



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
PARA O TRATAMENTO DA PERIODONTITE:
ESTUDO *IN VITRO* E *EX VIVO* UTILIZANDO UMA
NOVA OPÇÃO DE FONTE DE LUZ**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Diogo Costa Esteves

Viseu, 2022



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
PARA O TRATAMENTO DA PERIODONTITE:
ESTUDO *IN VITRO* E *EX VIVO* UTILIZANDO UMA
NOVA OPÇÃO DE FONTE DE LUZ**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Diogo Costa Esteves

Orientadora: Prof^a Doutora Anna Carolina Volpi Mello-Moura

Coorientadora: Doutora Ana Peixoto Gomes

Viseu, 2022

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará. Direi do Senhor: *Ele* é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.”

Salmo 91:1-2

AGRADECIMENTOS:

O meu profundo agradecimento dirige-se à minha família próxima: aos meus pais, pelos valores que me inculcaram e pela oportunidade de estudar neste curso, pois só através do esforço e sacrifício deles foi possível que eu pudesse realizá-lo. Aos meus avós, pela paciência e pela educação que me transmitiram e ao meu irmão, pela proximidade, pelo suporte e pela abertura e disponibilidade para comigo. Quero agradecer à minha namorada, pelo carinho, pela cumplicidade, pela amizade íntima, pela presença constante nestes últimos 3 anos, dos quais pretendo que sejam muitos mais, unidos em casal.

À minha orientadora Prof^a Doutora Anna Carolina Volpi Mello-Moura e coorientadora Doutora Ana Peixoto Gomes, pelo tema desenvolvido, pelo acompanhamento prestado durante todo este percurso, pelos valiosos ensinamentos, pela atitude sempre prestável e incansável. Foi uma grande honra ter trabalhado convosco, por todo o conhecimento que me transmitiram!

À minha binómia Susana Alonso, por toda a lealdade e companheirismo, neste ano em que trabalhámos juntos.

À Tatiana Serrão e à Andreia Gomes, as minhas amigas madeirenses, por toda a estima que têm por mim e por toda a disponibilidade, durante estes cinco anos.

Aos professores, por toda a sabedoria que nos transmitiram, sobre medicina dentária

Aos meus colegas de curso, que de uma forma ou de outra, me ajudaram a ultrapassar as dificuldades e desafios do curso, dos quais guardo boas memórias de tudo o que vivenciámos.

Por fim, mas o mais importante... a Deus! Pelas bênçãos que me tem concedido e me concede, pela proteção, pela segurança no meio das dúvidas e por tudo o que representa na minha experiência cristã.

RESUMO

Introdução: A periodontite é uma doença complexa, com vários fatores etiológicos, que se desenvolve ao longo do tempo, através de acumulação de placa dentária e de disbiose bacteriana. Tem como principal terapia adjuvante a antibioticoterapia, que tem revelado problemas relativamente a resistência bacteriana. Como tal, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido estudada como potencial substituta da antibioticoterapia, como terapia adjuvante. Neste trabalho, pretende-se estudar o potencial de uma nova abordagem baseada na aPDT usando porfirinas como fotossensibilizadores e o fotopolimerizador, equipamento disponível em todos os consultórios de medicina dentária como fonte de luz.

Material e métodos: Realizaram-se ensaios *in vitro* e *ex vivo* em dentes de fotoinativação de microrganismos periodontopatogénicos (bactéria *E. faecalis* e o fungo *C. albicans*) usando porfirinas como fotossensibilizador e o fotopolimerizador como fonte de luz. Para estes estudos, foi selecionada a ProtoIX como fotossensibilizador (testada a 10 e 20 µM, nos ensaios *in vitro* e a 20 e 50 µM nos ensaios *ex vivo*) e o fotopolimerizador como fonte de luz.

Resultados: Nos ensaios *in vitro*, foram observados decréscimos da viabilidade do fungo *C. albicans* e da bactéria *E. faecalis* superiores a 3 log UFC/mL e a 6 log UFC/mL, respetivamente, quando expostos a uma concentração de 20 µM de ProtoIX e 20 min de irradiação com luz do fotopolimerizador. Nos ensaios *ex vivo*, apenas se verificou um ligeiro decréscimo na sobrevivência do fungo *C. albicans* (0,8 log UFC/mL), após a incubação com 20 µM de ProtoIX e 20 min de irradiação com luz do fotopolimerizador.

Conclusão: Este estudo comprova a elevada potencialidade da aPDT para a inativação de microrganismos periodontopatogénicos usando a ProtoIX como fotossensibilizador e o fotopolimerizador como fonte de luz. No entanto, mais estudos deverão ser realizados de forma a otimizar este protocolo para a sua aplicação em ambiente clínico.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite, aPDT, ProtoIX, Fotopolimerizador

Abstract:

Introduction: Periodontitis is a complex disease, with multiple etiologic factors, which develops through time, due to dental plaque accumulation and bacterial dysbiosis. Antibiotic therapy is the most used adjuvant therapy, which have demonstrated having issues related to bacterial resistance. So, antimicrobial PhotoDynamic Therapy (aPDT) has been studied as a potential substitute for antibiotic therapy, as an adjuvant therapy. In this work, it is intended to study the potential of a new approach using aPDT with protoporphyrin IX as photosensitizer and dental curing light, equipment which is available in every dental clinic, as light source.

