIDINA EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES 73
5.2 AVALIAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE METILENO E TOLUIDINA POR aPDT EM *A.a* 74

6 DISCUSSÃO 79

7 CONCLUSÕES 93

REFERÊNCIAS 97

APÊNDICES 117

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A remoção mecânica do biofilme dental é atualmente o método mais utilizado para tratar doenças periodontais. Os agentes antimicrobianos são também utilizados, mas o crescimento de bactérias em biofilmes apresentam diversos mecanismos de resistência (LINDHE, 2014).

Tratamentos mecânicos de superfície (raspagem e alisamento radicular-RAR) e da remoção do biofilme supra e subgengival são considerados padrão-ouro para o tratamento de doenças inflamatórias periodontais, tendo como objetivos a destruição do biofilme bacteriano, redução de bactérias, e diminuição da recolonização por microorganismos patogênicos (ALWAELI, AL-KHATEEB, AL-SADI, 2013).

No entanto, a instrumentação mecânica tem limitações e mesmo com tratamento, alguns pacientes ainda têm perda de inserção, provavelmente, devido à persistência de patógenos periodontais e posterior recolonização (BALATA etal., 2013).

O tratamento com agentes químicos, tais como a lavagem com soluções de desinfecção ou a administração de antibióticos locais ou sistêmicos podem ser usados como medidas complementares (LULIC et al., 2009).

Os problemas associados ao uso de antibióticos como possíveis efeitos colaterais desagradáveis, o risco de desenvolvimento de resistência e a dependência do paciente para o uso correto, fazem valer a pena considerar a terapia fotodinâmica como uma alternativa de tratamento para pacientes com periodontite agressiva (ARWEILER et al., 2014). Apesar dos excelentes resultados clínicos obtidos seguindo o uso sistêmico de amoxicilina e metronidazol em conjunto raspagem, a sua utilização é muitas vezes acompanhada por alguns efeitos gastrointestinais. Além disso, a administração frequente de antibióticos sistêmicos pode levar a um aumento do risco de desenvolvimento de resistência dando origem a novas complicações médicas. Portanto, a fim de reduzir os problemas associados com o uso desses fármacos, existe uma necessidade crescente de desenvolvimento de novas estratégias antibacterianas que sejam capazes de eliminar ou reduzir de forma eficaz bactérias periodontopatogênicas (ARWEILER et al., 2014).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é um tratamento que utiliza a energia da luz para ativar um agente de fotossensibilização (fotossensibilizador) na presença de oxigênio (MEISEL, KOCHER, 2005; KONOPKA, GOSLINSKI, 2007; BOTTURA et al., 2011; CAMPOS et al., 2013). O princípio de funcionamento é que o fotossensibilizador (FS) sofre uma transição para um estado de energia mais elevado, produzindo um estado altamente reativo de oxigênio denominado oxigênio singleto (KONOPKA, GOSLINSKI, 2007). Este oxigênio singleto pode causar efeito tóxico em microorganismos. Vários fotossensibilizadores têm mostrado serem eficazes contra microrganismos sem induzir danos nos tecidos do hospedeiro (BRAUN et al., 2007).

Estudos demosntram resultados satisfatórios com este método e a morte bacteriana ocorre devido à luz que incide sobre um agente fotoativo administrado e promove uma reação foto-oxidativa que induz alterações bioquímicas e morfológicas nas células-alvo (BOTTURA, 2011; CAMPOS, 2013).

Muitas bactérias orais são sensíveis ao laser vermelho na presença de fotossensibilizadores, como azul de toluidina, azul de metileno, sugerindo que a aPDT é vantajosa em terapia periodontal (SOUKOS, GOODSON, 2011; PFITZNER et al., 2004). A aPDT pode ser usada como tratamento adjuvante para raspagem e demonstrou ser capaz de matar bactérias e periodontopatógenos *in vitro*. Pesquisas nessa área mostram bons resultados de aPDT contra microorganismos, como *Porphyromonas gingivalis (P.g), Prevotella intermedia (P.i), Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a)* e *Fusobacterium Nucleatum* (THEODORO, 2012).

Assim, a aPDT mostra-se como uma técnica promissora para o tratamento da doença periodontal. Não há na literatura um protocolo definido sobre como realizar a aPDT. Observa-se a presença de muitas variáveis, como tipo e concentração do FS, luz, tempo de pré-irradiação, comprimento de onda, fluência e densidade de energia do laser (SOUKOS, GOODSON, 2011).

Nesse contexto, para compreender quais parâmetros seriam mais eficazes na morte de *A.a*, esse trabalho *in vitro* tem por objetivo comparar dois tipos de corante em diferentes concentrações, dois parâmetros de laser, e um de LED, a fim de estabelecer um protocolo eficaz de aPDT para uso futuro no tratamento de periodontite agressiva.

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

2.1.1 Princípios da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A desinfecção por luz ativada ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (Antimicrobial Photodynamic Therapy – aPDT) foi aplicada pela primeira vez há mais de um século, quando Oscar Raab relatou que o cloridrato de acridina associado a uma fonte de luz, era letal para o microorganismo *Paramecium caudatum* (RAAB, 1900). A aPDT foi abandonada por várias décadas devido à descoberta de antibióticos e às dificuldades de encontrar um agente fotossensibilizador adequado (MONGARDINI, TANNA, PILLONI et al.,2014).

A reação fotodinâmica envolve a utilização de um FS e uma fonte de luz de um comprimento de onda específico, na presença de oxigênio (MEISEL, KOCHER, 2005). A morte de células bacterianas inicia-se quando uma luz com um comprimento de onda compatível com o FS estimula sua molécula para o estado singleto. Em seguida, esta molécula emite fluorescência e retorna para uma energia mais baixa, conhecido como estado tripleto. Além disso, a molécula no estado tripleto pode participar de duas reações: Tipo I ou Tipo II, sendo que ambas necessitam de oxigênio. A Tipo I via envolve reações de transferência de elétrons do FS no estado tripleto com molécula de oxigênio ao redor, assim produzindo espécies citotóxicas, tais como peróxidos (ROO^-), superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), que promovem a destruição da membrana ou de macromoléculas. A reação Tipo II ocorre dependendo da localização do FS na célula. Este, no estado tripleto, transfere seus elétrons para moléculas de oxigênio, mudando de estado fundamental de tripleto ($^3O_2$) para o estado excitado de singleto ($^1O_2$), que pode oxidar várias moléculas biológicas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, conduzindo assim à morte celular (Fig.1) (NAYAK, 2005; PELOI et al., 2008). Este estado altamente reativo de oxigênio tem uma vida muito curta (<0,04 ms) e um raio de ação limitado (100 nm) (JORI et al., 2006; SOUKOS, GOODSON, 2011).

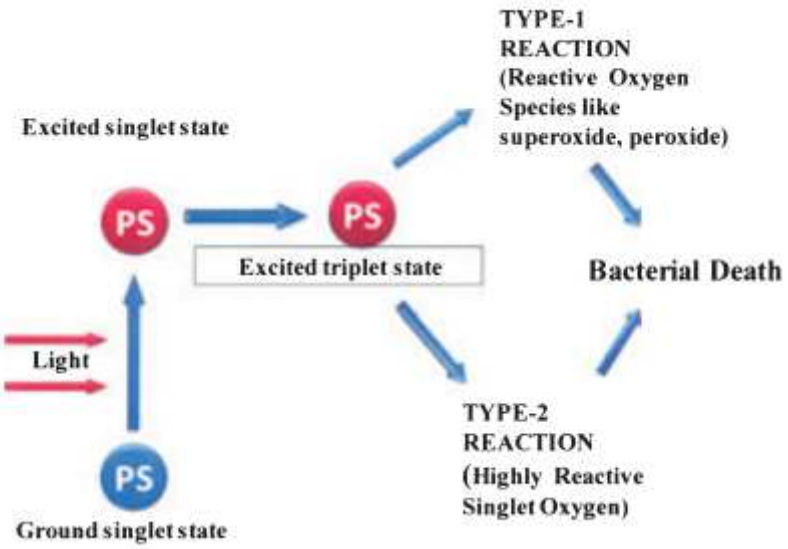


Figura 1 - Mecanismo de ação da aPDT. Fotossensibilizador (PS) após irradiação com luz no comprimento de onda adequado sofre transição para estado singleto e tripleto. Ele reage com espécies reativas de oxigênio endógeno para formar espécies altamente reativas causando a morte celular (RAGHAVENDRA, KOREGOL, BHOLA, 2009).

Espécies reativas de oxigênio são responsáveis por danos irreversíveis à membrana citoplasmática bacteriana, incluindo a modificação de proteínas, ruptura da cadeia respiratória e alterações de ácidos nucléicos (WAINWRIGHT et al., 1997). Usacheva, Teichert e Biel (2001) citam que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis à inativação fotodinâmica, e as bactérias gram-negativas são significantemente mais resistentes a muitos fotossensibilizadores usados em aPDT. Kömerik et al. (2003) acrescentam que realmente gram-positivas são mais susceptíveis à aPDT, mas que escolhendo o FS e o comprimento de onda apropriados, as bactérias gram-negativas podem ser afetadas também.

Além disso, quando há a incorporação do FS na membrana, desorganizando estruturas, há uma melhora da migração desses corantes para o citoplasma em bactérias gram-negativas (MAISCH et al., 2009). Os corantes podem causar o deslocamento de íons de cálcio e magnésio que neutralizam as cargas superficiais negativas por desestabilizar a estrutura da parede celular bacteriana. Danos na membrana citoplasmática podem envolver a perda do conteúdo celular ou a inativação das enzimas e dos sistemas de transporte da membrana, afetando diretamente a saúde da célula (YONEDA et al., 2012).

É importante ressaltar que a relação entre comprimento de onda emitido pela fonte de luz e o espectro de absorção do FS é essencial para desenvolver efeitos

fotoquímicos e fotofísicos. A estreita relação entre o comprimento de onda de absorção do corante deve ser observado no uso da terapia fotodinâmica. Assim, a toxicidade na célula só ocorre quando a banda de absorção do FS é ressonante com a radiação emitida (WILSON, 1996). O comprimento de onda, energia, intensidade de luz, absorção do FS e o tempo de exposição podem desempenhar um papel nos resultados, uma vez que, para alcançar os melhores resultados do FS, esse deve ser sensibilizado pela fonte de luz. Além disso, existem outras variáveis que influenciam as aplicações PDT *in vivo*: como a presença de fluido do sulco gengival, sangue e a estrutura do biofilme (PRATES et al. 2007).

O laser ou uma fonte de luz visível é utilizado para ativar o fotossensibilizador. No passado, os aparelhos de laser eram sistemas complexos e caros. Posteriormente, sistemas de laser de diodo, fáceis de manusear, portáteis e de baixo custo foram desenvolvidos. Mais recentemente, fontes de luz não-laser são usadas: tais como diodos emissores de luz (LED) que são menos caros, pequenos, leves e altamente resistentes. Fotossensibilizadores também podem ser ativados por baixa potência de luz visível com um comprimento de onda específico. Os tecidos humanos transmitem eficientemente a luz vermelha em comprimentos de onda de 630 nm e 700 nm e isso corresponde a profundidades de penetração de luz a partir de 5 mm a 15 mm, respectivamente (SALVA, 2002, KUBLER, 2005). A utilização de uma fonte de luz visível é benéfica em visualizar a área-alvo, a localização da fotoinativação sem danificar o tecido do hospedeiro, bem como, apresentar poucos danos ao operador (WILSON, 1994).

A ativação do fotossensibilizador é dependente da dose de luz em geral, das taxas de dosagem, da profundidade de penetração da luz e da localização da área de alvo. Fontes de luz variam de acordo com a localização e morfologia da lesão sendo que a luz deve ser uniforme e fornecer com eficácia a dose administrada. Cateteres de fibra óptica com difusores terminais cilíndricos ou lentes muitas vezes são usados. A ponta da fibra pode ter várias formas que permitem a difusão em todas as direções ou para um determinado foco. Atualmente, o uso de fibra óptica é muito caro e não é aprovado pela FDA (Food and Drug Administration). Somente fibras difusoras (1-5 cm) são comercialmente disponíveis (ALLISON, MOTA, SIBATA, 2004). Sistemas modernos de fibra óptica e diferentes tipos de endoscópios podem fornecer luz para a lesão alvo com mais precisão. São necessárias fibras de tamanho e forma personalizados para alcançar uma

iluminação mais homogênea (BROWN, BROWN, WALKER, 2004; ALLISON et al., 2006) e, em geral, a luz deve penetrar tanto quanto possível para os tecidos e não produzir efeitos térmicos (RAGHAVENDRA, KOREGOL, BHOLA, 2009).

2.1.2 Corantes Fenotiazínicos: Azul de Toluidina O e Azul de Metileno

Desde o final do século XIX, os corantes fenotiazínicos azul de metileno e azul de toluidina são utilizados na área da saúde pelo fato de serem definidos como corantes biológicos (NUNEZ, GARCIA, GARCEZ, 2013).

Tanto o azul de metileno, quanto o azul de toluidina são fotossensibilizadores potentes. O aumento de eficácia é na ordem MB <monometil-MB <dimetil-MB, em relação à absorção celular. MB e TBO são usados como corantes para mucosa bucal vital (MARTIN, KERAWALA, REED, 1998). MB é um fotossensibilizador utilizado para descontaminação em produtos sanguíneos (AZNAR et al., 2000). Dimetil-MB tem uma elevada afinidade por ácidos nucleicos e fornece muitos produtos de oxigênio singleto, isto é, propriedades favoráveis para morte induzida pela luz em bactérias (WAINWRIGHT, CROSSLEY, 2002).

Ambos os corantes possuem estruturas moleculares simples. Essas características garantem a hidrossolubilidade que é de extrema importância para o uso biológico e para coloração/tingimento de tecido, que são as primeiras aplicações desses corantes (NUNEZ, GARCIA, GARCEZ, 2013). Mas esses podem manchar os dentes, mesmo em concentrações micromolares (WILLIAMS et al., 2004; GEORGE, KISHEN, 2007).

Todos os dois corantes fenotiazínicos produzem soluções de cor azul intensa quando dissolvidos em solventes polares como a água e o metanol. Isto ocorre por ocorrer a absorção dos comprimentos de onda vermelhos provenientes de uma fonte de luz branca e da reflexão/ transmissão dos demais comprimentos de onda visíveis (NUNEZ, GARCIA, GARCEZ, 2013).

O corante metileno é hidrofílico e tem picos de absorção nas bandas de 660nm, já o toluidina que é menos hidrofílico, tem picos de absorção nas bandas de 630nm (USACHEVA et al., 2008). Além disso, o segundo pode sofrer interferência de alguns derivados da hemoglobina (grupo heme) que possuem fraca absorção em 630nm (NUNEZ, GARCIA, GARCEZ, 2013).

Os corantes azuis são metacromáticos, formando complexos em presença de ânions, quando há aumento da concentração e outras reações, mudando seu espectro de absorção devido a alterações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o corante e as moléculas adjacentes. Isso resulta em agregação do corante, muitas vezes na forma de dímeros. Estes têm picos de absorção menores (610 nm para o metileno e 590nm para o toluidina). Esses dímeros mostram uma eficiência fotodinâmica maior, e idealmente, a fonte de luz deveria cobrir ambos os espectros, o que se consegue com o LED. Os monômeros de metileno formam preferencialmente o oxigênio singleto, enquanto que os dímeros formam espécies reativas de oxigênio (NUNEZ, GARCIA, GARCEZ, 2013).

Na literatura é relatado que o azul de toluidina é muito eficiente devido à sua alta absorção, mais significativa do que o azul de metileno (USACHEVA, TEICHERT, BIEL, 2003). O TBO tem-se mostrado um FS eficaz contra muitos microrganismos, incluindo patógenos periodontais *in vitro* (BHATTI et al., 1997; WILSON, DOBSON, SARKAR, 1993), e em modelos animais (QIN et al., 2008). Nos últimos anos, azul de metileno tem sido utilizado para a inativação de uma variedade de vírus em plasma fresco congelado, considerando que o azul de toluidina também foi avaliado como um agente antifúngico e antibacteriano para a inativação de levedura e algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas. Há relatos variados quanto a comparação da eficácia bactericida destes corantes. Ambos os corantes em combinação com luz causam danos em microorganismos como adenovírus (HIATT et al., 1960), bactérias periodontopatogênicas (gram-positivas e gram-negativas) (BHATTI et al., 1998), e em leveduras (LAZAROVA, TASHIRO, 1995). No entanto, azul de metileno apresenta uma maior eficácia contra *Infuenza* virus (LAMBRECHT et al., 1991) e *Helicobacter* (MILLSON et al., 1996), enquanto que azul de toluidina é mais letal a certas bactérias (WILSON, DOBSON, SARKAR, 1993; WAINWRIGHT et al., 1997) e leveduras, como *Candida albicans* (WILSON, MIA, 1993). Atualmente, existem poucos estudos na literatura comparando as propriedades antimicrobianas destes corantes fenotiazínicos contra um número limitado de organismos patogênicos (WILSON, DOBSON, SARKAR, 1993; WAINWRIGHT et al., 1997). Também é complicado comparar os resultados desses trabalhos porque foram realizadas sob diferentes condições.

O processo de morte celular por azul de toluidina seria mais por ligação com lipopolissacarídeos (LPS) da superfície bacteriana e o de metileno via integração com proteínas de membrana como as porinas (USACHEVA et al., 2008). Já o azul de metileno liga-se ao DNA nas bases G-C intercalando-se nos pares de bases. Também pode oxidar diversos aminoácidos como triptofano, tirosina, histidina, metionina e cisteína através de reações do tipo I e II. Algumas organelas como os ribossomos bacterianos podem ser inativados por esse corante, bem como as proteínas, fosfolipídios e colesterol das membranas celulares (GARCEZ et al., 2011). Também, liga-se às mitocôndrias gerando morte celular por apoptose. Porém, é incorporado de forma mais lenta nas células em relação ao azul de toluidina.

Há muito tipos de corantes e diversas mercas disponíveis para utilização. O Periowave® (Ondine Biopharma – Canadá) é um tipo de azul de metileno e o Helbo® (Photodynamic Systems GmbH – Austria) utiliza cloreto de fenotiazina. No mercado nacional, existe o Chimiolux® (DMC – São Carlos) à base de azul de metileno nas concentrações de 0,005%, (Chimiolux 5) e 0,01% (Chimiolux 10) (DAMANTE, 2015).

Usacheva, Teichert e Biel (2001) realizaram um estudo sobre a eficácia bactericida do azul de metileno e azul de toluidina contra diferentes bactérias sob condições com muita e pouca luz para determinar qual corante foi mais eficaz. Suspensões de *Staphylococcus aureus (S.a), Streptococcus pneumoniae (S.p), Enterococcus faecalis (E.f), Hemophilus infuenzae (H.i), Escherichia coli (E.c),* e *Pseudomonas aeruginosa (P.a)* em solução salina foram tratados com laser vermelho e condições de pouca luz, na presença de cada corante e laser de argônio e laser diodo a 630 e 664 nm, respectivamente. O efeito do corante, concentração, tempo de incubação no escuro, intensidade de luz laser na destruição de diferentes bactérias foram comparados. E como resultados, pode-se observar que ambos os corantes erradicaram todas as bactérias pela luz laser, mas o azul de toluidina exibiu melhor atividade bactericida que o azul de toluidina em condições de pouca e muita luz.