Material and methods: We have performed photoinactivation of periodontopathogens (*Enterococcus faecalis* bacteria and *Candida albicans* fungi) studies *in vitro* and *ex vivo* in teeth using porphyrins as photosensitizer and dental curing light as light source. For these studies, we have selected ProtoIX as photosensitizer (tested at 10 and 20 μM *in vitro* and at 20 and 50 μM) and dental curing light as light source.

Results: In *in vitro* studies, we have observed viability decrease on *C. albicans* fungi and *E. faecalis* bacteria, above 3 log UFC/mL and 6 log UFC/mL, respectively, when exposed with a ProtoIX concentration of 20 μM and 20 minutes of dental curing light irradiation. In *ex vivo* studies, we have observed a slight decrease of *C. albicans* fungi survival (0.8 log UFC/mL), after its incubation on 20 μM of ProtoIX and 20 minutes irradiation, with a dental curing light.

Conclusion: This study has shown aPDT's high potential of periodontopathogens inactivation using ProtoIX as photosensitizer and dental curing light as light source. However, several more studies must be conducted to improve this protocol, so it can be used in clinical environments.

Keywords: Periodontitis, aPDT, ProtoIX, Dental curing light

Índice

Resumo	IX
Abstract	XI
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Conceito de periodontite.....	3
1.2 Nova classificação de doenças periodontais.....	4
1.3 Terapias das doenças periodontais.....	5
1.3.1 Terapias convencionais das doenças periodontais.....	5
1.3.2 Terapias cirúrgicas das doenças periodontais.....	5
1.3.3 Terapias adjuvantes das doenças periodontais.....	6
1.4 Conceito de aPDT.....	7
1.4.1 Aplicação clínica de aPDT.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Fotossensibilizador.....	13
2.2 Fonte de luz (Fotopolimerizador).....	13
2.3 Ensaio de fotoinativação em PBS (estudos <i>in vitro</i>).....	13
2.3.1 aPDT com Proto IX.....	13
2.4 Ensaio de fotoinativação em dentes (estudos <i>ex vivo</i>).....	14
2.4.1 Preparação dos dentes.....	14
2.5 Análise estatística.....	16
3. RESULTADOS	20
3.1 Ensaio de fotoinativação em PBS (estudos <i>in vitro</i>)	20
3.2 Ensaio de fotoinativação em dentes (estudos <i>ex vivo</i>)	24
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	37
6. BIBLIOGRAFIA	41
7. ANEXOS	47
7.1 Parecer sobre o projeto nº 160.....	47

Índice de figuras

Figura 1: Mecanismos fotoquímicos da (aPDT) e os produtos derivados das reações vs paredes celulares dos microrganismos.....	7
Figura 2: Fotoinativação do fungo <i>C. albicans</i> , incubado com Proto IX a 10 µM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 10 e 20 min em PBS.....	21
Figura 3: Fotoinativação do fungo <i>C. albicans</i> , incubado Proto IX a 20 µM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 10 e 20 min em PBS.....	21
Figura 4: Fotoinativação da bactéria <i>E. faecalis</i> , incubado Proto IX a 20 µM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 10 e 20 min em PBS.....	23
Figura 5: Fotoinativação da bactéria <i>E. faecalis</i> , incubado com Proto IX a 20 µM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 5 e 10 min em PBS.....	23
Figura 6: Fotoinativação do fungo <i>C. albicans</i> , incubado com Proto IX a 20 µM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 0 e 20 min.....	25
Figura 7: Fotoinativação do fungo <i>C. albicans</i> , incubado com a Proto IX a 50 µM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 0 e 20 min.....	25

Lista de abreviaturas

RAR: Raspagem e alisamento radicular

aPDT: Terapia fotodinâmica antimicrobiana

PS: Fotossensibilizador

ROS: Espécies reativas de oxigênio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

LD: Laser díodo

ProtoIX: Derivado porfirínico do sal dissódico da Protoporfirina IX

E. Faecalis: *Enterococcus faecalis*

C. Albicans: *Candida albicans*

DMSO: Dimetilsulfóxido

PBS: Phosphate buffered saline

BHI: Brain heart infusion

SDB: Sabouraud dextrose broth

UFC: Unidades formadoras de colónias

Ct: Controlo

CE: Controlo escuro

ANOVA: Análise de variância

DP: Desvio padrão

ImP: Porfirinas *meso*- substituída com grupos imidazole

PyP: Porfirina *meso*- substituída por grupos piridinium

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

DVDMS: Sinoporfirina de sódio

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito de Periodontite

A doença periodontal, também conhecida como doença gengival, engloba periodontite e gengivite.(1,2) A gengivite ou inflamação da gengiva, que leva ao sangramento gengival, é considerada um estágio inicial de doença periodontal. Por sua vez, a periodontite desenvolve-se ao longo do tempo, através de acumulação de placa dentária, disbiose bacteriana, formação de bolsas periodontais, recessões gengivais, destruição tecidual e perda de osso alveolar, podendo levar, em última instância, a perda dentária. (3) A periodontite é uma doença complexa, com vários fatores etiológicos. Esta doença tende a afetar alguns dentes ou superfícies dentárias, mas raramente afeta a dentição toda. (3)

Geralmente, a periodontite crónica afeta adultos, corresponde e resulta de um conjunto de fatores locais, principalmente cálculo dentário. Doenças sistémicas, tal como diabetes e fatores de risco adquiridos, como tabaco, têm um impacto forte na severidade da periodontite crónica. (4) Ela é classificada como periodontite crónica generalizada quando afeta um número superior a 10 dos 32 dentes numa dentição humana e localizada quando menos dentes estão envolvidos. (2)

Quanto à periodontite agressiva, ela afeta mais indivíduos jovens, com idades inferiores a 25 anos, geralmente tendo relação genética dentro da família, e a característica principal é a rápida destruição do suporte e osso, com pouco ou nenhum depósito microbiano. (4) Pode ser classificada em subcategorias (localizada e generalizada). Se for localizada, foca-se na perda de *attachment* em, pelo menos, 2 dentes, sendo um deles o primeiro molar e não envolve mais do que dois dentes, para além do primeiro molar e os incisivos. Se for generalizada, normalmente afeta pessoas com idade inferior a 30 anos e tem perda de *attachment* generalizado em, pelo menos, 3 dentes além dos primeiros molares e incisivos. (5)

1.2 Nova classificação de doenças periodontais

Na última revisão da classificação das doenças periodontais, concordou-se na ideia de criar uma nova classificação, com base num sistema de estágios e graus multidimensional, que podia ir sendo adaptado ao longo do tempo, à medida que nova evidência fosse surgindo. (6)

Nas últimas décadas, entendeu-se que havia um dilema, na forma como diferentes apresentações fenotípicas representavam diferentes doenças ou apenas variações dentro da mesma doença. Ou seja, por definição do padrão, casos de periodontite que não satisfaziam a definição fenotípica de “agressiva” eram classificados como “crónica”, com a implicação de que seriam abordados de uma forma mais fácil. Portanto, nas últimas duas décadas, os investigadores têm demonstrado preocupação sobre a capacidade de diferenciar de forma correta os casos de periodontite agressiva e crónica, sendo que estas dificuldades têm sido consideradas como a base lógica principal para estabelecer uma nova classificação. (7)

Nesta nova classificação, foram introduzidas as categorias “estágios” e “graus”. Os “estágios” estão largamente dependentes sobre a severidade da doença, bem como sobre a complexidade da abordagem terapêutica, ao passo que os “graus” fornecem informação adicional sobre características biológicas da doença, estando incluídas a história analítica da progressão da doença, avaliação do risco de progressão, antecipação de resultados insuficientes de tratamento e avaliação do risco que a doença ou o seu tratamento possam afetar a saúde geral do paciente. Estágios envolvem quatro categorias (de I ao IV) e são determinadas após serem consideradas diversas variáveis, como perda de suporte, perda percentual e quantidade óssea, profundidade de sondagem, presença e extensão de defeitos ósseos, envolvimento de furca, mobilidade dentária e perda dentária devido a periodontite. Graus incluem três categorias (A- risco baixo, B- risco médio, C- risco alto), incluem, além de aspetos relacionados com a progressão da periodontite, o nível geral de saúde, mas particularmente os hábitos tabágicos e o controlo metabólico da doença diabetes. Todos os diagnósticos apresentam um estágio e um grau, como por exemplo: Diagnóstico de estágio III, grau B (6)

1.3 Terapias das doenças periodontais

1.3.1 Terapias convencionais das doenças periodontais

No que diz respeito à terapia periodontal, a mesma tem como objetivo preservar, melhorar e manter a dentição natural. Dentro da terapia, estão incluídas a instrumentação manual, sónica e/ou ultrassónica, auxiliadas pelo controlo de placa supragengival. (8) Na instrumentação manual, através da raspagem e alisamento radicular (RAR) com curetas periodontais, consegue-se remover cálculo em depósitos supra e subgengival. Enquanto a raspagem induz a ideia de remoção de placa e cálculo sobre a coroa ou a superfície radicular, o alisamento radicular consiste na remoção de cimento ou dentina superficial que é dura, impregnada com cálculo ou contaminada com toxinas e microrganismos. Estes contaminantes podem tomar a forma de uma camada de placa bacteriana, associados a produtos tóxicos, cálculo ou cimento afetado. Contudo, a remoção total de cálculo, é extremamente difícil de executar. Dentro dos fatores que influenciam, destaca-se a profundidade do sulco, quando maior do que 5 mm. Além deste fator, interferem no sucesso do tratamento a distância do depósito relativamente à linha amelo-cementária, a capacidade de detetar cálculo na superfície radicular, a experiência do profissional e a localização do cálculo sobre uma superfície de furca. (9)