2.2 TRABALHOS *IN VITRO*

2.2.1 Bactérias e aPDT

Para a ocorrência da doença periodontal, a presença de uma microbiota periodontopatogênica no biofilme dentário é essencial (SOCRANSKY, HAFFAJEE, 1992), fazendo com que a resposta microbiológica seja um dos principais objetivos do tratamento (HOLT, EBERSOLE, 2005). Por isso, um dos principais objetivos da terapia periodontal é a desorganização do biofilme dental e a erradicação ou supressão de patógenos periodontais (BERNIMOULIN, 2003), além de promover a homeostasia entre o sistema imune do hospedeiro e sua comunidade polimicrobiana (MONGARDINI, TANNA, PILLONI, 2014), já que a mudança de uma ecologia microbiana a partir de um estado patogênico para uma condição de saúde, muitas vezes é devido a uma redução da proporção das bactérias do complexo vermelho (HOLT, EBERSOLE, 2005). E mesmo com um tratamento periodontal, bactérias periodontopatogênicas também podem continuar invadindo o tecido periodontal mostrando-se evidentes após raspagem e alisamento radicular. Assim, a combinação de RAR e outras modalidades de tratamento anti-infecciosos pode ser necessária em alguns casos (THEODORO et al., 2012).

Muitos corantes tem efeitos antibacterianos inerentes, no entanto, é apenas a irradiação que produz um efeito bactericida em biofilmes supra e subgengivais. As superfícies dentárias devem ser facilmente acessíveis para a lavagem com o corante para assim serem ativados com a luz. Meisel e Kocher (2005) citam que para o tratamento de doenças periodontais, aPDT parece ter efeitos promissores.

A aPDT demonstra ser capaz de matar as bactérias periodontopatogênicas e não-periodontopatogênicas *in vitro* (USACHEVA, TEICHERT, BIEL, 2001; CHAN, LAI, 2003). Culturas de *P.g*, *Fusobacterium nucleatum (F.n)* e *A.a* foram tratadas com azul de toluidina (25 µg / mL) e azul de metileno (25 µg / ml) e em todos os grupos foram eficazes, permitindo reduções significativas (WILSON; DOBSON; SARKAR, 1993).

A fotossensibilização letal destes microrganismos devem implicar alterações na membrana e / ou proteínas de membrana plasmática e danos aos DNA mediado pelo oxigênio singleto (BHATHI et al., 1998; MAISCH, 2007). A principal vantagem da aPDT é ser uma terapia específica para células alvo, não tendo nenhum efeito

colateral, pois a sua atividade é iniciada apenas por exposição à luz, não selecionando espécies bacterianas resistentes (MAISCH, 2007).

As bactérias que crescem nos biofilmes são menos acessíveis aos antibióticos devido à proteção dentro da matriz polimérica, bem como a placa de adesão bacteriana nos dentes ou epitélios (SCHENK et al., 2000; VITKOV et al., 2002). Assim, há um tipo de resistência a drogas ou a disponibilidade que pode ser prejudicada, fatores que podem ser evitados com o uso da aPDT (GILBERT, DAS, FOLEY, 1997). No entanto, a organização do biofilme é um fato importante a ser considerado. Bactérias em um complexo extremamente organizado são menos susceptíveis à fotodestruição quando comparada a microorganismos em caldo de cultura. A absorção de fotossensibilizadores para a placa é impedida, da mesma forma que a de antibióticos (QIAN, SAGERS, PITT, 1997). O tratamento fotodinâmico influencia a estrutura do biofilme como desgaste do biofilme e perda da biomassa (WOOD et al., 1991).

Há dois mecanismos básicos que têm sido propostos para explicar o dano letal causado por aPDT às bactérias: (1) o dano ao DNA e (2) danos ao a membrana citoplasmática, vazamento do conteúdo ou células, possibilitando a inativação de enzimas e os sistemas de transporte de membrana (HAMBLIN, HASAN, 2004). A quebra em ambos DNAs de cadeia simples ou dupla, e o desaparecimento de plasmídeos tem sido detectados em todas as espécies bacterianas após aPDT com diversos tipos de fotossensibilizadores. Embora ocorra o dano ao DNA, esta não é a principal causa de morte da célula bacteriana. A alteração das proteínas da membrana citoplasmática, perturbações da síntese da parede celular e o aparecimento de uma estrutura multilamelar próxima ao septo de células em divisão, em conjunto com a perda de íons de potássio a partir das células, podem ser causas possíveis da morte. A hipótese tem sido de que os fotossensibilizadores que reagem principalmente através de mecanismos do tipo I penetram a membrana externa das bactérias gram-negativas, enquanto que os fotossensibilizadores do tipo II penetram a membrana exterior de bactérias gram-positivas mais eficientemente (NITZAN et al., 1992; VALDUGA et al., 1999).

Para Raghavendra, Koregol e Bhola (2009), a carga de superfície do fotossensibilizador determina a sua ligação com a membrana celular. A interação eletrostática entre a superfície positivamente carregada de fotossensibilizador e a

membrana carregada negativamente das bactérias parecem estar diretamente relacionadas à morte bacteriana (RAGHAVENDRA, KOREGOL, BHOLA, 2009).

A susceptibilidade para a destruição das bactérias por aPDT é diferente entre espécies gram-positivas e gram-negativas. Bactérias gram-positivas são mais susceptíveis a fotoinativação de bactérias gram-negativas. As variações estruturais na sua membrana citoplasmática são responsáveis pela susceptibilidade aumentada de bactérias gram-positivas para ligação a fotossensibilizadores. Em bactérias gram-positivas, a membrana citoplasmática exterior relativamente porosa, os peptidoglicanos e o ácido lipoteicóico fora da camada citoplasmática permitem que o fotossensibilizador se difunda eficientemente em locais sensíveis. Em bactérias gram-negativas, a estrutura da membrana externa é mais complexa, a formação de uma barreira física e funcional entre a célula e o seu ambiente, dificulta que o fotossensibilizador ganhe acessos a sítios (HAMBLIN, HASAN, 2004).

As bactérias gram-negativas representam os microorganismos mais resistentes e responsáveis por infecções fatais em seres humanos, especialmente os idosos. A resistência dessas bactérias leva ao desenvolvimento de novas modalidades de tratamento e de novas drogas antibacterianas contra estes organismos. A fim de enfrentar o problema das bactérias gram-negativas tem-se que reavaliar a compreensão atual da organização molecular e funções da membrana externa bacteriana. Exceto no micoplasma, bactérias possuem nas paredes celulares, um componente comum chamado mureína, ou peptidoglicano, o qual contribui para a rigidez mecânica. Todas as bactérias gram-negativas contêm uma camada adicional na estrutura da parede celular, da membrana exterior, que está localizado no exterior da camada de peptidoglicano e mostra-se como uma estrutura trilamelar. É cada vez mais claro que a membrana exterior é muito importante para a fisiologia desses microorganismos, tornando-os resistentes a fatores de defesa celular e humoral. A membrana externa desencadeia mecanismos de resistência a muitos antibióticos fazendo com que esse mecanismo esteja relacionado com a prevalência de infecções por gram-negativos no ambiente hospitalar (NIKAIDO, VAARA, 1985; MALIK, LADAN, NITZAN, 1991).

A membrana externa bacteriana mostra propriedades funcionais incomuns: alta permeabilidade de solutos hidrofílicos e uma permeabilidade muito baixa em relação solutos lipofílicos. Em relação a dois elementos de membrana externa: o lipopolissacarídeo e as porinas, as bactérias gram-negativas são capazes de

produzir uma camada que, por um lado atua como uma barreira de permeação muito eficaz e, por outro lado permite ainda a difusão eficiente de nutrientes. Uma função importante da membrana externa é fazer com que a superfície bacteriana seja bem forte em relação à hidrofilia. Na maioria das vezes solutos hidrofílicos atravessam os canais cheios de água da membrana externa através das porinas. Canais de porina podem, no entanto, ser muito estreitos e agir como barreiras eficazes para a penetração de compostos grandes ou hidrofóbicos (NIKAIDO, 1989). Estudos indicaram que a membrana celular e parede exterior complexa de bactérias gram-negativas protegem o citoplasma, e assim, evitam a ligação de moléculas à membrana (EHRENBERG, MALIK, NITZAN, 1985; MALIK, LADAN, NITZAN, 1991).

A organização das camadas de membrana externa prejudica qualquer tipo de fotossensibilização por impedir a passagem de produtos intermediários: como oxigênio singleto ou radicais livres hidroxila que são transportados através destas camadas e alcançam sítios-alvo dentro da célula dos gram-negativos ou agem como alvos do oxigênio singleto (NITZAN, SHAINBERG; MALIK, 1989; MALIK, LADAN, NITZAN, 1991).

No entanto, a difusão pode ser potencializada por: (1) Ligação do sensibilizador a uma molécula policatiônica. Esse elo enfraquece as interações intermoleculares, desorganizam a estrutura, e a tornam mais permeável às drogas, permitindo-lhes atravessar a membrana externa (VAARA, 1992); (2) utilização de agentes ativos de membrana, que liberam lipopolissacarídeo ou induzem a sensibilização do patógeno; (BERTOLONI et al., 1990) e (3) conjugação do sensibilizador para anticorpos monoclonais que se ligam a antígenos específicos (BHATTI et al., 2000).

2.2.2 *A.a* e terapia fotodinâmica antibacteriana

Uma das associações mais fortes entre um suposto patógeno e a doença periodontal agressiva envolve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* antigamente conhecido como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (WILSON, 2004; GOULART et al., 2010). Esse microorganismo é um bastonete extremamente pequeno, imóvel, gram-negativo, sacarolítico, capnofílico, com terminação arredondada, que forma pequenas colônias convexas de centro “estrelado” quando no cultivo de ágar-sangue (SCHACHER et al., 2007; LINDHE, LANG, KARRING, 2014).

A periodontite agressiva é caracterizada pela rápida destruição do periodonto, particularmente pior em pacientes jovens. Também tem sido isolado em casos de endocardite bacteriana e de abscessos cerebrais e subcutâneos (GOULART et al., 2010).

É altamente relacionado com a etiologia e patogênese da doença periodontal, aparecendo em níveis críticos em biofilmes subgengivais, que pode induzir a destruição dos tecidos (WILSON, 2004; GOULART et al., 2010). Este microrganismo tem um grande número de fatores de virulência, que conduz à colonização da cavidade oral e invasão do tecido periodontal (WILSON, HENDERSON, 1995).

Não há um protocolo definido contra periodontite agressiva, o que faz com que essa doença não avance ou que mantenha os pacientes com uma condição estável. A terapia mais comumente adotada é a remoção mecânica para desorganizar o biofilme e reduzir a aderência bacteriana (SLOTS, TING, 2000). Esta abordagem está normalmente associada ao uso de antibióticos sistêmicos. Embora a literatura descreva uma série de substâncias antimicrobianas de uso local na forma de gel, comprimidos e líquidos de irrigação, nenhum deles têm demonstrado resultados clínicos relevantes (BONITO, LUX, LOHS, 2005). Além disso, a resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno que vem aumentando, podendo ser uma consequência da utilização inadequada em infecções bacterianas e com uso excessivo na produção de alimentos, em fertilizantes e produtos de limpeza. Além disso, a administração de drogas sistêmicas pode ter muitos efeitos, tais como distúrbios gastrointestinais, alergias, absorção de tetraciclina pelos dentes e ossos, intolerância ao álcool, entre outros (MEISEL, KOCHER, 2005).

Chondros et al. (2009) cita que esses mesmos microorganismos são eficazmente erradicados pela terapia fotodinâmica, tanto em suspensão aquosa e como em um biofilme, enquanto que a presença de substâncias típicas do ambiente bucal, tais como dentina desmineralizada e colágeno, não interferem na cinética e eficiência do processo.

Poucos trabalhos sobre *A.a.* e aPDT *in vitro* são encontrados na literatura. Assim como outros estudos sobre essa terpia, observa-se vários tipo de parâmetros de laser, além de diferentes tipos e concentrações de corantes. Essas características impedem uma fidedigna comparação entre metodologias, e assim, resultados.

No quadro 1, pode-se observar essas discrepâncias, todavia, todos os resultados obtidos pelos respectivos estudos, mostraram redução significante desse microorganismo, com exceção do trabalho de Pfitzner et al. (2004), em que houve pouca diminuição de *A.a.*, mas uma eliminação satisfatória de outros microorganismos periodontopatogênicos como *P.g*, *F.n* e *Capnocytophagasp.*

Quadro 1 - Estudos *in vitro* de aPDT em Aa

Autores	Tipo de luz	Dosimetria	Corante	Concentração	Tempo PI	Principais resultados
CHO et al., 2015	LED 520 a 530 nm	1min (150 mW/cm^2, 9 J/cm^2) e 30s (150 mW/cm^2, 4,5 J/cm^2)	Eritrosina	500 µL of 20 µM	1 min	Redução de microorganismos em todos os grupos
MOSLEMI et al., 2015	Laser 662±0.1 nm LED (625–635 nm)	Laser: 6 j/cm^2 e 34 s LED: 6 j/cm^2 e 30 s	Azul de Toluidina Radachlorin	Azul de Toluidina (0,1 mg/mL) Radachlorin (0,1%)	Laser: 34s LED: 20s	Redução de microorganismos
EICK et al., 2013	LED 625-635 nm	2 W/cm^2	Azul de toluidina	0,1 mg/ml	30 3 60s	Redução de microorganismos
UMEDA et al., 2011	LED 650 nm	4 J/cm^2, 20s e 8 J/cm^2, 10s	Azul de metileno e Azul de Toluidina	Azul de metileno e Azul de Toluidina 0,2; 0,5; 2, 5, 10 e 20 µg/mL	10 e 20s	Redução de microorganismos
MATTIELLO et al., 2011	Laser 660 nm	40mW, 10 J/cm^2	Azul de Toluidina	0,01%	5 min	Redução de microorganismos
GOULART et al., 2010	Fotopolimerizador 400-500 nm	350–500 mW/cm^2 2 J/cm^2 1 a 3 min	Azul de Metileno e Eritrosina	2 µmol/L	10 a 30 min	Redução de microorganismos

GOULART et al., 2010	Fotopolimerizador 400-500 nm	0,65 J/cm2 10s a 3 min	Rosa Bengal	0,01 a 50 µ mol L-1	10 a 30 min	Redução de microorganismos
PRATES et al., 2007	Laser diodo vermelho 660 nm	30 mW/ 5,4 J/cm2 (3 min) e 9 J/cm2 (5 min)	Verde de Malaquita	0,01%	5 min	Redução de microorganismos
PFITZNER et al., 2004	Laser diodo 662 ±3 nm	4W 5,3 J/cm2 (60 s e 20,1 J/cm 2 (60s)	BLC 1010# e BLC 1014# chlorin e6	10 µM	15 min	Pouca redução de Aa
CHAN e LAI, 2003	Laser He-Ne (632 nm) e Laser diodo com 665 nm e 830	He-Ne laser: 30 mW por 30 s e 3,2 J/cm2 ou 60 s (6,4 J/cm2), Laser diodo: 100 mW por 30 s e 10,6 J/cm2 ou 60 s (21,2 J/cm2)	Azul de Metileno	0,01%		Redução significativa de microorganismos. Laser diodo com melhores resultados

2.3 TRABALHOS *IN VIVO*

2.3.1 Uso da aPDT no tratamento periodontal

Agentes microbianos são considerados o fator etiológico primário da doença periodontal inflamatória, e assim o principal objetivo da terapia periodontal é eliminar todos os depósitos de bactérias no dente e no periodonto (SLOT, 1979).

A RAR consiste na remoção mecânica do biofilme e cálculo sendo que muitas vezes é realizada com o uso adjuvante de diferentes tipos de antimicrobianos (MONGARDINI, DI TANNA, PILLONI, 2014). Apesar das melhorias clínicas, uma completa erradicação de patógenos periodontais é muito difícil ou impossível de alcançar (HAFFAJEE et al., 1997) principalmente porque só procedimentos de debridamento podem não ser eficientes, devido à presença de lesões dentro de bolsas profundas ou por áreas mais difíceis de alcançar, como furcas (WYLAN et al., 1993) e áreas de concavidades (MEISEL, KOCHER, 2005). E pelo fato de que alguns patógenos são mais resistentes, podendo haver a recolonização de sítios tratados (MONGARDINI, DI TANNA, PILLONI,2014).

A instrumentação repetida em bolsas residuais remove uma quantidade substancial de substância dentária ao longo do tempo (RITZ, HEFTI, RATEITSCHAK, 1991; ZAPPA et al., 1991) podendo causar recessão gengival (BADERSTEN, NILVEUS, EGELBERG, 1984), e provocar uma hipersensibilidade dos dentes aos estímulos térmicos e físicos (VON TROIL, NEEDLEMAN, EGELBERG, 2002). Vários métodos antimicrobianos locais e sistêmicas tem sido propostos para uma melhor supressão de microorganismos periodontopatogênicos. O uso repetido de antibióticos em bolsas residuais durante o tratamento de manutenção é, no entanto, não é aconselhável (CAMPANILE et al., 2015).

Antibióticos locais e sistêmicos são ocasionalmente administrados para desinfecção, mas há desvantagens, como dificuldade em estipular concentrações terapêuticas suficientes para assegurar a erradicação microbiana, e a possibilidade de afetar microflora normal causando infecções oportunistas (WILSON, 2004).

Diante desses fatos, houve a necessidade de outros tipos de tratamento. Dentre eles, pode-se citar a aPDT que por causa do seu efeito bactericida e de desintoxicação, pode ser um adjuvante para a terapia benéfica mecânica periodontal (WILSON, DOBSON, SARKAR, 1993).

A aPDT é utilizada como tratamento complementar na terapia periodontal, provendo muitos benefícios terapêuticos. O seu uso pode aumentar o conforto do paciente e diminuir o tempo de tratamento (MEISEL, KOCHER, 2005; RAGHAVENDRA, KOREGOL, BHOLA, 2009).

Ela mostra um grande efeito microbicida, tendo efeitos locais específicos, e também seletividade para os agentes patogênicos (HABLIM, HASAN, 2004), evitando danos dos tecidos do hospedeiro na região de infecção (MOORE, PENDSE, EMBERTON, 2009). Se houver a completa remoção do biofilme em bolsas profundas residuais durante a fase de manutenção, não é necessário o retratamento mecânico, evitando efeitos nocivos desse tratamento como a hipersensibilidade dentinária.

Além de não ter a necessidade da prescrição de antibióticos, evitando a possibilidade de efeitos secundários; também não é preciso anestesiar a área a ser medicada, pois a destruição de bactérias é realizada em um período muito curto (menos de 60 segundos). O desenvolvimento da resistência à aPDT é menor, pois o oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio interagem com várias estruturas celulares em diferentes vias metabólicas (RAGHAVENDRA, KOREGOL, BHOLA, 2009).

Com a aPDT, pode-se diminuir a chance de bacteremia (RAGHAVENDRA, KOREGOL, BHOLA, 2009) que é considerada um risco periodontal de doenças sistêmicas, tais como: doenças cardiovasculares e diabetes (GREENWELL, BISSADA, 2002). Se a resistência contra antibióticos acontecer, a aPDT pode ser uma alternativa valiosa para a maioria indicações em que foram administrados antibióticos, podendo ser utilizado sem efeitos colaterais em pacientes imunossuprimidos (MEISEL, KOCHER, 2005).

Chan e Lai (2003) e Raghavendra, Koregol e Bhola (2009) acrescentam que o uso de aPDT possui algumas outras vantagens como o fato de ser uma terapia tópica, uma vez que o corante é aplicado exclusivamente na área infectada. Assim, ela apresenta efeitos locais e específicos, prevenindo doses excessivas e reduzindo as chances de efeitos colaterais associados com a administração de drogas sistêmicas.

A possibilidade de efeitos adversos nos tecidos do hospedeiro muitas vezes foi questionada como uma possível desvantagem do uso da aPDT para o tratamento de doenças infecciosas. Quando utilizada para tratamento periodontal *in vivo* requer

um regime terapêutico onde as bactérias são mortas sem causar danos ao tecido adjacente. Estudos *in vitro* e em animais sugerem que isso não pode ser considerado um problema, uma vez que as doses de energia e concentrações de fotossensibilizador necessárias para matar o organismo infectante, tenha pouco efeito sobre os tecidos adjacentes do hospedeiro (KÖMERIK et al., 2002).