1.3.2 Terapias cirúrgicas das doenças periodontais

Além deste tipo de tratamento mais tradicional, existem as técnicas cirúrgicas conservadoras. Dentro delas, está a gengivectomia, que consiste na excisão de tecido mole da parede da bolsa periodontal. Os principais objetivos desta intervenção incluem a erradicação completa de bolsas periodontais supra-ósseas, em conjunto com gengivoplastia, com vista a ter um contorno geral mais uniforme. Além desta, temos o desbridamento do retalho, que é uma abordagem cirúrgica que dá acesso às raízes, ao osso e às bolsas periodontais. Comparativamente à gengivectomia, revela ter melhor visualização, maior facilidade de instrumentação, preservação do periodonto, maior redução e

eliminação de bolsas, menos desconforto pós-operatório, melhor estética e melhor higiene oral, a longo prazo.

Por fim, outra intervenção que se encontra no limite do que se considera ser um tratamento periodontal conservador, é o novo procedimento de fixação assistida por laser. Esta é uma técnica que utiliza laser específico, coadjuvado de ajuste oclusal, imobilizando (quando necessário) e fazendo raspagem e alisamento radicular para promover uma nova fixação ou regeneração periodontal. (9)

1.3.3 Terapias adjuvantes das doenças periodontais

Clorexidina

Em complemento com a terapia periodontal básica, temos a utilização de soluções de clorexidina, antisséptico com ação bactericida e fungicida. Entende-se que a utilização desta técnica complementar tem um efeito positivo nos parâmetros periodontais avaliados, principalmente a profundidade de sondagem. Contudo, é necessário ainda avaliar se os benefícios justificam a criação de um protocolo de utilização e a sua exposição a pacientes durante tratamento, já que existem danos colaterais, tais como aparecimento de manchas nos dentes e dificuldades de remoção, na presença de restaurações. (10)

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (*Antimicrobial Photodynamic Therapy-aPDT*)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do acrónimo em inglês: *Antimicrobial Photodynamic Therapy*) tem sido proposta como tratamento periodontal adjuvante, com vista a reduzir a comunidade patogénica nos tecidos periodontais. O efeito fotodinâmico antimicrobiano foi primeiramente tentado, há mais de cem anos, desde os estudos de *Raab* e *von Tappeiner*. (11) Apesar disso, devido ao desenvolvimento dos antibióticos, desvaneceu-se o interesse nesta terapia, tendo ganho mais atenção recentemente, devido à emergência da resistência antibiótica. (11)

A resistência antimicrobiana surgiu quando as bactérias que causavam infecção sobreviviam à exposição farmacológica, que normalmente eram erradicados ou impediam o seu crescimento. (12)

1.4 Conceito de aPDT

A aPDT é uma técnica localizada e não-invasiva que ocorre através de mecanismos fotofísicos. Quando um fotossensibilizador (PS) adere a uma célula-alvo, absorve a energia da irradiação da luz, num comprimento de onda específico, tornando num estado excitado. A seguir, o PS perde energia, podendo reagir com o oxigénio molecular, levando à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). O stress oxidativo provocado por essas espécies atua de maneiras distintas nas estruturas celulares (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN) e hidratos de carbono), levando à morte celular. (11)

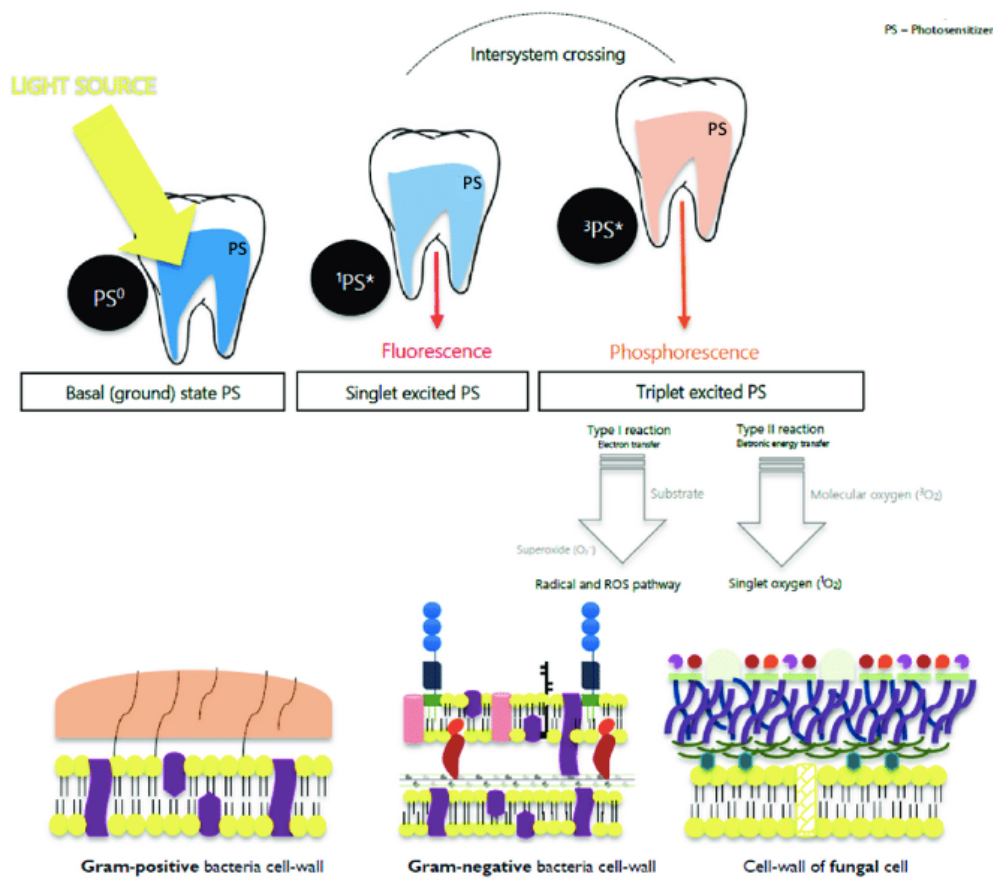


Figura 1. Mecanismos fotoquímicos da aPDT e os produtos derivados das reações vs paredes celulares dos microorganismos. (Imagem adaptada de Diogo P.) (12)

Os PSs têm estado em constante evolução, sendo que as porfirinas, clorinas, fetalocianinas e sais de fenotiazinium promovem a inativação de espécies Gram-positivas como Gram-negativas. Dentro dos PSs do tipo sal de fenotiazinium, o azul de metileno e o azul de toluidina são os mais usados na Medicina Dentária, tendo em conta que apresentam uma capacidade de absorção alta, entre os 600 e 660nm. Além disso, a absorção tecidual é baixa. (11)

1.4.1 Aplicação clínica de aPDT

A aPDT tem sido considerada como uma técnica periodontal adjuvante, sendo que tem havido alguns resultados controversos, no que toca às vantagens clínicas no tratamento da doença periodontal. (11) Alguns estudos demonstraram que o laser dídodo (LD) como terapia adjuvante não tinha um benefício adicional em termos do nível de suporte clínico. A aPDT+RAR e aPDT+LD+RAR demonstraram ter melhores resultados do que unicamente o RAR a 3 e 6 meses, e mostraram a curto prazo benefícios em termos de nível de suporte clínico. Contudo, a diferença ente aPDT+RAR e aPDT+LD+RAR não era significativa, mas o aPDT+LD+RAR configurava-se como melhor combinação. Os resultados verificados indicam que a aPDT tem potencial para ser uma terapia adjuvante eficaz, a longo prazo. (13) A aPDT apresenta várias vantagens quando comparado com terapias convencionais antimicrobianas, mostrando ser eficiente independentemente da existência de resistência bacteriana. (14)

A aPDT tem sido eficiente na inativação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (15,16), fungos (17) e vírus (18). Dentro dos compostos usados como fotossensibilizadores, as porfirinas ganharam maior relevância, devido às suas propriedades singulares. (19)

Muitos estudos demonstram a eficácia da aPDT como tratamento adjuvante da periodontite. (11) Grande parte desses estudos usaram sais de fenotiazinium,

como fotossensibilizadores. (11,20) Contudo, esses fotossensibilizadores requerem fontes de luz específicas, com comprimentos de onda entre 600–800nm. Essas fontes de luz específicas não estão disponíveis em todas as clínicas dentárias, portanto, necessitariam ser compradas para se conseguir usar a aPDT com os sais de fenotiazinium. Por outro lado, as porfirinas apresentam uma alta absorção de luz, dentro dos limites de comprimento de onda que os fotopolimerizadores apresentam, entre 400 e 500nm.

Como os aparelhos de fotopolimerização fazem parte dos equipamentos básicos das clínicas dentárias, sendo usados principalmente na polimerização de materiais restauradores, poderia ser uma alternativa interessante como fonte de luz no aPDT, ao contrário das fontes de luz específicas, que normalmente são aparelhos mais caros e requerem investimentos. Apesar do desenvolvimento de protocolos de aPDT para tratar a doença periodontal, a utilização de porfirinas e de fotopolimerizadores como fonte de luz, tem sido pouco estudada, apesar de aparentarem ser uma solução plausível, com grande potencial.