Clinicamente, é importante assegurar que o efeito dos sensibilizadores nas células epiteliais e em tecidos conjuntivos é mínimo. A profundidade de penetração no epitélio depende do tipo de fotossensibilizador e o tempo de incubação. O epitélio na área dentogengival atua como barreira principal para a invasão de estímulos nocivos, agindo como uma barreira à penetração de fotossensibilizantes (RAGHAVENDRA; KOREGOL; BHOLA, 2009).

2.3.2 Estudos clínicos

Os trabalhos *in vivo* apresentam bons resultados da aPDT quando utilizados em conjunto com a raspagem e alisamento radicular no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal.

O Quadro 2 mostra um resumo dos trabalhos encontrados na base de dados PUBMED com o descritor: "*periodontal disease and antimicrobial photodynamic therapy*" e "*periodontitis and antimicrobial photodynamic therapy*" (adaptado de DAMANTE,2015).

Neste, há um resumo de diversos trabalhos clínicos comparando tipos de estudos e os parâmetros de laser além do tipo e concentração dos corantes utilizados em aPDT.

Como já mencionado no capítulo de estudos *in vitro*, devido as diversas variáveis, principalmente com o número de aplicações de aPDT e o tempo de pré-irradiação, como também a falta de um protocolo clínico, dificultando posterior comparação entre os estudos. As diferenças entre os estudos pode ser parcialmente explicado pelo uso de diferentes metodologias, como diferentes diâmetros da fibra ótica, diversos parâmetros de irradiação e comprimentos de onda (THEODORO et al., 2012).

Quadro 2 - Ensaios clínicos que avaliaram o uso da terapia fotodinâmica como coadjuvante da raspagem e alisamento radicular no tratamento periodontal. Busca PUBMED com palavras-chave "Photodynamic therapy periodontitis" (Adaptado de DAMANTE, 2015)

Autores	Desenho	n	Doença	laser	dosimetria	corante	Concentração	Tempo PI	Frequência aPDT	Principais resultados
DE OLIVEIRA et al., 2007	Boca dividida	10	DP agressiva	660	60mW/cm², 10s	HELBO	10mg/ml	1min	única	sem diferenças clínicas
BRAUN et al., 2008	Boca dividida	20	DP crônica	660	100mW	HELBO	x	3min	única	melhora PS e NCI (3m),SS (3m) diminuição do fluido gengival
CHRISTOULIDES et al., 2008	Paralelo	24	DP crônica	670	75mW, 1min	HELBO	10mg/ml	3min	única	redução SS
AL-ZAHRANI et al., 2009	Paralelo	45	Diabetes	670	60s	MB Periowave	0,01%	5-10s	única	sem diferença clínica comparado a doxiciclina
CHONDROS et al., 2009	Paralelo	24	Manutenção (bolsas≥4mm)	670	75mW/cm², 60s	HELBO	10mg/ml	x	única	redução: SS(3 e 6m), Fn.,E.n. (3m) E.c.; C.s.(6m)
DE OLIVEIRA et al., 2009	Boca dividida	10	DP agressiva	660	60mW/cm², 10s	HELBO	10mg/ml	1min	única	sem mudanças TNFα e RANKL
LULIC et al., 2009	Paralelo	10	Manutenção	670	75mW/cm², 1min	HELBO	10mg/ml	3min	5x em 2 semanas	reduziu parâmetros clínicos (até 6m)
POLANSKY et al., 2009	Paralelo	58	DP crônica	680	75mW, 1min	HELBO	10mg/ml	3min	única	sem diferença clínica e microbiológica
PINHEIRO et al., 2010	Boca dividida	10	DP crônica	632,8	4J/cm², 60s	50%TBO (0,005%) + 50% endo PTC	50%	3min	única	redução microbiológica
RÜHLING et al., 2010	Paralelo	54	Bolsas residuais	635	100mW, 1min	TBO	5%	30s	única	sem diferenças clínicas e microbiológicas
SÉGUIER et al., 2010	Boca dividida	16	DP crônica	670	0,5W/cm², 12,7J/cm², 40s	Ftalocianina	x	3x de 5 min	única	redução céls. Apresent. de antígeno, aumento fibras colágenas
SIGUSCH et al., 2010	Paralelo	24	DP crônica com F.n.	660	60mW/cm², 1min	HELBO	10mg/ml	1min	única BT + língua	melhora nos parametros clínicos e redução *F. n*
GE et al., 2011	Paralelo	58	DP crônica	670	140mW, 60s, 6J, 21J/cm²	MB	0,01%	30s	única	redução SS (princip. Bolsas ≥5mm)
LUI; CORBET; JIN, 2011	Boca dividida	24	DP crônica	940	5W, pulsado, 30s	MB	1%	3min	única	redução PS, SS, fluido gengival, IL-1β (1m)
BERAKDAR et al., 2012	Boca dividida	22	DP crônica	670	150mW, 60s	MB Periowave	0,005%	x	única	redução PS (6m)
CAPPUYNS et al., 2012	Boca dividida	32	Bolsas residuais	660	40mW	HELBO	10mg/ml	1min	única	sem diferença clínica e microbiológica
GIANNELLI et al., 2012	Boca dividida	26	DP crônica	635	100mW, 1 min	MB	0,3%	5min	4 a 10 vezes	melhor PS, SS, NCI, espiroquetas
GIANNOPOULOU et al., 2012	Boca dividida	32	Bolsas residuais	660	100mW, 3J/cm², 1min	HELBO	10mg/ml	3min	única	sem diferenças nas citocinas de fase aguda

continua

continuação

Autores	Desenho	n	Doença	laser	dosimetria	corante	Concentração	Tempo PI	Frequência aPDT	Principais resultados
NORO FILHO et al., 2012	Boca dividida	12	HIV	660	0,03W, 0,428W/cm², 57,14J/cm², 133s	MB Chimiolux	0,01%	5min	única	Melhoras em PS, NCI, (6m) sem diferença microb.
NOVAES et al., 2012	Boca dividida	10	DP Agressiva	660	0,06W, 10s, 212,23J/cm²	HELBO	10mg/ml	1min	única	redução de Aa, raspagem reduziu complexo vermelho
THEODORO et al., 2012	Boca dividida	33	DP crônica	660	30mW, 150s, 4,5J, 0,4W/cm², 64,28J/cm²	TBO	100µg/ml	1min	única	sem diferença clínica, redução microbiológica (180d)
ANDRADE et al., 2013	Boca dividida	15	Furca classe III	660	60mW/cm², 1min	MB	10mg/ml	1min	única	Regulação de TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL
BALATA et al., 2013	Boca dividida	22	DP severa	660	100mW, 9J, 90s, 320J/cm²	MB	0,00 5%	2min	única	sem diferenças clínicas
BASSIR et al., 2013	Boca dividida	16	DP crônica	LED 628	2W/cm², 10s	TBO	0,1mg/ml	3min	única	sem diferenças clínicas
CAMPOS et al., 2013	Boca dividida	13	Bolsas residuais	660	60mW, 129J/cm²	MB	10mg/ml	1 min	única	Redução PS, ganho NCI (3mm)
DILSIZ; CANAKCI; AYDIN, 2013	Boca dividida	24	DP crônica	808	100mW, 6J, 60s	MB	1%	3min	única	aPDT pior que o laser de alta
LUCHESI et al., 2013	Paralelo	37	Furca classe II	660	60mW/cm², 129J/cm², 1min	MB	10mg/ml	1min	única	Sem diferença clínica, Redução Pg. Tf. E citocinas
SOUZA et al., 2013	Boca dividida	15	Furca classe III	660	60mW/cm², 1min	HELBO	10mg/ml	1min	única	aumento TGFβ e volume fluido gengival
ARWEILER et al., 2014	Paralelo	36	Agressiva	660	1min.	HELBO	10mg/ml	3min	única	aPDT x antibiótico = antibiótico melhores resultados
BETSY et al., 2014	Paralelo	88	DP crônica	655	1W, 60mW/cm²,60s	MB	10mg/ml	3min	única	Melhoras PS e NCI em 3 e 6mm. Redução SS
CHITSAZI et al., 2014	Boca dividida	24	DP agressiva	670	75mW, 2min.	TBO	X	1min	única	SS melhor, sem diferenças microbiológicas
FRANCO et al., 2014	Boca dividida	15	DP severa	660	60mW/cm², 90s, 5,4Jcm²	MB	0,01%	5min	4x - 1x/semana	melhora SS, aumento RANK/OPG e FGF2
KOLBE et al., 2014	Boca dividida	22	Bolsas residuais	660	60mW, 129J/cm², 1min	MB	10mg/ml	1min	única	Redução SS (6m), Redução Pg. Aa., melhora nas citocinas
MACEDO et al., 2014	Paralelo	30	Crônica/ diabetes	660	60mW, 28mW/cm², 1min, 16,72J/cm²	Cloreto fenotiazina	10mg/ml	1min	única	Sem diferenças clínicas, redução HbA1c
MONGARDINI; DI TANNA; PILLONI, 2014	Boca dividida	30	Crônica - manutenção	LED 628	1W, 2W/cm², 20J/cm², 10s	TBO	0,1mg/ml	1min	única	redução PS e bactérias complexo vermelho
MOREIRA et al., 2014	Boca dividida	20	DP agressiva	670	0,25W/cm², 75mW, 2,49J/cm², 10s	HELBO	10mg/ml	1min	4x - 2, 7, 14 d.	melhor PS e NCI (90d) Sem diferenças microbiologicas
PETELIN et al., 2014	Paralelo	27	DP crônica	660	60mW/cm², 1min	HELBO	10mg/ml	3min	Única	Redução SS (3 e 12m), Aa., Td., Tf.
POURABBAS et al., 2014	Boca dividida	24	DP crônica	638	8 a 10J/cm², 120s	TBO	X	1min	Única	sem diferenças clínicas, redução de TNF-α
Autores	**Desenho**	**n**	**Doença**	**laser**	**dosimetria**	**corante**	**Concentração**	**Tempo PI**	**Frequência aPDT**	**Principais resultados**

QUEIROZ et al., 2014	Boca dividida	20	Fumantes DP crônica	660	60mW/cm²	HELBO	10mg/ml	1min	única	sem diferenças clínicas
ALWAELI, KHATEEB, AL-SADI, 2015	Boca dividida	16	DP crônica	660	100mW, 1min	HELBO	10mg/ml	1 a 3min	única	melhora PS e NCI após 12 meses
CAMPANILE et al., 2015	Paralelo	28	Bolsas residuais	670	60s	MB Periowave	x	1min	2x/semana	Redução PS, SS, bolsas, proteína C reativa, sem diferenças microbiol.
CARVALHO et al., 2015	Paralelo	34	Bolsas residuais	660	90 J/cm^2,40mW, 90s	MB Chimiolux	0,01%	5 min	Inicial, 3, 6 e 9 meses	Sem diferenças clínicas para RAR mas com melhoras para bolsas residuais
CORRÊA et al., 2015	Boca dividida	15	Bolsas residuais	660	60 mW, 129 J/cm^2, 1 min	Azul de Metileno	10 mg/ml	1 min	única	Melhoras clínicas
GIANNELLI etal., 2015	Boca dividida	24	Crônica	635	100 mW, 3.8 J/cm^2, 2 min	Azul de Metileno	0,3%	5 min	Mais de 1	Resultados adicionais à RAR
QUEIROZ et al., 2015	Boca dividida	23	DP crônica/ fumantes	660	60mW, 28mW/cm², 1min, 16,72J/cm²	HELBO	10mg/ml	1min	única	Sem diferença clínica, redução de IL-1β e MMP-8
BETSY et al., 2016	Paralelo	88	DP crônica	655	60 mW/cm^2, 1 min	Azul de Metileno	10mg/ml	1 min	única	Redução do sangramento, halitose e dor
JACOB et al., 2016	Boca dividida	20	Agressiva	LED 628	10s	Azul de Metileno	-	1 min	única	Sem diferenças clínicas em relação à RAR

PS= profundidade de sondagem; **NCI=** nível clínico de inserção; **SS=** sangramento à sondagem; **DP=** doença periodontal; **A.a=** *Aggregatibacter Actinomicetemcomitans;* **F.n=** *Fusobacterium nucleatum;* **E.n.=** *Eubacterium nodatum;* **P.g=** *Porphyromonas gingivalis;* **E.c.=** *Eikenela corrodens;* **C.s.=** *Capnocytophaga* sp.; **m=** meses; **d=** dias; **TBO=** azul de toluidina O; **MB=** Azul de metileno; **PI=** pré-irradiação; **RAR**=Raspagem e alisamento radicular

Baseando-se nesse quadro, pode-se perceber que a maioria das pesquisas revelam que aPDT é bastante utilizada no tratamento da periodontite crônica ou de bolsas residuais. Além disso, nota-se que o azul de metileno é o corante mais aplicado, associado com o laser de 660-670nm.

Já o uso de azul de toluidina foi bem menor e poucos trabalhos o associaram ao laser de 630nm que é o seu espectro de absorção ideal (PINHEIRO et al., 2010; RÜHLING et al., 2010; POURRABAS et al., 2014), não obtendo diferenças clínicas significantes. Porém outras pesquisas o associaram com o laser de 660nm (THEODORO et al., 2012; CHITSAZI et al., 2014) e assim tendo resultados clínicos e microbiológicos favoráveis.

Na maioria dos estudos clínicos bons resultados da aPDT como adjuvante da RAR tem sido revelados (GE et al., 2011; LUI, CORBET, JIN, 2011; BERAKDAR et al., 2012; GIANNELLI et al., 2012; NORO FILHO et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; LUCHESI et al., 2013; BETSY et al., 2014; FRANCO et al., 2014; KOLBE et al., 2014; CAMPANILE et al., 2015; CORRÊA et al., 2015; GIANNELLI et al., 2015; BETSY et al., 2016; JACOB et al., 2016).

A literatura mostra evidências conflitantes de ensaios clínicos que relatam diferenças entre resultados clínicos e microbiológicos, alguns mostrando nenhum efeito adjuvante, enquanto outros pesquisadores relataram melhores resultados clínicos e/ou microbiológicos (Quadro 3), após sessão única ou múltiplas de aPDT. No quadro 3, podemos avaliar que poucos estudos fazem análises clínicas e microbiológicas concomitantemente. Desses, a maioria dos trabalhos obtiveram bons resultados com a diminuição de microorganismos periodontopatógenos.

Quadro 3 - Ensaios clínicos que avaliaram resultados clínicos com resultados microbiológicos

Autores	Doença	MO investigado	Tipo de luz	Dosimetria	Corante	Concentração	Tempo PI	Frequência aPDT	Principais resultados microbiológicos
PINHEIRO et al., 2010	DP crônica	Biofilme	Laser 632,8	4J/cm², 60s	50%TBO (0,005%) + 50% endo PTC	50%	3 min	Única	Redução significante de bactérias
RÜHLING et al., 2010	Bolsas residuais	*A.a, P.g, T.d, T.f, F.n, P.i*	Laser 635	100mW, 1min	Azul de Toluidina	5%	30s	Única	Diminuição microbiológica
SIGUSCH et al., 2010	DP crônica	*F.n*	Laser 660	60mW/cm², 1min	HELBO	10mg/ml	1min	Única (Boca toda) + língua	Redução de microorganismos
THEODORO et al., 2012	DP crônica	*A.a, P.g, P.i, P.n, T.f,*	Laser 660	30mW, 150s, 4,5J, 0,4W/cm², 64,28J/cm²	Azul de Toluidina	100µg/ml	1min	Única	Redução significante de periodonto-patógenos
MONGARDINI; DI TANNA; PILLONI, 2014	DP crônica	*A.a, P.g, T.d, T.f, F.n, P.i*	LED 628	1W, 2W/cm², 20J/cm², 10s	Azul de Toluidina	0,1 mg/ml	1 min	Única	Redução de bactérias do complexo vermelho

QUEIROZ et al., 2014	DP crônica (fumantes)	Biofilme	Laser 660	60mW/cm²	HELBO	10mg/ml	1min	Única	Redução de microorganismos
CAMPANILE et al., 2015	Bolsas residuais	*P.g, A.a, T.f, T.d, P.i, P.m*	Laser 670	60s	Azul de Metileno	X	1 min	1 ou 2 x por semana	Sem diferenças microbiológicas
KOLBE et al., 2014	Bolsas Residuais	*A.a, P.g*	Laser 660	60mW, 129J/cm², 1min	Azul de metileno	10mg/ml	1min	Única	Redução significante de bactérias
CORRÊA et al., 2015	Bolsas Residuais	*A.a, P.g*	Laser 660	60 mW, 129 J/cm^2, 1 min	Azul de metileno	10mg/ml	1min	Única	Redução de Aa
CARVALHO et al., 2015	Bolsas residuais	*A.a, P.g, T.d, T.f*	Laser 660	90 J/cm^2,40mW, 90s	MB Chimiolux	0,01%	5 min	Inicial, 3, 6 e 9 meses	Sem diferença ente grupo teste e controle com maior diminuição de Tf
JACOB et al., 2016	Agressiva	*A.a*	LED 628	10s	Azul de metileno	-	1 min	Única	Sem redução de Aa

Há poucos estudos sobre o uso da aPDT em periodontite agressiva. Os estudos utilizam em sua maioria o corante HELBO® (constituição semelhante ao AT) (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009b; NOVAES et al., 2012; ARWEILER et al., 2014; CHITSAZI et al., 2014; MOREIRA et al., 2014), sem a obtenção de resultados conclusivos. Os trabalhos de De Oliveira et al., (2007) E De Oliveira et al., (2009b) não obtiveram diferenças clínicas e nem nos mediadores inflamatórios. A pesquisa de Jacob et al. (2016) não mostraram resultados clínicos e de redução de Aa favoráveis. Já os outros trabalhos mostraram resultados positivos da aPDT na redução bacteriana (NOVAES et al., 2012; MOREIRA et al., 2014), principalmente do *A.a.*, ou de sangramento à sondagem *(*CHITSAZI et al. 2014). Somente o trabalho de Moreira et al. (2014), mostrou redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção até 90 dias pós-terapia com redução bacteriana significante.

A literatura também relata trabalhos escassos sobre o uso da aPDT no tratamento de pacientes com algum tipo de periodontite e que apresentam algum comprometimento sistêmico.

A infecção crônica por bactérias gram-negativas pode ser considerada um potencial foco de infecção que agrava metabolismo de pacientes diabéticos. Assim, o biofilme subgengival presente no periodonto merece uma atenção especial. Além dos métodos de tratamento não-cirúrgico e cirúrgicos convencionais para a doença periodontal mecânica, outras possibilidades terapêuticas anti-infecciosos adjuvantes estão disponíveis (O'CONNELL et al., 2008). A associação de antibióticos sistêmicos pode resultar em melhora adicional nos parâmetros clínicos periodontais, bem como no controle glicêmico. Além disso, os terapias locais não-traumáticas adicionais de desinfecção podem ser de interesse devido ao aumento do risco de infecções em diabéticos não-controlados (TAYLOR; BORGNAKKE, 2008).

Al-Zahrani et al. (2009) analisaram 45 pacientes com diabetes tipo 2 e com periodontite crônica que foram selecionados e distribuídos aleatoriamente para uma das seguintes três modalidades de tratamento (15 indivíduos cada): RAR radicular somente, RAR mais doxiciclina sistêmica, e RAR mais aPDT. Os níveis de placa e sangramento, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e hemoglobina glicosilada (HbA1c) registrados no início e 3 meses após o tratamento periodontal. Diferenças estatisticamente significantes na média da profundidade de sondagem,

nível de inserção clínica, nível de placa e sangramento à sondagem foi encontrada entre baseline e 12 semanas pós-tratamento para todos os grupos. Não houveram diferenças significativas nos parâmetros periodontais e os níveis de glicose detectados entre os três grupos. Redução do nível de HbA1c média foi observada após o tratamento em todos os grupos, mas foi significativa apenas para o grupo de RAR mais doxiciclina. Os resultados do estudo não indicaram que aPDT traga um benefício periodontal na terapia em pacientes com Diabetes.

Macedo et al. (2014) também analisaram o potencial de melhora da aPDT sobre os efeitos clínicos e metabólicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em conjunto com o tratamento periodontal não-cirúrgico e doxiciclina. Trinta pacientes com diabetes tipo 2 e diagnóstico de periodontite crônica foram tratados com RAR ou RAR e aPDT. Ambos os grupos de pacientes tomaram doxiciclina (100 mg / dia) por 2 semanas e índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, supuração, nível de inserção clínica, e os níveis de HbA1c foram medidos no início e 3 meses após a terapia. Uma melhoria nos parâmetros clínicos, foram observadas entre os grupos, mas sem significância estatística. A análise entre grupos mostrou uma redução significativa de HbA1c no grupo RAR + aPDT. As diferenças entre baseline de HbA1c foram maiores e 3 meses para o RAR + aPDT (11,4%) do que RAR (10%). A aplicação única da aPDT como um complemento ao tratamento periodontal não mostraram benefícios adicionais nos parâmetros clínicos, mas resultou numa ligeira diminuição da HbA1c. Os autores mostram que, no entanto, é importante ressaltar que o diabetes mal controlado pode promover alterações vasculares e outras alterações metabólicas que podem estar envolvidos na remissão dos sintomas, como sangramento gengival. Assim, é difícil comparar pacientes diabéticos com pacientes saudáveis e o efeito da aPDT na redução de sangramento gengival precisa ser melhor investigado (MACEDO et al., 2004).

É possível também encontrar trabalhos utilizando a aPDT no tratamento de pacientes imunossuprimidos. Normalmente, a periodontite associada ao HIV é tratada com a tradicional RAR planejamento associado a antimicrobianos (GIOVANI et al., 2007). Entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos pode levar à resistência antimicrobiana e, consequentemente, o desenvolvimento de infecções oportunistas, como a candidíase, e efeitos sistêmicos, como hipersensibilidade e reações gastrointestinais, que limitam o uso clínico (TAKASAKI et al., 2010). Devido a estes

efeitos adversos, pesquisadores estão à procura de uma terapia adjuvante que pode fornecer os mesmos efeitos benéficos à terapia antimicrobiana, sem efeitos adversos (NORO-FILHO et al., 2012).

Noro-Filho et al., (2012) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da aPDT no tratamento não-cirúrgico da periodontite em pacientes com HIV. Doze pacientes foram distribuídos em grupos de raspagem com ultrassom e de RAR e aPDT (laser diodo 660 nm e 0,03 W de energia) associados com azul de metileno a 0,01% e tempo de aplicação de 133 segundos. Todas as medidas clínicas e parâmetros microbiológicos foram avaliados no início e aos 45 dias, 3 e 6 meses após a terapia. Não houveram diferenças em qualquer um dos parâmetros investigados entre os dois grupos. Além disso, participantes do grupo RAR com aPDT apresentaram um aumento no nível de inserção clínica e redução da profundidade de sondagem do que aqueles no grupos de 45 dias e 3 e 6 meses. Microbiologicamente ambas terapias apresentaram uma redução na detecção de P.g, T.f, e *A.a*, e não houve diferença entre eles, sendo que aPDT usado como tratamento adjuvante a RAR pode promover benefícios adicionais no tratamento de periodontite associada ao HIV.

2.3.3 Revisões sistemáticas de aPDT

Recentemente, a literatura apresenta poucas revisões sistemáticas ponderando os efeitos da aPDT como adjuvante à RAR, sendo os resultados divergentes e pouco conclusivos. Esse baixo número está relacionado, principalmente com a diferença entre os trabalhos clínicos. Assim pode-se notar que as sistemáticas mostram comparações entre mesmos ensaios clínicos, o que comprova a heterogeneidade de trabalhos na literatura e dificulta a comparação entre poucos estudos.

A revisão sistemática mais antiga sobre o uso da aPDT em periodontia foi de Atieh (2010). Neste trabalho, o autor incluiu apenas 4 artigos. Encontrou ganhos de nível clínico de inserção de 0,29 mm e redução na profundidade de sondagem de 0,11mm. O uso da aPDT foi satisfatório porém ressaltou a importância de mais estudos sobre a terapia.

No mesmo ano, Azarpazhooh et al. (2010), publicaram uma revisão contendo 5 trabalhos, sem distinção de qual tipo da doença periodontal entre os estudos. Os resultados são bem semelhantes da revisão sistemática produzida anteriormente, com pouquíssimo ganho de inserção clínica (0,34mm), e redução na profundidade de sondagem (0,25mm). Esses resultados os levaram a conclusão que a aPDT não possuir maior efetividade que a RAR.

Com semelhante metodologia e com avaliação de 7 artigos, Sgolastra et al. (2013a) encontraram resultados clínicos irrisórios, apontando a ausência de evidências científicas e mais realização de estudos para avaliação da aPDT como adjuvante à RAR. No mesmo ano, Sgolastra et al. (2013b), publicaram uma nova revisão com 14 artigos, porém sem resultados animadores. Com isso, os autores concluem que a aPDT pode ser efetiva a curto prazo, já que as evidências não mostram diferenças após os 6 meses, recomendando mais estudos clínicos com acompanhamento a longo prazo.

Em uma recente revisão sistemática (VOHRA et al., 2015) sobre a utilização da aPDT no tratamento de periodontite agressiva, os autores concluíram que essa modalidade terapêutica pode ser efetiva como adjuvante a RAR, entretanto, mais estudos clínicos randomizados devem ser realizados.

Na sistemática de Chatzopoulos e Doufexi (2016) também sobre aPDT e periodontite agressiva, os autores investigaram 5 ensaios clínicos. E concluíram que a aPDT associada à terapia periodontal não-cirúrgica apresenta resultados benéficos adicionais desde que seja feita repetidas aplicações.

A revisão mais atual encontrada na literatura (SOUZA et al., 2016) revela que a associação entre aPDT e raspagem não gera nenhum benefício adicional ao tratamento não cirúrgica da periodontite agressiva; mesmo quando compara-se com RAR ou antibióticos sistêmicos.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse trabalho é comparar a eficácia dos corantes azul de metileno e de toluidina em terapia fotodinâmica antimicrobiana na redução ou eliminação de *A.a in vitro.*

Os objetivos específicos são:

- Avaliar o efeito dos corantes em diferentes concentrações sozinhos ou associados à luz para aPDT
- Comparar diferentes parâmetros do laser para terapia fotodinâmica antimicrobiana (potência)
- Comparar os efeitos do LED com o laser associados aos dois corantes na terapia fotodinâmica antimicrobiana

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Amostras biológicas utilizadas

Para o presente estudo foi utilizado a cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523 adquirida pelo Centro Integrado de Pesquisa (CIP) da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), gentilmente cedidas pelo prof. Vanessa Soares Lara do departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

4.1.2 Materiais de consumo

1. Água destilada;
2. Meio de cultura Tryptic Soy Broth (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) acrescido de 0,6% de Extrato de Levedura (Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, USA)
3. Ponteiras descartáveis para micropipeta
4. Microtubos para centrífuga
5. Solução – tampão PBS
6. Sal azul de metileno (Sigma-Aldrich - Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo, Brasil) (Fig.2)
7. Sal azul de toluidina O (Sigma-Aldrich - Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo, Brasil) (Fig.3)
8. Placa de cultura de células marca Nest ® com 96 cavidades de fundo chato estéril produzidas por Nest Biotech Co., Ltd.
9. Placa de Petri descartável, de 90x15 mm, marca Cralplast.

4.1.3 Instrumentos

1. Micropipeta 100 µl
2. Béquer graduado
3. Alça de Drigalsky para semeadura de microorganismos
4. Frasco Alemão

4.1.4 Equipamentos

1. Autoclave vertical fabricada por Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara-SP, modelo: AV- SD75 n º de série: 8-81;
2. Balança de precisão marca Gehaka, modelo BG 440, São Paulo – Brasil.

3. Estufa de cultura, produzida por Fanem Ltda, São Paulo – SP, modelo: 002 CB;

4. Câmara de fluxo laminar vertical, fabricada por Pachane Equipamentos para laboratório Ltda., Piracicaba-SP, modelo: 400 e n º de série: 14407;

5. Vórtex Mixtron produzido por Leucotron Equipamentos Ltda., Santa Rita do Sapucaí-MG e n º de série: 805/20;

6. Espectrofotômetro Beckman Coulter®/ DU® 730

7. Protótipo de LED vermelho - São Carlos- São Paulo- Brasil- 627 nm

8. Laser de baixa intensidade – 660 nm (Thera Lase®) - São Carlos - São Paulo- Brasil

Figura 2 - Sal azul de metileno *Sigma-Aldrich*

Figura 3 - Sal azul de Toluidina O *Sigma-Aldrich*

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultivo das bactérias

Para reativação das cepas congeladas, primeiramente, foram retirados criotubos do freezer -80°C, deixando em temperatura ambiente para o descongelamento. Posteriormente, 100 µl da suspensão bacteriana foram removidos e colocados em placas de ágar TSB (Tryplic Soy Broth) acrescido com 0,6% de extrato de levedura. Essas placas foram colocadas em microaerofilia para o crescimento bacteriano que poderá ocorrer entre 24 e 72 horas e assim que houver o crescimento a cultura foi repicada novamente para um tubo contendo caldo TSB e incubada por mais 48 horas. A partir dessa suspensão bacteriana foi realizada a padronização do inóculo com o auxílio da escala de MacFarland e ajustadas em espectrofotômetro (DU 730, Beckman Coulter, Germany) com comprimento de onda de 540 nm. Nessa metodologia a turbidez do inóculo foi comparada com o padrão 0,5 da escala de MacFarland. Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10 o que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 1990; NCCLS, 2002). Com o resultado da leitura da escala 0,5 de MacFarland e da suspensão bacteriana, quantificamos o crescimento dos microorganismos através de uma simples regra de três:

Absorbância da escala de 0,5 de MacFarland ---------- $1,5 \times 10^8$ UFC/ml
Absorbância da suspensão bacteriana ---------- X

Com esse valor de X temos a quantidade de bactérias por mililitro e por seguinte esse valor foi aplicado em outra fórmula com o objetivo de obter a quantidade da suspensão em cada poço da placa de 96 poços.

$$\text{Concentração}_{\text{inicial}} \text{ X Volume}_{\text{inicial}} = \text{Concentração}_{\text{final}} \text{ X Volume}_{\text{final}}$$

Dessa maneira determina-se em qual volume eu tenho a concentração de bactérias desejada, que foi padronizada em 1×10^6 UFC/mL.

Em cada poço da placa utilizado, foi colocado 100ul do corante testado, o volume da suspensão bacteriana determinado pela espectrofotometria e completou-se o volume para 200ul com caldo TSB.

4.2.2 Teste I: Efeito bactericida do azul de metileno e de toluidina sozinhos e em diferentes concentrações

Foram testadas várias concentrações dos corantes, a fim de analisar a partir de qual houve morte bacteriana. Os grupos foram organizados da seguinte maneira:

- **M 0,05:** Azul de Metileno – 0,05 mg/ml
- **M 0,1:** Azul de Metileno – 0,1mg/ml
- **M 0,5**: Azul de Metileno 0,5 mg/ml
- **M 1**: Azul de Metileno 1,0 mg/ml
- **M 2**: Azul de Metileno 2,0 mg/ml
- **M 5**: Azul de Metileno 5,0 mg/ml
- **M 10**: Azul de Toluidina 10 mg/ml
- **T 0,05:** Azul de Toluidina – 0,05mg/ml
- **T 0,1:** Azul de Toluidina – 0,1mg/ml
- **T 0,5**: Azul de Toluidina 0,5 mg/ml
- **T 1**: Azul de Toluidina 1,0 mg/ml
- **T 2**: Azul de Toluidina 2,0 mg/ml
- **T 5**: Azul de Toluidina 5,0 mg/ml
- **T 10**: Azul de Toluidina 10 mg/ml

4.2.3 Teste II: Procedimento de terapia fotodinâmica

As etapas desse teste foram bem semelhantes ao procedimento anterior. O preparo dos materiais microbiológicos, diluição do corante e distribuição das bactérias nos poços foram exatamente o mesmo. No entanto, em cada poço da placa depois de ter a suspensão bacteriana com o TSB foi acrescido dos corantes (azul de metileno e azul de toluidina) e aplicada a terapia fotodinâmica nos grupos testes.

As concentrações utilizadas nesse trabalho foram de 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml e 10 mg/ml. Ambos os corantes foram preparados na concentração de 20 mg/ml. Na hora do experimento foram feitas diluições para que se chegasse nas concentrações desejadas.

Para cada grupo, o experimento foi feito em sextuplicata.

O laser utilizado nesse experimento foi o laser diodo de baixa intensidade – 660 nm, InGaAIP (Thera Lase®, São Carlos, Brasil) e o LED foi um protótipo produzido no Instituto de Física de São Carlos – USP.

Os parâmetros de irradiação estão descritos no quadro 4:

Quadro 4- Parâmetros de laser e LED

Tipo de luz	**Comprimento de onda**	**Potência**	**Densidade de energia**	**Tempo**	**Densidade de potência**	**Área**	**Dose de irradiação**
Laser	660 nm	70 e 100 mW	45 J/cm^2	12 e 18s	2,91 e 4,16 W/cm^2	0,024 cm^2	1,08 J
LED	627 ± 10 nm	10, 5 mW	20 J/cm^2 (MONGARDINI; DI TANNA; PILLONI, 2014)	143 s	150 mW/cm^2	0,07 cm^2	1,4 J

A distância entre os poços irradiados foi de 3 poços para cada direção para que não ocorresse interferências entres os grupos (Figuras 4 e 5).

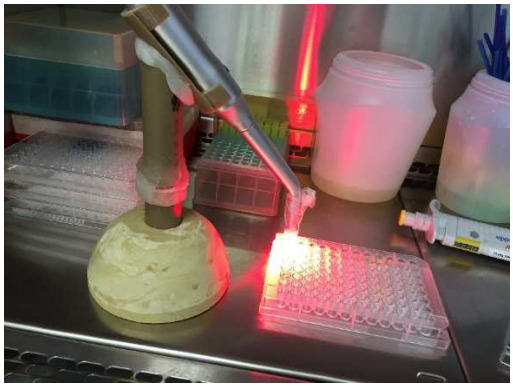


Figura 4 - Aplicação do LED

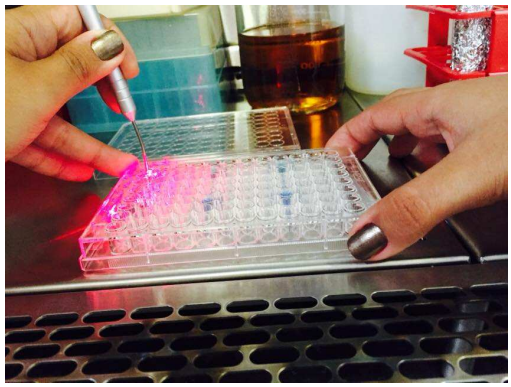


Figura 5 - Aplicação do Laser

Os grupos experimentais foram distribuídos de acordo com a figuras 6 e 7 (Fluxogramas).

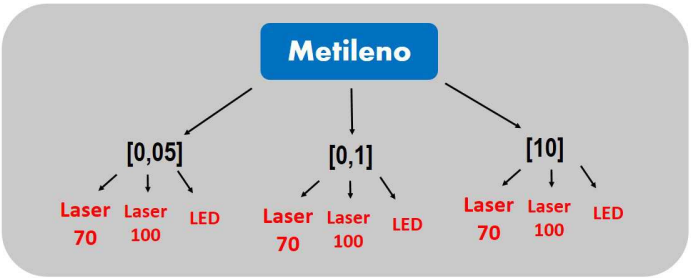


Figura 6 - Fluxograma da divisão dos grupos experimentais (Metileno)

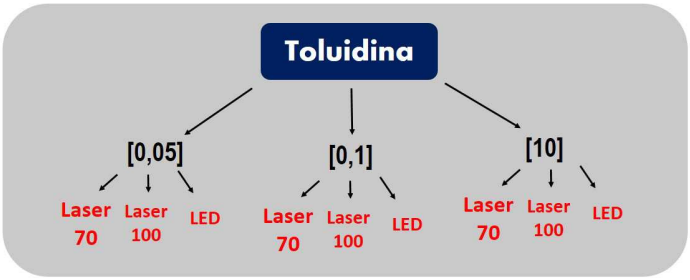


Figura 7- Fluxograma da divisão dos grupos experimentais (Toluidina)

Portanto, foram 29 grupos experimentais descritos abaixo:

- **C-**: Controle negativo (Gentamicina)
- **C+**: Controle positivo (Bactéria em seu meio de cultura ideal para crescimento)
- **M 0,05**: Azul de Metileno 0,05 mg/ml
- **M 0,1**: Corante Azul de Metileno 0,1 mg/ml
- **M 10** : Azul de Metileno 10 mg/ml
- **T 0,05**: Azul de Toluidina 0,05 mg/ml
- **T 0,1**: Azul de Toluidina 0,1 mg/ml
- **T 10**: Azul de Toluidina 10 mg/ml
- **L1**: Bactéria e laser 70mW
- **M 0,05 L_1**: Azul de Metileno 0,05 mg/ml + Laser 70 mW
- **M 0,1 L_1**: Corante Azul de Metileno 0,1 mg/ml + Laser 70 mW
- **M 10 L_1**: Corante Azul de Metileno 10 mg/ml + Laser 70 mW
- **T 0,05 L_1**: Corante Azul de Toluidina 0,05 mg/ml + Laser 70 mW
- **T 0,1 L_1**: Corante Azul de Toluidina 0,1 mg/ml + Laser 70 mW
- **T 10 L_1**: Corante Azul de Toluidina 10 mg/ml + Laser 70 mW
- **L2**: Bactéria e laser 100mW
- **M 0,05 L_2**: Corante Azul de Metileno 0,05 mg/ml + Laser 100 mW
- **M 0,1 L_2**: Corante Azul de Metileno 0,1 mg/ml + Laser 100 mW
- **M 10 L_2**: Corante Azul de Metileno 10 mg/ml + Laser 100 mW
- **T 0,05 L_2**: Corante Azul de Toluidina 0,05 mg/ml + Laser 100 mW
- **T 0,1 L_2**: Corante Azul de Toluidina 0,1 mg/ml + Laser 100 mW
- **T 10 L_2**: Corante Azul de Toluidina 10 mg/ml + Laser 100 mW
- **Led**: Bactéria e LED
- **M 0,05 L_E**: Corante Azul de Metileno 0,05 mg/ml + LED
- **M 0,1 L_E**: Corante Azul de Metileno 0,1 mg/ml + LED
- **M 10 L_E**: Corante Azul de Metileno 10 mg/ml + LED
- **T 0,05 L_E**: Corante Azul de Toluidina 0,05 mg/ml + LED
- **T 0,1 L_E**: Corante Azul de Toluidina 0,1 mg/ml + LED
- **T 10 L_E**: Corante Azul de Toluidina 10 mg/ml + LED

Após esta etapa e 24 horas depois, foram realizadas para cada grupo uma diluição seriada nas concentrações de 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 e 10^6, sendo que somente as diluições de 10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 foram semeadas. Cada placa de petri foi dividida em 4 quadrantes, cada um representando uma diluição (Figura 5). Assim, pipetou-se 25 µl de cada poço selecionado e com auxílio da alça de Drigalsky foi espalhado pela placa. Depois de 24 horas foram feitas as leituras das unidades formadoras de colônias de cada placa se baseando em apenas no quadrante que obtivesse um crescimento entre 8 e 80 colônias ou mais.