Tendo em conta o elevado potencial da aPDT, utilizando porfirinas e fotopolimerizadores, para tratar a doença periodontal, este estudo tem como objetivo a realização de estudos *in vitro* e *ex vivo* em dentes humanos, para avaliar a eficiência do derivado porfirínico do sal dissódico da Protoporfirina IX (Proto IX) como PS, na inativação de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *Candida albicans* (*C. albicans*), quando irradiado com um fotopolimerizador. Os resultados deste estudo poderão direcionar futuros estudos clínicos que trarão evidência científica sobre o tema.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fotossensibilizador

A solução stock do fotossensibilizador (sal dissódico da Protoporfirina IX, Sigma-Aldrich, Portugal) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) a 500 μM e armazenada no escuro.

2.2 Fonte de luz (Fotopolimerizador)

Para os ensaios de terapia fotodinâmica, após o período prévio de incubação do fotossensibilizador no escuro, as amostras foram irradiadas com luz azul (385-515 nm) proveniente de um fotopolimerizador (VALO™, Ultradent, USA). A fonte de luz foi posicionada o mais próximo possível da placa contendo as amostras e o controlo.

2.3 Ensaios de fotoinativação em PBS (estudos *in vitro*)

2.3.1 aPDT com Proto IX

Para estes estudos foram selecionados dois microrganismos periodontopatogénicos: a bactéria *E. faecalis* e o fungo *C. albicans*. Estes microrganismos foram mantidos a -80°C em meio de cultura adequado e 20% glicerol. Antes de cada ensaio, uma alíquota foi descongelada e cultivada em meio agarizado e antes de cada ensaio, uma colónia de cada microrganismo foi transferida de forma asséptica para um frasco contendo meio de cultura (*Brain Heart Infusion* (BHI) para o *E. faecalis* e a *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) para *C. albicans*) e cultivada sob agitação a 37°C durante 18-24h. A bactéria *E. faecalis* foi incubada em câmaras de anaerobiose.

Cada cultura microbiana crescida durante a noite e na fase estacionária, foi diluída em solução tampão (PBS) e a sua turbidez ajustada a 0.5 Macfarland (concentração final de $\approx 10^8$ unidades formadoras de colónia por mililitro (UFC/mL)). Estas culturas foram distribuídas igualmente pelos poços de uma placa de 6 poços (3 mL) e foram incubadas com 10 e 20 μM de ProtoIX. De forma

a avaliar a toxicidade do fotossensibilizador no escuro, foi realizado um controlo em que a suspensão microbiana foi incubada com ProtolX, tendo sido mantida no escuro (CE), de forma a avaliar a eventual toxicidade do fotossensibilizador. Foi ainda avaliada a influência da luz na sobrevivência dos microrganismos através de um controlo constituído apenas pela suspensão microbiana (Ct) e que foi irradiada nas mesmas condições das amostras. As amostras e os controlos foram incubados no escuro de forma a promover a ligação do fotossensibilizador às células microbianas durante 15 min. Após este período, as amostras e o Ct foram irradiados com luz azul (proveniente de um fotopolimerizador encostado à placa de 6 poços) durante vários intervalos de tempo, que foram ajustados ao longo das experiências. O CE foi mantido no escuro durante toda a experiência.

Entre os intervalos de irradiação foram retiradas alíquotas de 100 µL das amostras e do controlo, diluídas em série em PBS e plaqueadas em placas de Petri contendo meio agarizado adequado para cada microrganismo. As placas foram incubadas a 37°C durante 18-24h. As UFC foram contadas nas diluições adequadas e a concentração das células foi expressa como Log₁₀ UFC/mL. Foram realizados pelo menos 2 ensaios independentes com 2 réplicas.

2.4 Ensaios de fotoinativação em dentes (estudos *ex vivo*)

2.4.1 Preparação dos dentes

Para avaliar a inativação da aPDT em modelos *ex vivo*, foram usados os dentes humanos extraídos em consulta, na disciplina de Cirurgia VI e após a assinatura do consentimento informado dos pacientes. As exodontias realizaram-se através de técnica fechada, sendo que as peças dentárias em questão consistiam em dentes monorradiculares (incisivos) e plurirradiculares (molares). O uso destes dentes para investigação foi aprovado Comissão de Ética (CES) para a Saúde da Universidade Católica Portuguesa no âmbito do projeto “Avaliação de novos materiais e/ou compostos com atividade antimicrobiana e de novas metodologias para desinfeção intracanal em endodontia: um modelo *ex vivo*” (CES160/2021).