Figura 8 - Placa de Petri dividida em quadrante

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após verificação da normalidade da amostra, os dados foram analisados pelo teste ANOVA complementado por Tukey ($p<0,05$) em ambos os experimentos.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos corantes azul de metileno e toluidina em diversas concentrações

Nesse experimento, testou-se o efeito bactericida de ambos os corantes em diferentes concentrações, porém na ausência de qualquer tipo de luz. Os resultados estão descritos nos gráficos abaixo.

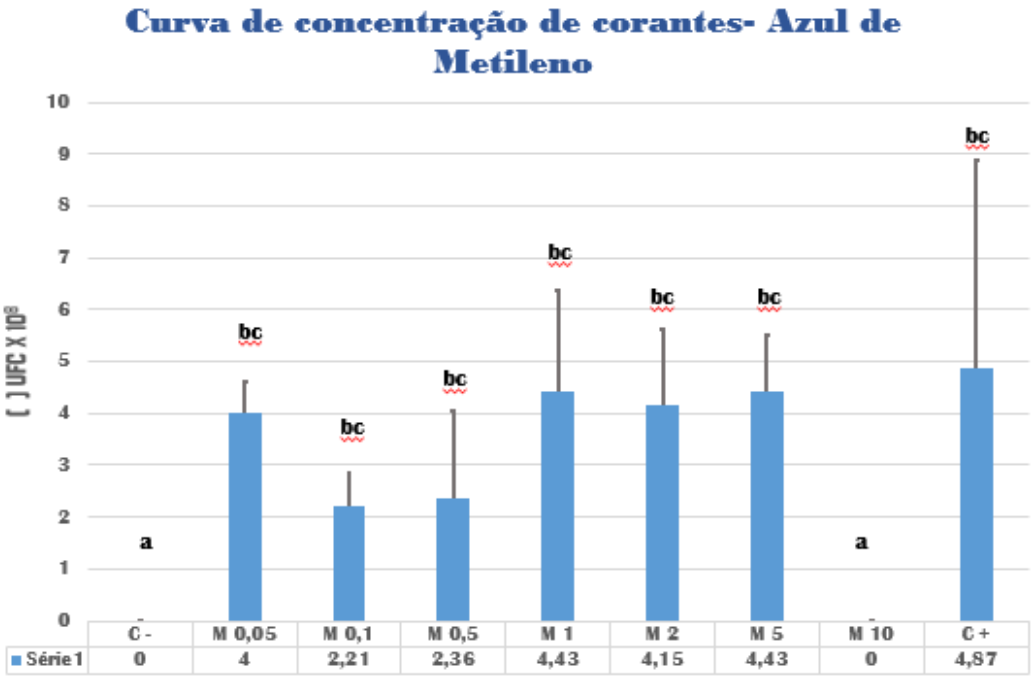


Figura 9 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após tratamento com azul de metileno em diferentes concentrações. Letras diferentes = $p<0,05$.

A figura 9 revela que a única concentração de corante com efeito bactericida semelhante ao controle negativo (C-) (valor zero - $p>0,05$) foi a de 10mg/ml (M10). Os outros grupos não apresentaram diferença entre si e nem em relação ao controle positivo (C+) ($p>0,05$).

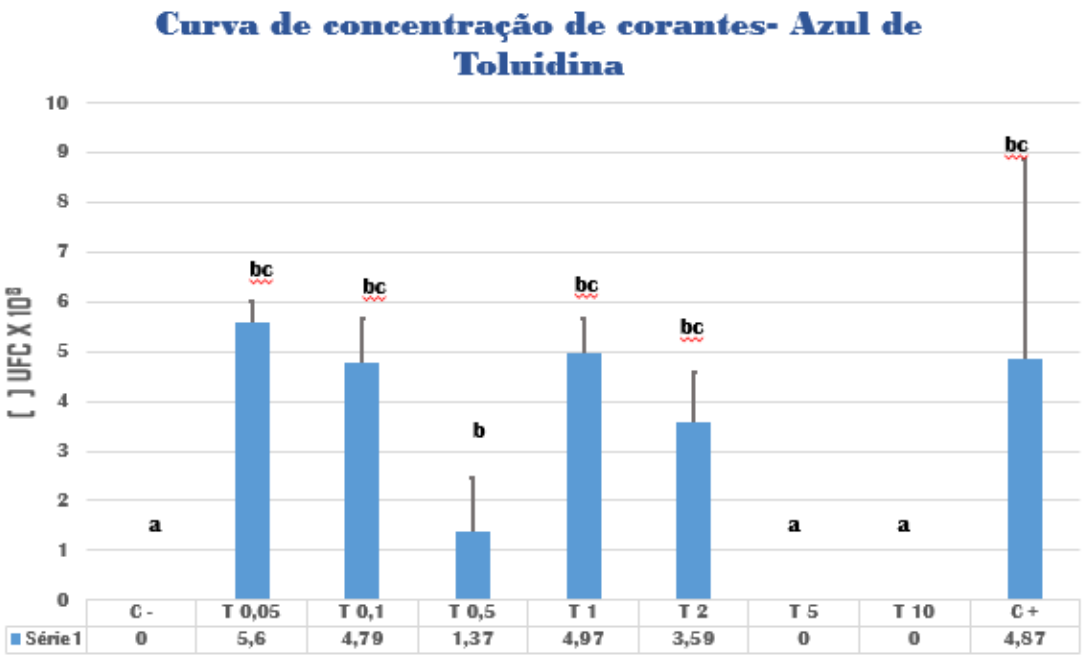


Figura 10 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após tratamento com azul de toluidina em diferentes concentrações. Letras diferentes = $p<0,05$.

Na figura 10, os grupos com concentração de 5 (T5) e 10 mg/ml (T10) de azul de toluidina foram bactericidas e semelhantes ao controle negativo (C-) (valor zero – $p<0,05$). As outras concentrações foram semelhantes entre si e ao controle positivo (C+) ($p>0,05$).

5.2 Avaliação dos corantes azul de metileno e toluidina por terapia fotodinâmica antimicrobiana em *A.a*

Os resultados da aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre a espécie de *A.a.* nas diferentes dosimetrias e concentrações dos respectivos corantes azul de metileno e azul de toluidina estão descritos, respectivamente, nas figuras 11 e 13. Por questões didáticas, os gráficos foram separados por corante, para facilitar a visualização.

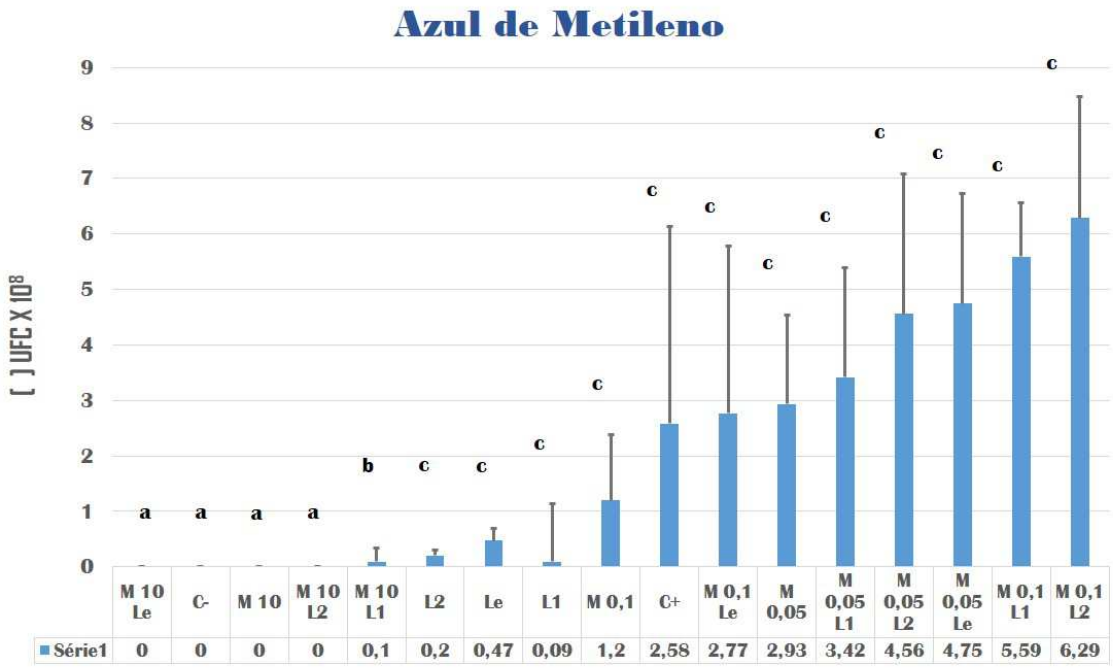


Figura 11 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após terapia fotodinâmica com o corante azul de metileno. Letras diferentes = p<0,05.

A figura 11 mostra que os grupos metileno 10mg/ml sozinho (M10), metileno 10mg/ml com LED (M10 Le) e metileno 10mg/ml com laser vermelho 100mW (M10 L2) tiveram efeito bactericida tal qual o controle negativo (valor zero - p>0,05) e com diferença estatisticamente significante do controle positivo (p<0,05). Já o grupo metileno 10mg/ml com laser vermelho 70mW (M10L1) mostrou redução nas UFCs de forma estatisticamente significante em relação ao controle positivo (C+) (p<0,05) porém, não mostrou efeito totalmente bactericida, sendo maior que o controle negativo (C-) (valor 0,1 - P<0,05). Todos os outros grupos foram semelhantes ao controle positivo (p>0,05).

A figura 12 mostra as placas de Petri com colônias de bactérias de grupos com ação do corante metileno de 10 mg/ml após 24 horas do experimento.

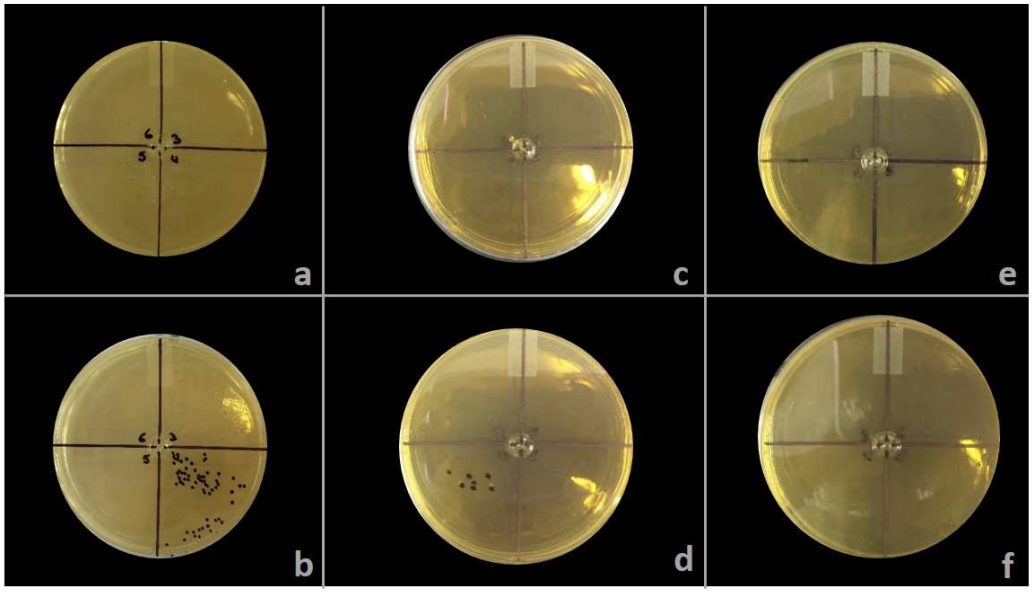


Figura 12 – Placas de Petri com cultura de bactérias após 24 horas (Azul de metileno): **a)** Controle negativo (C-), **b)** Controle positivo (C+), **c)** Grupo M10, **d)** M10L1, **e)** M10L100, **f)** M10Le.

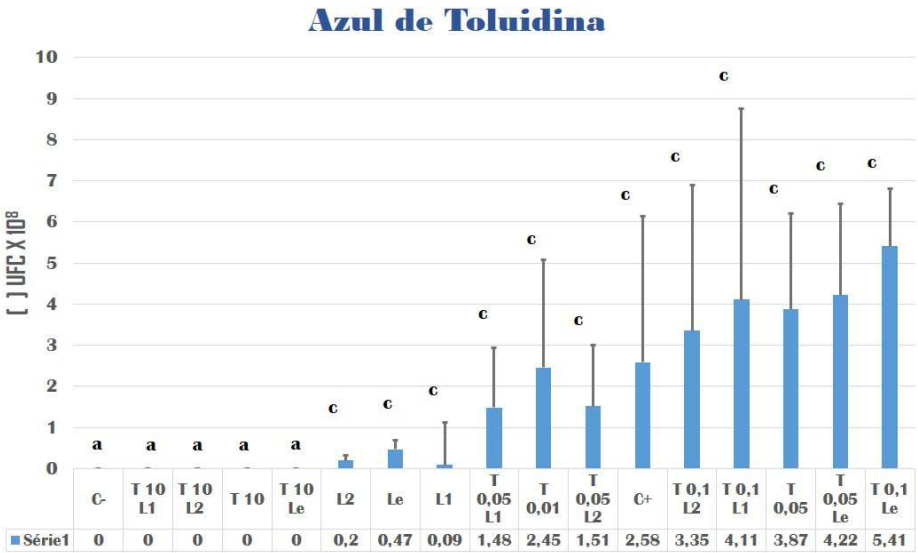


Figura 13 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após terapia fotodinâmica com o corante azul de toluidina. Letras diferentes = p<0,05.

Na figura 13, é possível observar que os quatro grupos onde se utilizou azul de toluidina 10mg/ml – sozinho (T10), com LED (T10Le), com laser 70 (T10L1) e 100mW (T10L2) - tiveram um efeito bactericida semelhante ao controle negativo (C-) (valor zero – p>0,05) e foram estatisticamente diferentes do controle positivo (C+) (p<0,05). Todos os outros grupos foram semelhantes ao controle positivo (P>0,05).

A figura 14 mostra as placas de Petri com colônias de bactérias de grupos com ação do corante toluidina de 10 mg/ml após 24 horas do experimento.

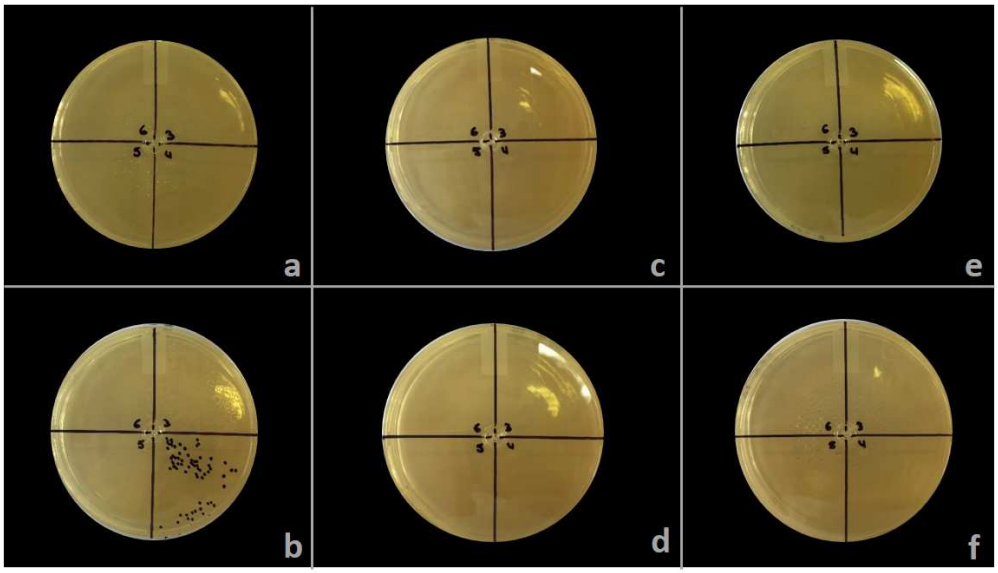


Figura 14 – Placas de Petri com cultura de bactérias após 24 horas (Azul de toluidina): **a)** Controle negativo (C-), **b)** Controle positivo (C+), **c)** Grupo M10, **d)** M10L1, **e)** M10L100, **f)** M10Le.

Imagens ilustrativas foram realizadas com o objetivo de mostrar alguns grupos de *A.a* com corante sozinho ou aPDT após 24 horas (APÊNDICE A).

Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* se propôs a comparar os corantes azul de metileno e azul de toluidina, na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) para eliminação do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a)* em suspensão. Foram testadas distintas concentrações de ambos fotossensilizadores e diferentes fontes de luz: LED e laser, sendo que para o último foram analisados dois parâmetros de potência (70 e 100 mW). Os principais achados foram que os corantes em alta concentração (10mg/ml) tiveram efeito bactericida independentemente da presença ou ausência da luz.

A literatura é bastante controversa e complexa quanto aos corantes e concentrações utilizadas, além do tipo de fonte de luz e seus parâmetros. O uso da aPDT em Periodontia está se tornando cada vez mais comum e com isso encontramos vários trabalhos clínicos sobre esse tratamento. Apesar dos vários estudos clínicos, as controvérsias existentes na literatura e citadas no início do parágrafo, ainda abrem espaço para estudos *in vitro* para solucionar algumas dúvidas.

A metodologia do presente estudo procurou utilizar parâmetros de luz e concentrações de corante mais comumente vistos na literatura. Dessa forma, as três concentrações do azul de toluidina e azul de metileno utilizadas foram 0,05 mg/ml (BERAKDAR et al., 2012; BALATA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2010) ,0,1 mg/ml (AL-ZAHRANI et al., 2009; GE et al., 2011; NORO FILHO et al., 2012; THEODORO et al., 2012; BASSIR et al., 2013; FRANCO et al., 2014; MONGARDINI; DI TANNA; PILLONI, 2014) e 10 mg/ml (DE OLIVEIRA et al., 2007; CHRISTOULIDES et al., 2008; CHONDROS et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2009; LULIC et al., 2009; POLANSKY et al., 2009; SIGUSCH et al., 2010; CAPPUYNS et al., 2012; GIANNOPOULOU et al., 2012; NOVAES et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; LUCHESI et al., 2013; SOUZA et al., 2013; ARWEILER et al., 2014; BETSY et al., 2014; KOLBE et al., 2014; MACEDO et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; PETELIN et al., 2014; QUEIROZ et al., 2014; ALWAELI; KHATEEB; AL-SADI, 2015; QUEIROZ et al., 2015). Apesar dos resultados do teste de concentração dos corantes, onde a concentração de 10mg/ml foi a única efetiva para

o metileno e a de 5 e 10mg/ml foram as bactericidas para o toluidina, optamos por testar novamente as três concentrações mais comum na literatura acima citada.

A potência do laser foi baseada em um trabalho da equipe da Periodontia da FOB/USP, onde utilizou-se a potência de 100 mW para descontaminação de implantes (SALMERON, 2011). Outros estudos também aplicam essa potência (BRAUN et al., 2008; RÜHLING et al., 2010; GIANNELLI et al., 2012; GIANNOPOULOU et al., 2012; BALATA et al., 2013; DILSIZ; CANAKCI; AYDIN, 2013; ALWAELI; KHATEEB; AL-SADI, 2015). Porém ,outro valor de potência frequentemente encontrado é entre 60 mW e 75 mW (DE OLIVEIRA et al., 2007; CHRISTOULIDES et al., 2008; CHONDROS et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2009; LULIC et al., 2009; POLANSKY et al., 2009; SIGUSCH et al., 2010; ANDRADE et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; LUCHESI et al., 2013; SOUZA et al., 2013; BETSY et al., 2014; CHITSAZI et al., 2014; FRANCO et al., 2014; KOLBE et al., 2014; MACEDO et al., 2014; PETELIN et al., 2014; QUEIROZ et al., 2014; QUEIROZ et al., 2015). Por isso optou-se por testar dois valores de potência: 70 e 100 mW.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, para um eficaz tratamento, depende de diversas variáveis. É preciso que tenha uma molécula capaz de absorver luz e transferir essa energia para outras moléculas, bem como é necessário que se tenha o oxigênio. A fonte de luz que fornecerá energia para desencadear uma reação química em um local exato ou próximo que receberá espécies reativas de oxigênio causando danos irreversíveis. A ausência de qualquer um desses, inviabiliza todo o processo (NUNEZ, RIBEIRO, GARCEZ, 2013).

A dose de irradiação é bastante variável. No nosso trabalho, esse fator apresentou resultados muito parecidos para todos os tipos de luz testados. Para o laser utilizou-se 1,08 J para ambos parâmetros de laser e para o LED, 1,4 J. Trindade et al. (2015) citam que estudos usam valores de 1,2 a 159 J. O mais importante é que a energia entregue seja absorvida pelo fotossensibilizador (FS), não sendo necessário que ela esteja no pico da absorção do fármaco, mas deve ser absorvida de modo eficaz. A fonte de luz deve ter uma banda espectral que coincida com a banda de absorção do fármaco (TRINDADE et al., 2015). Nesse caso, o LED, por emitir uma faixa de radiação no espectro da luz (± 10nm), teria mais chance de atingir o pico de absorção do FS.

A literatura relata que tanto o laser de alta potência quanto de baixa potência são eficazes em matar bactérias orais patogênicas. No entanto, a luz de baixa potência apresenta poucos danos ao operador, além de ter um efeito bactericida que não danifica tecidos do hospedeiro, e apresenta poucos danos ao operador (WILSON, 1994; CHAN e LAI, 2003; FRANSSON, LARSSON, WOLF, 2013). Neste estudo, as potências utilizadas do laser (70 mW e 100 mW) foram bem maiores do que a do LED (10,5 mW) e os resultados entre esses grupos não mostraram diferenças, o que mostra que a potência não interferiu nos efeitos obtidos.

Alguns grupos do deste estudo tiveram o LED como como fonte de luz. Pode-se observar que para ambos os corantes, não houve diferença entre os grupos LED e laser.

Ao comparar o LED com o laser, pode-se observar uma alta disparidade dos valores da densidade de potência (2,91 e 4,16 W/cm^2 para o laser e 150 mW/cm2 para o LED). Para Kim et al. (2013) quanto maior o valor da densidade de potência, mais satisfatórios são os resultados. Em seu trabalho, os efeitos bactericidas foram melhores com a potência de 6 mW / cm^2 do que para uma menor de 3 mW /cm^2). Lavi et al. (2004) ainda relatam que o motivo para tal condição pode ser a elevada concentração de espécies reativas de oxigênio, induzidas pela luz, que são letais para a célula. E ainda cita que níveis baixos podem estimular o crescimento celular. No entanto, no presente estudo, mesmo com uma grande variação de valores entre os grupos, pode-se observar que os resultados para LED e laser não foram estatisticamente diferentes.

Atualmente, fontes de luz não-laser, como diodos emissores de luz (LED), têm sido utilizadas. Estes dispositivos são mais compactos e portáteis, e consideravelmente menos caros em comparação com lasers (MEISEL, KOCHER, 2005; TAKASAKI et al. 2009). Outra vantagem do LED é que a sua irradiação é menos prejudicial para os olhos do operador e do paciente em relação à irradiação do laser, além de se tornar possível tempos de irradiação mais longos (MEISEL e KOCHER, 2005; ISHIKAWA et al. 2011).

Mas alguns autores citam que esse longo tempo para ativação do FS também pode ser considerado uma desvantagem desse tipo de luz. No nosso estudo o

tempo de aplicação do laser em ambas as potências (12 e 18 segundos) foram bem curtos quando comparados ao LED (2 minutos e 23 segundos).

Esse longo tempo de exposição do LED já foi relatado na literatura. Teixeira et al. (2012) relataram diminuições significativas de *S. m*, mas só depois de 15 min de irradiação usando um LED vermelho (55 J/ cm^2) na presença de azul de toluidina em 100 µg/ml. Dovigo et al. (2011) ainda relatam um tempo muito maior (30 min) para inativar espécies de *Candida* usando a curcumina com LED (455 nm).

O recente trabalho de Paschoal et al. (2015) comparou a aPDT em cepas de *Streptococcus mutans.* Aplicou-se o LED vermelho (570–690 nm; 1,460 mW/cm^2; 1,650 mW) no azul de toluidina e o azul (400–440 nm; 95,5 mW/cm^2; 105 mW) em curcumina. Para cada corante utilizou-se 3 tempos: laser azul em 252 (12 J), 505 (24 J) e 757 (36 J) s; e laser vermelho em 12 (9 J), 24 (17,7 J), 36 (26,5 J). Todos os grupos apresentaram excelentes resultados bactericidas e sem diferenças estatísticas entre eles. Logo, é possível diminuir a exposição do LED de minutos para segundos sem que haja interferência na eficácia da terapia.

Alguns trabalhos na literatura mostram que somente o efeito da luz não tem um papel terapêutico, pois a reação fotoquímica não é desencadeada (EICK et al., 2013). Fato confirmado em nossa pesquisa onde foi revelado que somente a luz, sem corante, não apresentou efeito bactericida tanto para o laser, quanto para o LED.

Na literatura não há muito trabalhos *in vitro* do efeito bactericida da aPDT sobre o *A.a*. Os poucos estudos encontrados apresentam muitas disparidades entre si, desde o tipo de luz e seus parâmetros, quanto aos corantes e suas concentrações (CHAN, LAI, 2003; PFITZNER et al., 2004; PRATES et al., 2007; GOULART et al., 2010; GOULART et al., 2010; MATTIELLO et al., 2011; CHO et al., 2015). Contudo, a mesma dificuldade de comparações entre ensaios clínicos, é também citada para pesquisas *in vitro*.

No presente estudo, a concentração de 10mg/ml foi a que obteve melhores resultados tanto para o azul de metileno quanto para o de toluidina. Esse valor apresentou excelente efeito bactericida na presença de luz (ambas potências de laser e LED), quanto na ausência. Além do mais, é uma concentração de corante

bastante utilizada em estudos clínicos (DE OLIVEIRA et al., 2007; CHRISTOULIDES et al., 2008, CHONDROS et al., 2009, DE OLIVEIRA et al., 2009, LULIC et al., 2009, POLANSKY et al., 2009, SIGUSCH et al., 2010, CAPPUYNS et al., 2012, GIANNOPOULOU et al., 2012, NOVAES et al., 2012, ANDRADE et al., 2013, CAMPOS et al., 2013, LUCHESI et al., 2013, SOUZA et al., 2013, ARWEILER et al., 2014, BETSY et al., 2014, KOLBE et al., 2014, MACEDO et al., 2014, MOREIRA et al., 2014, PETELIN et al., 2014, QUEIROZ et al., 2014, ALWAELI, KHATEEB, AL-SADI, 2015, QUEIROZ et al., 2015). Parece que a concentração alta do corante foi fator único para os resultados obtidos, não sendo necessário o uso da luz.

Já Mattiello et al. (2011) apresentam resultados diferentes para essa condição. Além do *A.a*, os autores também utilizaram um cepa *S.s* e observaram que para ambas espécies, o corante não apresentou nenhuma redução estatisticamente significante, indicando que o corante sozinho parece não reduzir a viabilidade bacteriana. Nos grupos com laser (660 nm, 40 mW, 10 J/cm^2) e corante, no entanto, ambas cepas bacterianas foram sensíveis à terapia com uma redução significativa nas contagens de UFC.

No trabalho de Chan e Lai (2003), os resultados revelaram que o *A.a* e outros microrganismos orais tratados com azul de metileno (0,01%) foram mortos pelo laser em um curto tempo de exposição. Três tipos de luz laser foram testadas (Laser He-Ne 632,8 nm e 30 mW, 60s; Laser diodo 665 nm e 100 mW, 60s; Laser diodo 830 nm e 100 mW, 30s). Nesse mesmo trabalho houve um grupo controle em que as mesmas bactérias foram tratadas somente com o corante, não obtendo uma diminuição significante. Assim, pode-se inferir que o efeito bactericida foi produzido por terapia fotodinâmica com melhores resultados para o laser diodo com 665 nm.

Esses resultados foram diferentes do encontrado no presente estudo. O azul de metileno na concentração de 0,01% não obteve bons resultados para a morte bacteriana em aPDT. E os grupos somente com corante nas concentrações de 0,05 mg/ml e 0,1 mg/ml não obtiveram diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos grupos desses corantes associados à luz.

No trabalho de Prates et al. (2007) também pode-se observar que não houve redução do *A.a* somente com o uso do corante. Nesse trabalho, o corante escolhido

foi o verde de malaquita na concentração de 0,01%. O resultados mostraram redução de 99,9% de *A.a* quando houve inclusão de luz (Laser diodo 660 nm,30mW, 9 J/cm^2, 5min).

A pesquisa de EICK et al. (2013) avaliou o efeito da aPDT com luz LED (625-635 nm, 2 W/cm^2) e azul de toluidina (0,01 mg/ml) em bactérias relacionadas à periodontite e peri-implantite. A viabilidade do *A.a* e de outras espécies foi significativamente diminuída e os autores ressaltam que aplicação do fotossensibilizador sozinho por 60 segundos reduziu a viabilidade de microorganismos. Ao comparar a mesma concentração de nosso estudo, diferenças são notadas como o fato de o mesmo corante e a mesma concentração, não ter gerado resultados favoráveis.

Um aspecto analisado em alguns trabalhos é a variação da concentração de corantes para assim avaliar em quais concentrações esses corantes apresentam melhores resultados bactericidas.

Goulart et al. (2010) realizou um estudo bastante relevante, onde comparou efeitos citotóxicos de fototerapia do *A.a* em suspensão planctônica na presença e ausência de luz. Além disso, também foram analisados esses efeitos no *A.a* com crescimento em biofilme. Em todos as análises, foram utilizados o rosa de bengala como corante na concentração de 2 µmol L^{-1} e a fonte de luz foi de um fotopolimerizador de resinas compostas com comprimento de onda de 400- 500 nm. A exposição à luz, na ausência do corante, não afetou a viabilidade de *A.a* em suspensão planctônica. Mas um ponto interessante desse trabalho é que observou-se um efeito dose-dependente da concentração do corante em culturas planctônicas. Concentrações tão baixas quanto 0,01 µmol L^{-1} foram suficientes para causar somente 20% de morte celular, e quando essa concentração foi aumentada para 0,1 µmol L^{-1} causou 50% de morte celular. O mesmo acontece com o *A.a* em biofilme. Este não foi afetado pelo corante rosa de bengala com luz ou sozinho. Com a aPDT, houve uma redução significativa no biofilme, dependente da concentração e tempo de irradiação.

O mesmo grupo de Goulart et al., no mesmo ano, realizaram outra pesquisa sobre aPDT com o objetivo de comparar a eficácia de dois outros corantes: Azul de

metileno e Eritrosina. A metodologia foi bastante semelhante ao outro trabalho, inclusive com a realização dos mesmo testes de citotoxicidade.

Assim como no outro estudo dessa equipe, quando luz e metileno foram associados, ocorreu um efeito de morte dose-dependente da concentração do corante no *A.a* em suspensão planctônica. Concentrações de 0,5 µmol / L causaram apenas 15% de morte celular, considerando que 1 µmol / L causou 25% de morte celular após aPDT. A associação eritrosina e luz obteve comportamento semelhante ao observado para o azul de metileno, no entanto, foi melhor eficiente para matar o microorganismo. Após os tratamentos de aPDT, nenhuma alteração foi observada no biofilme quando metileno 0,5 µmol/ L foi utilizado com 1 min de irradiação (0,65 J / cm^2). No entanto, esta mesma concentração, mas com 3 min de irradiação (2 J / cm^2), obteve melhores resultados. Quando metileno foi usado 1,0 µmol / L com 1 e 3 min de irradiação, proporcionalmente, diminuíram o biofilme. Eritrosina, na concentração de 0,5 µmol / L, com irradiação 1 e 3 min, promoveu uma diminuição de células, mas quando a concentração foi aumentada para 1,0 µmol / L, uma redução maior foi observada, para os mesmos tempos de irradiação previamente utilizados. Isto revela que um tempo maior de exposição, beneficia a terapia. Este fato não foi relatado no presente estudo, pois ambos os tempos 12s, 18s e 2min23s não mostram diferenças relevantes entre eles.

Semelhante ao atual estudo, quanto maior a concentração dos corantes, melhores resultados foram obtidos. No experimento de diferentes concentrações de corante da presente pesquisa, pode-se notar que concentrações mais baixas não tiveram diferenças estatisticamente significantes do controle positivo. Vale destacar que os resultados para a concentração de 10 mg/ml (sem luz) foram semelhantes nos dois experimentos com erradicação total de bactérias. Para o azul de metileno, as concentrações de 0,05; 0,1; 0,5,1,2 e 5 mg/ml, na ausência de luz, foram incapazes de promover efeito bactericida. Já para o azul de toluidina, os resultados foram iguais para o metileno, com exceção, de 5 mg/ml que assim como 10 mg/ml, obteve efeitos ótimos na ausência de luz.

Umeda et al. (2011), em um trabalho com metodologia bastante semelhante a do presente estudo, mostrou sucesso na aPDT com a utilização de LED vermelho (650 nm) com os corantes azul de metileno e azul de toluidina contra *A.a*. Um

aspecto relevante foi que houve a variação de ambos os corantes de 0,2; 0,5; 2, 5, 10 e 20 µg/mL. Outro fator variante foi o tempo de exposição à luz, de 10 e 20 segundos, sendo que o menor tempo mostrou resultados bactericidas efetivos na concentração de 10 µg/ml.

Asnaashari et al. (2015) realizaram uma comparação da atividade antibacteriana entre dois métodos de aPDT. Utilizaram laser diodo (810 nm, 0,2 CW, 32s) e LED (630 nm, 200 mw/cm^2, 30s) contra *Enterococcus faecalis* em dentes humanos extraídos. O corante utilizado foi azul de toluidina na concentração de 0,1 mg/ml. Observou-se que o grupo LED obteve números menores de unidades formadoras de colônia, assim, com melhores resultados quando comparado ao grupo laser. Em no nosso trabalho, essas diferenças não foram encontradas, pois grupos LED e laser não obtiveram diferenças estatisticamente significantes.

Corantes fenotiazínicos são os fotossensibilizadores mais utilizados para aPDT (TAKASAKI et al., 2009). O azul de toluidina é um corante tiazídico com um comprimento de onda de absorção máxima de 632 ± 8 nm. É um corante ácidofílico com uma tendência de ácidos nucleicos, dessa forma cora tecidos ácidos e se adere ao DNA e RNA (WILSON et al., 1993; ZANIN et a., 2006). Neste trabalho, utilizou-se o laser diodo com comprimento de onda de 660 nm e mesmo assim, pode-se observar um satisfatório efeito bactericida do azul de toluidina, que se deveu mais à concentração do corante em si do que a interação laser/fotossensibilizador.

Moslemi et al. (2015) avaliaram o efeito do azul de toluidina (0,01 mg/mL) e LED (625–635 nm, 6 J/cm^2, 30 s) em *A.a*. Além disso, também foi avaliado ação do corante Radachlorin® (0,1%) com luz laser diodo (662 ± 0,1 nm, 6 J/cm^2, 34 s) no mesmo microorganismo. No entanto, a irradiação de LED ou laser sozinho não reduziu o número de bactérias em comparação com o grupo controle. Além disso, o grupo de azul de toluidina (somente) apresentou médias de UFC/ mL semelhantes aos do grupo de controle. Os melhores resultados foram do grupo do laser e Radachlorin® que mostraram uma diminuição significativa na concentração de *A.a*.

O tempo de pré-irradiação em nosso trabalho foi de 1 minuto para ambos os corantes em todos os grupos-teste. O intervalo do tempo de pré-irradiação mais encontrado na literatura é de 1 a 5 minutos. (TRINDADE et al., 2015).

Isto pode contribuir para diferenças na localização celular em que os fotossensibilizadores se ligam, o que demonstra que o mecanismo de inativação de células depende do tempo de pré-irradiação. Pode-se citar que esse aspecto é crucial para uma boa eficácia da terapia, pois a diferença de ação entre corantes pode ocorrer devido a esse tempo; indicando que a presença de barreiras de difusão celular impedem que o fotossensibilizador alcance o local ideal dentro da célula bacteriana (ITO, 1983).

Um aspecto que merece ser destacado é quanto ao número de sessões múltiplas que parecem beneficiar a terapia. Na literatura, o trabalho de Quishida et al. (2015) foi único trabalho *in vitro* sobre sessões múltiplas e coincidentemente esse valor também é baixo quando esse assunto é citado em ensaios clínicos (GIANNELLI et al., 2012; FRANCO et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; MULLER CAMPANILE et al., 2015). Quishida et al. (2015) investigaram a eficácia de sucessivas aplicações de aPDT com o uso de luz LED (660 nm; 37,5 J / cm^2) e o corante Photodithazine® (175 e 200 mg /ml) em um biofilme formado do *Candida albicans, Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*. Nos grupos testados foram feitas 1 ou 3 aplicações consecutivas. Observou-se que quanto maior o número de aplicações, maior a redução do biofilme.

O *A.a* pertence ao grupo de bactérias gram-negativas. Vários estudos demonstram que as bactérias gram-positivas são susceptíveis à inativação fotodinâmica, mas gram-negativas são significativamente mais resistentes a muitos fotossensibilizadores usados para aPDT (SIGUSCH et al., 2005).

Deve-se estar atento à fisiologia das bactérias gram-negativas. A membrana exterior é muito importante para torná-las resistentes a fatores de defesa celular e humoral e desencadear mecanismos de resistência a muitos antibióticos e terapias (MALIK; LADAN; NITZAN, 1991; HAMBLIN; HASSAN, 2004).Em outras palavras, gram-positivas possuem uma camada porosa e espessa de peptidoglicano e uma simples bicamada lipídica, enquanto gram-negativas têm uma bicamada lipídica dupla e a camada de peptidoglicano entre elas, mais uma camada exterior de lipopolissacarídeo, o que resulta num baixo grau de permeabilidade para pequenas moléculas lipofílicas (BOURRE et al., 2010; SHARMA; CHIANG; HAMBLIN, 2011).

Deste modo, para que ocorra sucesso na aPDT, o fotossensibilizador deve possuir características que o permitam penetrar na parede celular e alcancem a membrana plasmática ou citoplasma. No entanto, as barreiras de membrana da célula bacteriana limitam a difusão do FS no citosol (BERTOLONI et al.,1992). Consequentemente, a morte de bactérias gram-positivas é muito mais fácil do que em gram-negativas (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013).

Para Chan e Lai (2003), a capacidade do laser de matar os organismos patogênicos periodontais é dependente da espécie. E ainda citam que *F. nucleatum* e *A. a.* possam ser mais resistentes à morte do que *P. gingivalis* e *P. intermedia*. A causa das diferentes susceptibilidades entre essas espécies ainda não foi esclarecida (CHAN e LAI, 2003).

Todos os testes realizados nessa pesquisa foram feitos em estado planctônico da bactéria, ou seja, o microorganismo estava isolado e não encontrava-se aderido a nenhum tipo de superfície e nem interagindo com outro microorganismo. Clinicamente o *A.a*, principal agente patogênico responsável pelo desenvolvimento da doença periodontal agressiva, cresce em biofilme. Estas estruturas são altamente organizados pela presença de microrganismos, de espécies diferentes, as quais colonizam a cavidade oral (RICKARD et al. 2003). Biofilmes, via de regra, são menos sensíveis a antibióticos ou reagentes fotoquímicos do que células planctônicas. O que poderia ser considerado como um argumento para a maior sensibilidade da aPDT sobre as cepas utilizadas em caldo (WILSON et al., 1996).