Os dentes foram inicialmente preparados e desinfetados e apenas sujeitos a contaminação com *E. faecalis* e *C. albicans*. Para a desinfecção, os dentes foram colocados numa placa de Petri esterilizada, pulverizados com etanol 70% e incubados por 15 min para reduzir o número de bactérias residentes. Após isso, a superfície dentária foi lavada com PBS esterilizado (10 min) para remover o excesso de etanol. Por fim, os dentes foram colocados sobre radiação ultravioleta (UV-C: 280-100 nm), com as placas abertas por 30 min.

Após a desinfecção, os dentes foram artificialmente contaminados com o respetivo microrganismo. Para isso, 200 µL de cada suspensão de *E. faecalis* ou *C. albicans*, previamente ajustadas a uma concentração de 10^8 UFC/mL, foi pulverizada por cada dente. Após secagem, 2 grupos de dentes (cada um constituído por 2 elementos) foram pulverizados com 10 µL de uma solução de fotossensibilizador a 20 e/ou 50 µM. Um grupo foi irradiado e outro foi usado como CE. Um grupo foi apenas pulverizado com as suspensões microbianas, que foi usado como Ct.

As amostras e os controlos foram incubados no escuro, de forma a promover a ligação do PS às células microbianas durante 30 min. Após este período as amostras e o Ct foram irradiados com luz azul (proveniente de um fotopolimerizador) durante vários intervalos de tempo, que foram ajustados ao longo das experiências (0, 5, 10, 20 minutos). O CE foi mantido no escuro, durante toda a experiência.

Entre os intervalos de irradiação foram retirados dois dentes de cada grupo, e colocados em tubos contendo PBS. Estes tubos foram sonicados de forma a destacar os microrganismos aderidos na superfície do dente. Após este processo, alíquotas de 100 µL das amostras e do controlo, diluídas em série em PBS e plaqueadas em placas de Petri contendo meio agarizado adequado para cada microrganismo. As placas foram incubadas a 37°C durante 18-24h. As UFC foram contadas nas diluições adequadas e a concentração das células será expressa como Log_{10} UFC/mL. Foram realizados 2 ensaios independentes.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média de pelo menos 2 ensaios independentes com 2 réplicas por ensaio e a respetiva média \pm desvio padrão. No caso dos ensaios realizados nos dentes com a *C. albicans*, foi realizado apenas um ensaio com 2 réplicas. A significância da concentração de microrganismos entre as diferentes condições e ao longo dos experimentos foi avaliada pela análise de variância ANOVA (2D) e foi usado o teste de Tukey de comparações múltiplas. A significância das diferenças foi avaliada comparando os resultados obtidos nas amostras entre si e com os resultados obtidos para as amostras de controlo e controlo escuro nos diferentes tempos. O valor de $p < 0,0001$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Ensaio de fotoinativação em PBS (estudos *in vitro*)

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* da fotoinativação de *C. albicans* usando a Proto IX a 10 μM e 20 μM , são apresentados na Figura 2 e 3, respetivamente. Os resultados mostram que a ProtoIX é eficaz na inativação da *C. albicans*, mas a sua eficiência depende da concentração e do tempo de irradiação. Foi possível ainda verificar que não ocorreram variações significativas na viabilidade do fungo nos controlos realizados (Ct e CE), mostrando que nem as condições de irradiação nem a presença do PS afetam a viabilidade da *C. albicans*.

Os resultados mostram que, na presença de 10 μM de ProtoIX e após 10 min de irradiação com o fotopolimerizador não é possível observar diminuição da concentração do microrganismo (Figura 2). No entanto, após 20 min de irradiação é possível observar um decréscimo na viabilidade deste fungo de 1,23 Log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,0001$) (Figura 2).

De forma a aumentar a taxa de fotoinativação da *C. albicans*, a concentração do PS foi aumentada para 20 μM (Figura 3). Os resultados mostram que, após 10 min de irradiação, ocorre um decréscimo de 2,13 Log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,0001$) na sobrevivência do fungo. Este decréscimo é ainda mais acentuado após 20 min de irradiação, onde a concentração de *C. albicans* sofreu um decréscimo de cerca de 3,99 Log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,0001$).