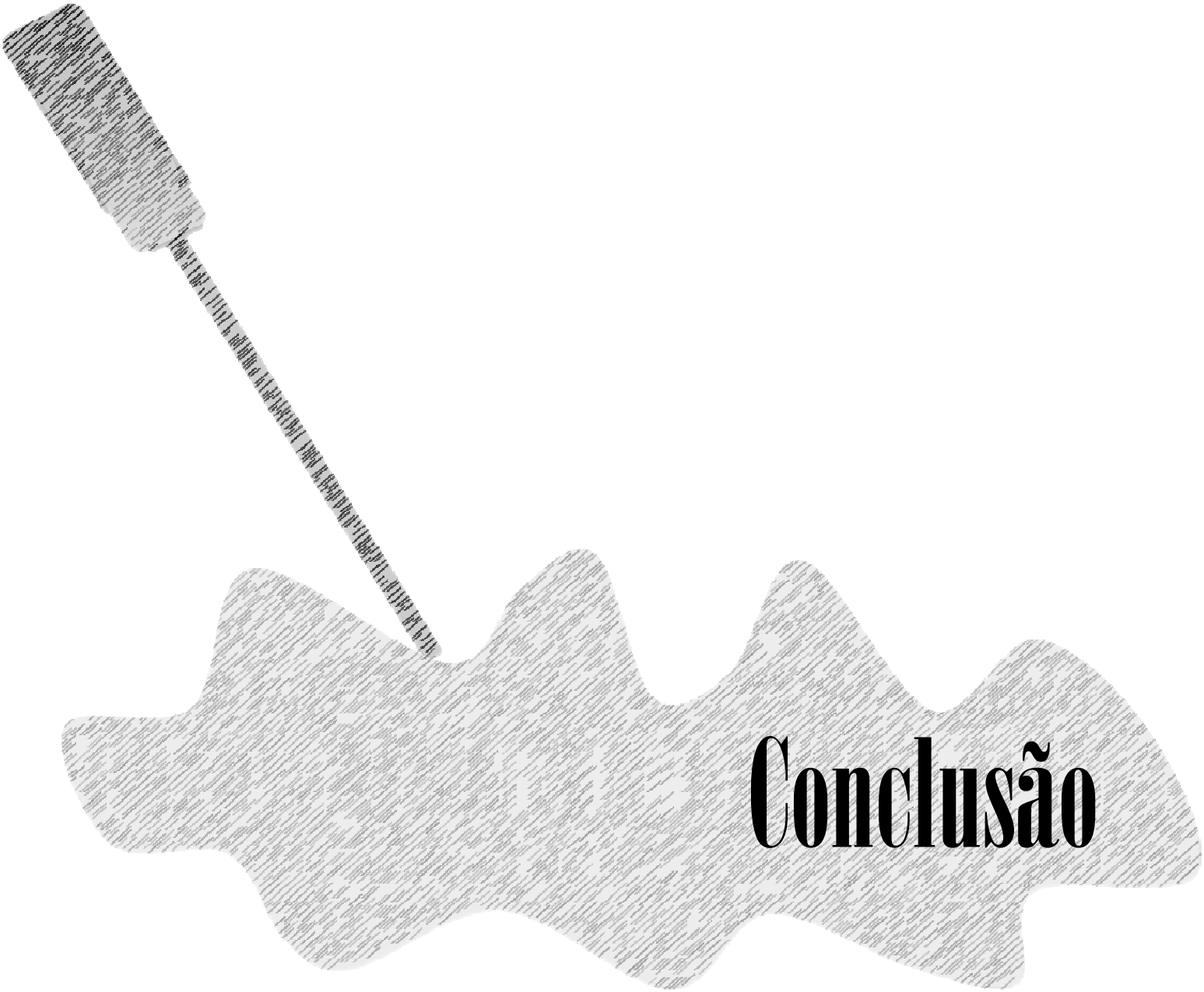
Portanto, esse experimento não reflete a real condição de um biofilme presente no periodonto, pois os microorganismos não foram cultivadas no fluido crevicular, saliva ou até em condições de simulações de biofilmes aderidos a algum tipo de superfície. Mas sim em um meio rico em nutrientes, o qual favorece o crescimento bacteriano e o isola de qualquer outro tipo de interação.

Pfitzner et al. (2004) descrevem que provavelmente a composição do meio de cultura líquido ou sólido pode resultar em uma discrepância nos resultados de pesquisas *in vitro*. No trabalho desses autores, o meio utilizado foi o ágar sangue que absorve parte da luz do laser, deixando menos energia disponível para o efeito

fotodinâmico. Componentes desses materiais podem competir com os fotossensibilizadores para locais de ligação na membrana celular bacteriana.

Nitzan et al. (1989) relataram que o meio de cultura pode reduzir o efeito fotodinâmico por substâncias presentes nestes se ligarem às porfirinas antes impedindo o contato com as células bacterianas. Além disso, os produtos metabólicos das bactérias podem alterar o pH do meio, desse modo, impedindo uma eficiente ligação do fotossensibilizador na parede celular bacteriana.

Diante das inúmeras variáveis encontradas nos estudos, mais pesquisas *in vitro* podem nos dar respostas interessantes sobre o efeito da terapia fotodinâmica. Uma delas seria a aplicação da terapia em microorganismos organizados em biofilme, para que se obtenha uma simulação mais próxima da encontrada em clínica.



Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os corantes azul de toluidina e azul de metileno, em alta concentração (10mg/ml), são eficazes na erradicação de *A.a* em suspensão, independentemente da presença ou ausência de luz.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; SIBATA, C. H. Clinical PD/PDT in North America: An historical review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 1, n. 4, p. 263-277, 2004.

ALLISON, R. R.; BAGNATO, V. S.; CUENCA, R.; DOWNIE, G. H.; SIBATA, C. H. The future of photodynamic therapy in oncology. **Future Oncol**, v. 2, n. 1, p. 53-71, 2006.

AL-ZAHRANI, M. S.; BAMSHMOUS, S. O.; ALHASSANI, A. A.; AL-SHERBINI, M. M. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. **J Periodontol**, v. 80, n. 10, p. 1568-1573, 2009.

ALWAELI, H. A.; AL-KHATEEB, S. N.; AL-SADI, A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 2, p. 801-807, 2015.

ANDRADE, P. F.; GARLET, G. P.; SILVA, J. S.; FERNANDES, P. G.; MILANEZI, C.; NOVAES, A. B., JR.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F.; TABA, M., JR.; SOUZA, S. L. Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to an association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression: a human study. **J Photochem Photobiol B**, v. 126, n., p. 119-125, 2013.

ARWEILER, N. B.; PIETRUSKA, M.; PIETRUSKI, J.; SKURSKA, A.; DOLINSKA, E.; HEUMANN, C.; AUSCHILL, T. M.; SCULEAN, A. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. **Clin Oral Investig**, v. 18, n. 9, p. 2129-2135, 2014.

ASNAASHARI, M.; MOJAHEDI, S. M.; ASADI, Z.; AZARI-MARHABI, S.; MALEKI, A. A Comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810nm and LED lamp 630nm) against Enterococcus Faecalis in extracted human anterior teeth. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v., n., p., 2015.

ATIEH, M.A. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 4, p. 605-13, 2010.

AZARPAZHOOH, A.; SHAH, P.S.; TENENBAUM, H.C.; GOLDBERG, M.B. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, v. 81, n. 1, p. 4-14, 2010.

AZNAR, J. A.; BONANAD, S.; MONTORO, J. M.; HURTADO, C.; CID, A. R.; SOLER, M. A.; DE MIGUEL, A. Influence of methylene blue photoinactivation treatment on

coagulation factors from fresh frozen plasma, cryoprecipitates and cryosupernatants. **Vox Sang**, v. 79, n. 3, p. 156-160, 2000.

BADERSTEN, A.; NILVEUS, R.; EGELBERG, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 11, n. 1, p. 63-76, 1984.

BALATA, M. L.; ANDRADE, L. P.; SANTOS, D. B.; CAVALCANTI, A. N.; TUNES UDA, R.; RIBEIRO EDEL, P.; BITTENCOURT, S. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. **J Appl Oral Sci**, v. 21, n. 2, p. 208-214, 2013.

BASSIR, S. H.; MOSLEMI, N.; JAMALI, R.; MASHMOULY, S.; FEKRAZAD, R.; CHINIFORUSH, N.; SHAMSHIRI, A. R.; NOWZARI, H. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 1, p. 65-72, 2013.

BERAKDAR, M.; CALLAWAY, A.; EDDIN, M. F.; ROSS, A.; WILLERSHAUSEN, B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. **Head Face Med**, v. 8, n., p. 12, 2012.

BERNIMOULIN, J. P. Recent concepts in plaque formation. **J Clin Periodontol**, v. 30 Suppl 5, n., p. 7-9, 2003.

BERTOLONI, G.; ROSSI, F.; VALDUGA, G.; JORI, G.; VAN LIER, J. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on Escherichia coli. **FEMS Microbiol Lett**, v. 59, n. 1-2, p. 149-155, 1990.

BERTOLONI, G.; ROSSI, F.; VALDUGA, G.; JORI, G.; ALI, H.; VAN LIER, J. E. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. **Microbios**, v. 71, n. 286, p. 33-46, 1992.

BETSY, J.; PRASANTH, C. S.; BAIJU, K. V.; PRASANTHILA, J.; SUBHASH, N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 6, p. 573-581, 2014.

BETSY, J.; PRASANTH, C. S.; BAIJU, K. V.; PRASANTHILA, J.; SUBHASH, N. Patients' perceptions of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v., n., p., 2016.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of Porphyromonas gingivalis in vitro. **Photochem Photobiol**, v. 65, n. 6, p. 1026-1031, 1997.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. A study of the uptake of toluidine blue O by Porphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiol**, v. 68, n. 3, p. 370-376, 1998.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; HENDERSON, B.; SHEPHERD, P.; CRIDLAND, J.; WILSON, M. Antibody-targeted lethal photosensitization of Porphyromonas gingivalis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 10, p. 2615-2618, 2000.

BONITO, A.J.; LUX, L.; LOHS, K.N. Impact of local adjuncts to scaling and root planing the periodontal disease therapy: a systematic review. **J. Periodontol**, v. 76, p. 1227–1236, 2005.

BOTTURA, P. E.; MILANEZI, J.; FERNANDES, L. A.; CALDAS, H. C.; ABBUD-FILHO, M.; GARCIA, V. G.; BAPTISTA, M. A. Nonsurgical periodontal therapy combined with laser and photodynamic therapies for periodontal disease in immunosuppressed rats. **Transplant Proc**, v. 43, n. 5, p. 2009-2016, 2011.

BOURRE, L.; GIUNTINI, F.; EGGLESTON, I. M.; MOSSE, C. A.; MACROBERT, A. J.; WILSON, M. Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. **Photochem Photobiol Sci**, v. 9, n. 12, p. 1613-1620, 2010.

BRAUN, A.; DEHN, C.; KRAUSE, F.; JEPSEN, S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 10, p. 877-884, 2008.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol**, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.

CAMPANILE, V. S.M.; GIANNOPOULOU, C.; CAMPANILE, G.; CANCELA, J. A.; MOMBELLI, A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 1, p. 27-34, 2015.

CAMPOS, G. N.; PIMENTEL, S. P.; RIBEIRO, F. V.; CASARIN, R. C.; CIRANO, F. R.; SARACENI, C. H.; CASATI, M. Z. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 317-324, 2013.

CAPPUYNS, I.; CIONCA, N.; WICK, P.; GIANNOPOULOU, C.; MOMBELLI, A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 5, p. 979-986, 2012.

CARVALHO, V. F.; ANDRADE, P. V.; RODRIGUES, M. F.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D.; PANNUTI, C. M.; DE MICHELI, G.; CONDE, M. C. Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal patients: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 42, n. 5, p. 440-447, 2015.

CHAN, Y.; LAI, C. H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 1, p. 51-55, 2003.

CHATZOPOULOS, G. S.; DOUFEXI, A. E.; KALOGIROU, F. Association of susceptible genotypes to periodontal disease with the clinical outcome and tooth survival after non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 21, n. 1, p. e14-29, 2016.

CHITSAZI, M. T.; SHIRMOHAMMADI, A.; POURABBAS, R.; ABOLFAZLI, N.; FARHOUDI, I.; DAGHIGH AZAR, B.; FARHADI, F. Clinical and Microbiological Effects of Photodynamic Therapy Associated with Non-surgical Treatment in Aggressive Periodontitis. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**, v. 8, n. 3, p. 153-159, 2014.

CHO, K.; LEE, S. Y.; CHANG, B. S.; UM, H. S.; LEE, J. K. The effect of photodynamic therapy on Aggregatibacter actinomycetemcomitans attached to surface-modified titanium. **J Periodontal Implant Sci**, v. 45, n. 2, p. 38-45, 2015.

CHONDROS, P.; NIKOLIDAKIS, D.; CHRISTODOULIDES, N.; ROSSLER, R.; GUTKNECHT, N.; SCULEAN, A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 5, p. 681-688, 2009.

CHRISTODOULIDES, N.; NIKOLIDAKIS, D.; CHONDROS, P.; BECKER, J.; SCHWARZ, F.; ROSSLER, R.; SCULEAN, A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 79, n. 9, p. 1638-1644, 2008.

CORREA, M. G.; OLIVEIRA, D. H.; SARACENI, C. H.; RIBEIRO, F. V.; PIMENTEL, S. P.; CIRANO, F. R.; CASARIN, R. C. Short-term microbiological effects of photodynamic therapy in non-surgical periodontal treatment of residual pockets: A split-mouth RCT. **Lasers Surg Med**, v., n., p., 2015.

DAMANTE, CA. **Desenvolvimento e testes in vitro de um novo corante para terapia fotodinâmica em Periodontia**. Tese (Livre Docência). Faculdade de Odontologia de Bauru-Universidade de São Paulo. Bauru, 2015.

DE OLIVEIRA, R. R.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; NOVAES, A. B., JR.; TABA, M., JR. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. **J Periodontol**, v. 78, n. 6, p. 965-973, 2007.

DE OLIVEIRA, R. R.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; NOVAES, A. B.; GARLET, G. P.; DE SOUZA, R. F.; TABA, M.; SCOMBATTI DE SOUZA, S. L.; RIBEIRO, F. J. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. **J Periodontol**, v. 80, n. 1, p. 98-105, 2009.

DILSIZ, A.; CANAKCI, V.; AYDIN, T. Clinical effects of potassium-titanyl-phosphate laser and photodynamic therapy on outcomes of treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 84, n. 3, p. 278-286, 2013.

EHRENBERG, B.; MALIK, Z.; NITZAN, Y. Fluorescence spectral changes of hematoporphyrin derivative upon binding to lipid vesicles, Staphylococcus aureus and Escherichia coli cells. **Photochem Photobiol**, v. 41, n. 4, p. 429-435, 1985.

EICK, S.; MARKAUSKAITE, G.; NIETZSCHE, S.; LAUGISCH, O.; SALVI, G. E.; SCULEAN, A. Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 10, n. 2, p. 156-167, 2013.

FRANCO, E. J.; POGUE, R. E.; SAKAMOTO, L. H.; CAVALCANTE, L. L.; CARVALHO, D. R.; DE ANDRADE, R. V. Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 11, n. 1, p. 41-47, 2014.

FRANSSON, H.; LARSSON, K. M.; WOLF, E. Efficacy of lasers as an adjunct to chemo-mechanical disinfection of infected root canals: a systematic review. **Int Endod J**, v. 46, n. 4, p. 296-307, 2013.

GARCEZ, A. S.; NUNEZ, S. C.; BAPTISTA, M. S.; DAGHASTANLI, N. A.; ITRI, R.; HAMBLIN, M. R.; RIBEIRO, M. S. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. **Photochem Photobiol Sci**, v. 10, n. 4, p. 483-490, 2011.

GE, L.; SHU, R.; LI, Y.; LI, C.; LUO, L.; SONG, Z.; XIE, Y.; LIU, D. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2011.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **J Biomed Opt**, v. 12, n. 3, p. 034029, 2007.

GIANNELLI, M.; FORMIGLI, L.; LORENZINI, L.; BANI, D. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 10, p. 962-970, 2012.

GIANNELLI, M.; FORMIGLI, L.; LORENZINI, L.; BANI, D. Efficacy of Combined Photoablative-Photodynamic Diode Laser Therapy Adjunctive to Scaling and Root Planing in Periodontitis: Randomized Split-Mouth Trial with 4-Year Follow-Up. **Photomed Laser Surg**, v. 33, n. 9, p. 473-480, 2015.

GIANNOPOULOU, C.; CAPPUYNS, I.; CANCELA, J.; CIONCA, N.; MOMBELLI, A. Effect of photodynamic therapy, diode laser, and deep scaling on cytokine and acute-phase protein levels in gingival crevicular fluid of residual periodontal pockets. **J Periodontol**, v. 83, n. 8, p. 1018-1027, 2012.

GILBERT, P.; DAS, J.; FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Adv Dent Res**, v. 11, n. 1, p. 160-167, 1997.

GIOVANI, E.M.; MARTINS, R.B.; MELO, J.J.; TORTAMANO, N. Use of GaAlAs laser in the treatment of necrotizing ulcerative periodontitis in patients seropositive for HIV/Aids. **J Oral Laser Appl** , v. 7, n. 1, p. 55–64, 2007.

GOULART, RC; BOLEAN, M; PAULINO, TP; THEDEI JR., G; SOUZA, SLS; TEDESCO, AC; CIANCAGLINI, P. Photodynamic Therapy in Planktonic and Biofilm Cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Photomedicine and Laser Surger, v, 28, n. 1, p. S-53-S-60, 2010.

GOULART, RC; THEDEI JR., G; SOUZA, SLS; TEDESCO, AC; CIANCAGLINI, P. Comparative Study of Methylene Blue and Erythrosine Dyes Employed in Photodynamic Therapy for Inactivation of Planktonic and Biofilm-Cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Photomedicine and Laser Surger, v, 28, n. 1, p. S-85-S-90, 2010.

GREENWELL, H.; BISSADA, N. F. Emerging concepts in periodontal therapy. **Drugs**, v. 62, n. 18, p. 2581-2587, 2002.

HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT, R. L., JR.; SOCRANSKY, S. S. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 5, p. 324-334, 1997.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HIATT, C. W.; KAUFMAN, E.; HELPRIN, J. J.; BARON, S. Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue. **J Immunol**, v. 84, n., p. 480-484, 1960.

HOLT, S. C.; EBERSOLE, J. L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 38, n., p. 72-122, 2005.

ISHIKAWA, I.; OKAMOTO, T.; MORITA, S.; SHIRAMIZU, F.; FUMA, Y.; ICHINOSE, S.; OKANO, T.; ANDO, T. Blue-violet light emitting diode (LED) irradiation immediately controls socket bleeding following tooth extraction: clinical and electron microscopic observations. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 5, p. 333-338, 2011.

ITO, T. Photodynamic agents as tools for cell biology. In: Smith KC, editor. **Photochemical and photobiological reviews**. New York: Plenum Press,1993. p. 141-186.

JACOB, P. S.; GAIT, T. C.; MOHANDAS, K.; LEONG, K V. G. Effect of photodynamic therapy adjunct to scaling and root-planing in periodontitis patients. A randomized clinical trial. Artigo aceito. 2016.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

JUNG, G. U.; KIM, J. W.; KIM, S. J.; PANG, E. K. Effects of adjunctive daily phototherapy on chronic periodontitis: a randomized single-blind controlled trial. **J Periodontal Implant Sci**, v. 44, n. 6, p. 280-287, 2014.

KIM, S.; KIM, J.; LIM, W.; JEON, S.; KIM, O.; KOH, J. T.; KIM, C. S.; CHOI, H.; KIM, O. In vitro bactericidal effects of 625, 525, and 425 nm wavelength (red, green, and blue) light-emitting diode irradiation. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 11, p. 554-562, 2013.

KOLBE, M. F.; RIBEIRO, F. V.; LUCHESI, V. H.; CASARIN, R. C.; SALLUM, E. A.; NOCITI, F. H., JR.; AMBROSANO, G. M.; CIRANO, F. R.; PIMENTEL, S. P.;

CASATI, M. Z. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. **J Periodontol**, v. 85, n. 8, p. e277-286, 2014.

KOMERIK, N.; CURNOW, A.; MACROBERT, A. J.; HOPPER, C.; SPEIGHT, P. M.; WILSON, M. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. **Lasers Med Sci**, v. 17, n. 2, p. 86-92, 2002.

KOMERIK, N.; NAKANISHI, H.; MACROBERT, A. J.; HENDERSON, B.; SPEIGHT, P.; WILSON, M. In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 932-940, 2003.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

KUBLER, A.C. **Photodynamic therapy. Med Laser Appl**, v. 20, p. 37– 45, 2005.

LAMBRECHT, B.; MOHR, H.; KNUVER-HOPF, J.; SCHMITT, H. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. **Vox Sang**, v. 60, n. 4, p. 207-213, 1991.

LAZAROVA, G.; TASHIRO, H. Protective effect of amphotericin B against lethal photodynamic treatment in yeast. **Microbios**, v. 82, n. 332, p. 187-196, 1995.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de Periodontia clínica e Implantologia oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 1304p.

LUCHESI, V. H.; PIMENTEL, S. P.; KOLBE, M. F.; RIBEIRO, F. V.; CASARIN, R. C.; NOCITI, F. H., JR.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z. Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 8, p. 781-788, 2013.

LUI, J.; CORBET, E. F.; JIN, L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 46, n. 1, p. 89-96, 2011.

LULIC, M.; LEIGGENER GOROG, I.; SALVI, G. E.; RAMSEIER, C. A.; MATTHEOS, N.; LANG, N. P. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 8, p. 661-666, 2009.

MACEDO GDE, O.; NOVAES, A. B., JR.; SOUZA, S. L.; TABA, M., JR.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F. Additional effects of aPDT on nonsurgical periodontal treatment with doxycycline in type II diabetes: a randomized, controlled clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 3, p. 881-886, 2014.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med Sci**, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.

MAISCH, T.; WAGNER, J.; PAPASTAMOU, V.; NERL, H. J.; HILLER, K. A.; SZEIMIES, R. M.; SCHMALZ, G. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. **J Appl Microbiol**, v. 107, n. 5, p. 1569-1578, 2009.

MALIK, Z; LADAN, H; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of gram-negative bactéria: problems and possible solutions. **News and Views**, p. 262-266, 1991.

MARTIN, I. C.; KERAWALA, C. J.; REED, M. The application of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of epithelial dysplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 4, p. 444-446, 1998.

MATTIELLO, F. D.; COELHO, A. A.; MARTINS, O. P.; MATTIELLO, R. D.; FERRAO JUNIOR, J. P. In vitro effect of photodynamic therapy on aggregatibacter actinomycetemcomitans and Streptococcus sanguinis. **Braz Dent J**, v. 22, n. 5, p. 398-403, 2011.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. **J Photochem Photobiol B**, v. 79, n. 2, p. 159-170, 2005.

MILLSON, C. E.; WILSON, M.; MACROBERT, A. J.; BOWN, S. G. Ex-vivo treatment of gastric Helicobacter infection by photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B**, v. 32, n. 1-2, p. 59-65, 1996.

MONGARDINI, C.; DI TANNA, G. L.; PILLONI, A. Light-activated disinfection using a light-emitting diode lamp in the red spectrum: clinical and microbiological short-term findings on periodontitis patients in maintenance. A randomized controlled split-mouth clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 1, p. 1-8, 2014.

MOORE, C. M.; PENDSE, D.; EMBERTON, M. Photodynamic therapy for prostate cancer--a review of current status and future promise. **Nat Clin Pract Urol**, v. 6, n. 1, p. 18-30, 2009.

MOREIRA, A. L.; NOVAES, A. B., JR.; GRISI, M. F.; TABA, M., JR.; SOUZA, S. L.; PALIOTO, D. B.; DE OLIVEIRA, P. G.; CASATI, M. Z.; CASARIN, R. C.; MESSORA,

M. R. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. **J Periodontol**, v. 86, n. 3, p. 376-386, 2015.

MOSLEMI, N.; SOLEIMAN-ZADEH AZAR, P.; BAHADOR, A.; ROUZMEH, N.; CHINIFORUSH, N.; PAKNEJAD, M.; FEKRAZAD, R. Inactivation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: an in vitro study. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 1, p. 89-94, 2015.

NAYAK, C. S. Photodynamic therapy in dermatology. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 71, n. 3, p. 155-160, 2005.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiol Rev**, v. 49, n. 1, p. 1-32, 1985.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 11, p. 1831-1836, 1989.

NITZAN, Y.; SHAINBERG, B.; MALIK, Z. The mechanism of photodynamic inactivation of Staphylococcus aureusby deuteroporphyrin. **J Curr Microbiol**, v.19, p. 265-269, 1989.

NITZAN, Y.; GUTTERMAN, M.; MALIK, Z.; EHRENBERG, B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochem Photobiol**, v. 55, n. 1, p. 89-96, 1992.

NORO FILHO, G. A.; CASARIN, R. C.; CASATI, M. Z.; GIOVANI, E. M. PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: a split-mouth, randomized clinical trial. **Lasers Surg Med**, v. 44, n. 4, p. 296-302, 2012.

NOVAES, A. B., JR.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; DE OLIVEIRA, R. R.; FERES, M.; SATO, S.; FIGUEIREDO, L. C. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 2, p. 389-395, 2012.

NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. **PDT – Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 312p.

O'CONNELL, P. A.; TABA, M.; NOMIZO, A.; FOSS FREITAS, M. C.; SUAID, F. A.; UYEMURA, S. A.; TREVISAN, G. L.; NOVAES, A. B.; SOUZA, S. L.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. **J Periodontol**, v. 79, n. 5, p. 774-783, 2008.

PASCHOAL, M. A.; LIN, M.; SANTOS-PINTO, L.; DUARTE, S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on Streptococcus mutans using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 2, p. 885-890, 2015.

PELOI, L. S.; SOARES, R. R.; BIONDO, C. E.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J Biosci**, v. 33, n. 2, p. 231-237, 2008.

PETELIN, M.; PERKIC, K.; SEME, K.; GASPIRC, B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 6, p. 1647-1656, 2015.

PFITZNER, A.; SIGUSCH, B. W.; ALBRECHT, V.; GLOCKMANN, E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. **J Periodontol**, v. 75, n. 10, p. 1343-1349, 2004.

PINHEIRO, S. L.; DONEGA, J. M.; SEABRA, L. M.; ADABO, M. D.; LOPES, T.; DO CARMO, T. H.; RIBEIRO, M. C.; BERTOLINI, P. F. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 1, p. 87-91, 2010.

POLANSKY, R.; HAAS, M.; HESCHL, A.; WIMMER, G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 7, p. 575-580, 2009.

POURABBAS, R.; KASHEFIMEHR, A.; RAHMANPOUR, N.; BABALOO, Z.; KISHEN, A.; TENENBAUM, H. C.; AZARPAZHOOH, A. Effects of photodynamic therapy on clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. **J Periodontol**, v. 85, n. 9, p. 1222-1229, 2014.

PRATES, R. A.; YAMADA, A. M., JR.; SUZUKI, L. C.; EIKO HASHIMOTO, M. C.; CAI, S.; GOUW-SOARES, S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S. Bactericidal effect of malachite green and red laser on Actinobacillus actinomycetemcomitans. **J Photochem Photobiol B**, v. 86, n. 1, p. 70-76, 2007.

QIAN, Z.; SAGERS, R. D.; PITT, W. G. The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of P. aeruginosa biofilms. **Ann Biomed Eng**, v. 25, n. 1, p. 69-76, 1997.

QIN, Y. L.; LUAN, X. L.; BI, L. J.; SHENG, Y. Q.; ZHOU, C. N.; ZHANG, Z. G. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 2, p. 162-167, 2008.

QUEIROZ, A. C.; SUAID, F. A.; DE ANDRADE, P. F.; OLIVEIRA, F. S.; NOVAES, A. B., JR.; TABA, M., JR.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F.; SOUZA, S. L. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 2, p. 617-625, 2015.

QUEIROZ, A. C.; SUAID, F. A.; DE ANDRADE, P. F.; NOVAES, A. B., JR.; TABA, M., JR.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F.; SOUZA, S. L. Antimicrobial photodynamic therapy associated to nonsurgical periodontal treatment in smokers: microbiological results. **J Photochem Photobiol B**, v. 141, n., p. 170-175, 2014.

QUISHIDA, C. C.; MIMA, E. G.; DOVIGO, L. N.; JORGE, J. H.; BAGNATO, V. S.; PAVARINA, A. C. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine((R)) and LED light after one and three successive applications. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 9, p. 2303-2312, 2015.

RAAB, O. Über die Wirkung fluoriziender Stoffe auf Infusorien. **Z Biol**, v. 39, p. 524–546, 1900.

RAGHAVENDRA, M.; KOREGOL, A.; BHOLA, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Aust Dent J**, v. 54 Suppl 1, n., p. S102-109, 2009.

RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGT, N.J.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol**, v.11, p. 94–100, 2003.

RITZ, L.; HEFTI, A. F.; RATEITSCHAK, K. H. An in vitro investigation on the loss of root substance in scaling with various instruments. **J Clin Periodontol**, v. 18, n. 9, p. 643-647, 1991.

RUHLING, A.; FANGHANEL, J.; HOUSHMAND, M.; KUHR, A.; MEISEL, P.; SCHWAHN, C.; KOCHER, T. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. **Clin Oral Investig**, v. 14, n. 6, p. 637-644, 2010.

SALMERON, S. **Efeitos do laser em baixa intensidade, da terapia fotodinâmica e do azul de toluidina O na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos**. 2011. 186p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação oral, linha de pesquisa em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011. Disponível em:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25146/tde-16082011-085632/pt-br.php>. Acesso em: 24 fev. 2016.

SALVA, K. A. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages, or indications. **Clin Dermatol**, v. 20, n. 5, p. 571-581, 2002.

SCHACHER, B.; BARON, F.; ROSSBERG, M.; WOHLFEIL, M.; ARNDT, R.; EICKHOLZ, P. Aggregatibacter actinomycetemcomitans as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 7, p. 566-573, 2007.

SCHENK, G.; FLEMMIG, T. F.; LOB, S.; RUCKDESCHEL, G.; HICKEL, R. Lack of antimicrobial effect on periodontopathic bacteria by ultrasonic and sonic scalers in vitro. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 2, p. 116-119, 2000.

SEGUIER, S.; SOUZA, S. L.; SVERZUT, A. C.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; BODINEAU, A.; CORREA, V. M.; COULOMB, B.; TEDESCO, A. C. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. **J Photochem Photobiol B**, v. 101, n. 3, p. 348-354, 2010.

SGOLASTRA, F.; PETRUCCI, A.; GATTO, R.; MARZO, G.; MONACO, A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 2, p. 669-82, 2013a.

SGOLASTRA, F.; PETRUCCI, A.; SEVERINO, M.; GRAZIANI, F.; GATTO, R.; MONACO, A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis.**J Clin Periodontol**, v. 40, n. 5, p. 514-26, 2013b.

SHARMA, S. K.; CHIANG, L. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? **Nanomedicine (Lond)**, v. 6, n. 10, p. 1813-1825, 2011.

SIGUSCH, B. W.; ENGELBRECHT, M.; VOLPEL, A.; HOLLETSCHKE, A.; PFISTER, W.; SCHUTZE, J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in Fusobacterium nucleatum-infected periodontitis patients. **J Periodontol**, v. 81, n. 7, p. 975-981, 2010.

SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 6, n. 5, p. 351-382, 1979.

SLOTS, J.; TING, M. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontol 2000**, v. 20, n., p. 82-121, 1999.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol**, v. 63, n. 4 Suppl, p. 322-331, 1992.

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

SOUZA, S. L.; ANDRADE, P. F.; SILVA, J. S.; TRISTAO, F. S.; ROCHA, F. A.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F.; TABA, M., JR.; NOVAES, A. B., JR. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor-beta1 levels in the gingival crevicular fluid. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 2, p. 65-71, 2013.

SOUZA, E.; MEDEIROS, A. C.; GURGEL, B. C.; SARMENTO, C. Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 1, p. 187-196, 2016.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 8, n. 2, p. 108-120, 2013.

TAKASAKI, A. A.; AOKI, A.; MIZUTANI, K.; SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; WANG, C. Y.; KOSHY, G.; ROMANOS, G.; ISHIKAWA, I.; IZUMI, Y. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. **Periodontol 2000**, v. 51, n., p. 109-140, 2009.

TAYLOR, G. W.; BORGNAKKE, W. S. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. **Oral Dis**, v. 14, n. 3, p. 191-203, 2008.

TEIXEIRA, A. H.; PEREIRA, E. S.; RODRIGUES, L. K.; SAXENA, D.; DUARTE, S.; ZANIN, I. C. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. **Caries Res**, v. 46, n. 6, p. 549-554, 2012.

THEODORO, L. H.; SILVA, S. P.; PIRES, J. R.; SOARES, G. H.; PONTES, A. E.; ZUZA, E. P.; SPOLIDORIO, D. M.; DE TOLEDO, B. E.; GARCIA, V. G. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 4, p. 687-693, 2012.

TRINDADE, A. C.; DE FIGUEIREDO, J. A.; STEIER, L.; WEBER, J. B. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. **Photomed Laser Surg**, v. 33, n. 3, p. 175-182, 2015.

UMEDA, M.; TSUNO, A.; OKAGAMI, Y.; TSUCHIYA, F.; IZUMI, Y.; ISHIKAWA, I. Bactericidal effects of a high-power, red light-emitting diode on two periodontopathic bacteria in antimicrobial photodynamic therapy in vitro. **J Investig Clin Dent**, v. 2, n. 4, p. 268-274, 2011.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg Med**, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers Surg Med**, v. 33, n. 5, p. 311-319, 2003.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; USACHEV, Y. M.; SIEVERT, C. E.; BIEL, M. A. Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in Pseudomonas aeruginosa cells. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2008.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiol Rev**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VALDUGA, G.; BREDA, B.; GIACOMETTI, G. M.; JORI, G.; REDDI, E. Photosensitization of wild and mutant strains of Escherichia coli by meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl)porphine. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 256, n. 1, p. 84-88, 1999.

VITKOV, L.; HANNIG, M.; KRAUTGARTNER, W. D.; FUCHS, K. Bacterial adhesion to sulcular epithelium in periodontitis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 211, n. 2, p. 239-246, 2002.

VOHRA, F.; AKRAM, Z.; SAFI, S.H.; DEVI VAITHILINGAM, R.; GHANEM, A.; SERGIS, K.; JAVED, F. Role of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2015.

VON TROIL, B.; NEEDLEMAN, I.; SANZ, M. A systematic review of the prevalence of root sensitivity following periodontal therapy. **J Clin Periodontol**, v. 29 Suppl 3, n., p. 173-177; discussion 195-176, 2002.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; MARLAND, J.; WAREING, D. R.; BOLTON, F. J. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 19, n. 1, p. 75-80, 1997.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? **J Chemother**, v. 14, n. 5, p. 431-443, 2002.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES, M. J.; WILSON, M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. **Caries Res**, v. 38, n. 6, p. 530-536, 2004.

WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int Dent J**, v. 44, n. 2, p. 181-189, 1994.

WILSON, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **J Med Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 79-87, 1996.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, n. 5, p. 412-418, 2004.

WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, n. 3, p. 182-187, 1993.

WILSON, M.; HENDERSON, B. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 365-379, 1995.

WILSON, M.; MIA N. Sensitization of Candida albicans to killing by low-power laser light. **J Oral Pathol Med**, v. 22, p. 353-357, 1993.

WOOD, S.; NATTRESS, B.; KIRKHAM, J.; SHORE, R.; BROOKES, S.; GRIFFITHS, J.; ROBINSON, C. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **J Photochem Photobiol B**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.

WYLAM, J.M.; MEALEY, B.L.; MILLS, M.P.; WALDROP, T.C.; MOSKOWICZ, D.C. The clinical effectiveness of open versus closed scaling and root planing on multirooted teeth. **J Periodontol**, v. 64, p. 1023–1028, 1993.

YONEDA, M.; SUZUKI, N.; MASUO, Y.; FUJIMOTO, A.; IHA, K.; YAMADA, K.; IWAMOTO, T.; HIROFUJI, T. Effect of S-PRG Eluate on Biofilm Formation and Enzyme Activity of Oral Bacteria. **Int J Dent**, v. 2012, n., p. 814913, 2012.

ZANIN, I. C.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L. K.; PIMENTA, L. A.; HOFLING, J. F.; GONCALVES, R. B. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur J Oral Sci**, v. 114, n. 1, p. 64-69, 2006.

ZAPPA, U.; SMITH, B.; SIMONA, C.; GRAF, H.; CASE, D.; KIM, W. Root substance removal by scaling and root planing. **J Periodontol**, v. 62, n. 12, p. 750-754, 1991.

Apêndices

APÊNDICE A - Imagens ilustrativas de colônias de *A.a* em microscopia invertida (40X)

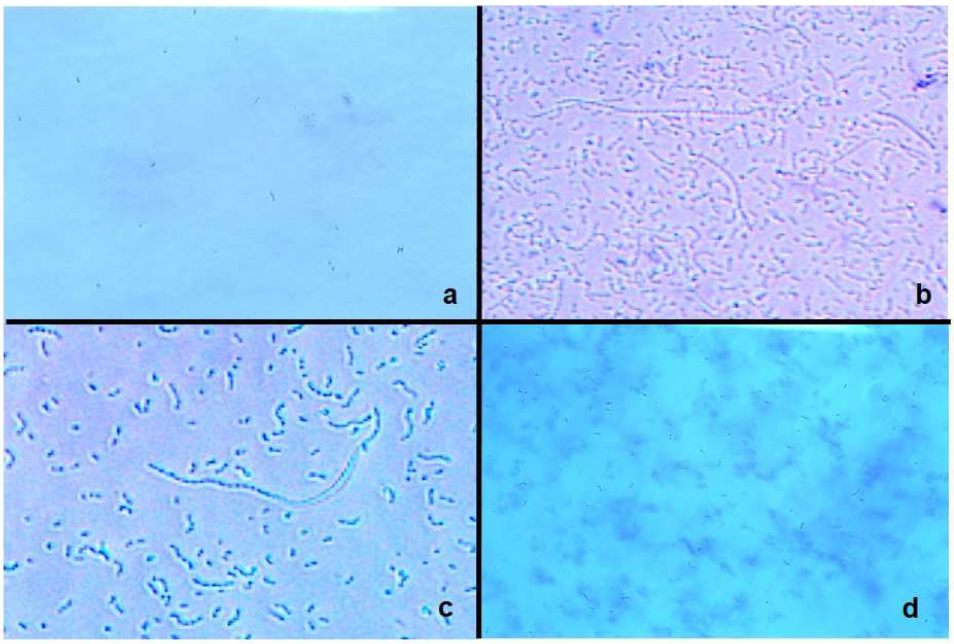


Figura 15- Grupos corados com azul de metileno mostrando colônias de A.a em microscopia invertida (40x) (Olympus SC100®): **a)** M 10 Led – Poucas colônias desorganizados **b)** T 0,1 Led – Colônias em cordão **c)** T 0,5 Led – Colônias em cordão no centro da foto e ao redor, colônias desorganizadas **d)** M 10 – Ausência de colônias e presença de restos celulares.