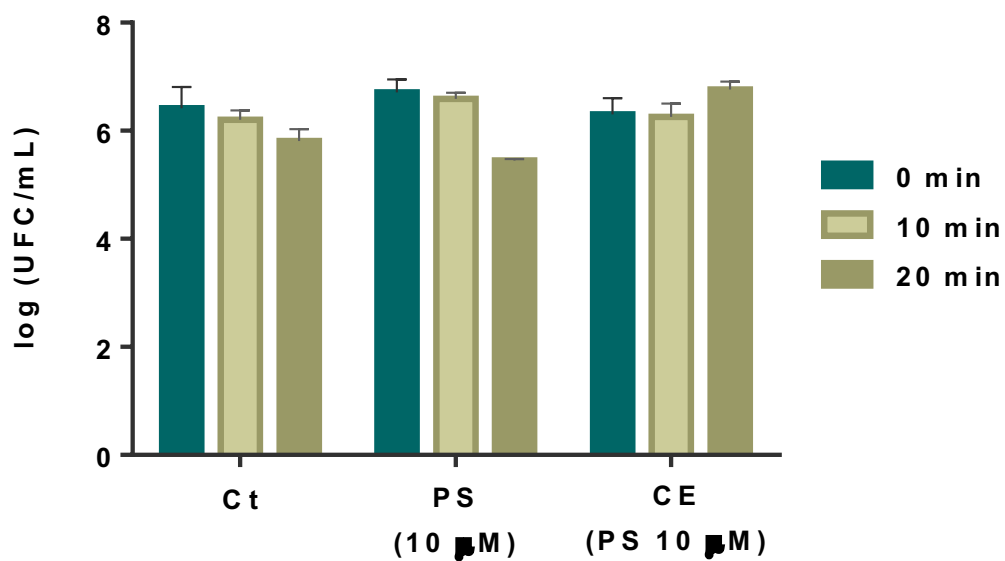


Figura 2. Fotoinativação do fungo *C. albicans*, incubado com Proto IX a 10 μM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 10 e 20 min em PBS. Os valores são expressos como a média de 2 ensaios independentes com 2 replicados; barras de erro representam o desvio padrão (DP) entre ensaios.

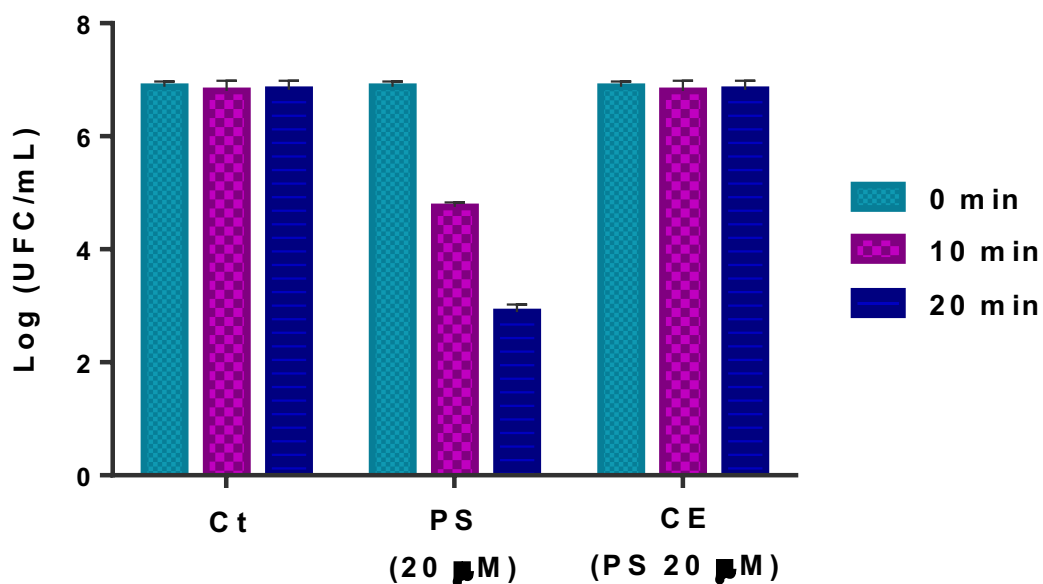


Figura 3. Fotoinativação do fungo *C. albicans*, incubado com Proto IX a 20 µM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 10 e 20 min em PBS. Os valores são expressos como a média de 2 ensaios independentes com 2 replicados; barras de erro representam o DP entre ensaios.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* da fotoinativação de *E. faecalis* usando o Proto IX a 20 µM, com tempos de irradiação de 10 e 20 minutos são apresentados na Figura 4. Os resultados mostram que a ProtoIX é eficaz na inativação da *E. faecalis*, mas a sua eficiência depende da concentração e do tempo de irradiação. Foi possível ainda verificar que não ocorreram variações significativas na viabilidade da bactéria nos controlos realizados (Ct e CE), mostrando que nem as condições de irradiação nem a presença do fotossensibilizador afetam a viabilidade da *E. faecalis*.

Desta forma, na presença de 20 µM de ProtoIX e após 10 min de irradiação com o fotopolimerizador, é possível observar diminuição da concentração do *E. faecalis* de 6,94 Log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,0001$) (Figura 4). Além disso, após 20 min de irradiação é possível observar um decréscimo até ao limite de deteção da metodologia na viabilidade desta bactéria (Figura 4).

De forma a verificar eficiência de inativação com tempos de irradiação inferiores, o tempo de irradiação foi diminuído para 5 e 10 minutos (Figura 5). Os resultados mostram que, após 5 min de irradiação, ocorre um decréscimo de 4,36 Log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,0001$) na sobrevivência da bactéria. Após 10 min de irradiação, ocorre um decréscimo de 6,63 Log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,0001$) na sobrevivência do *E. faecalis*. (Figura 5)

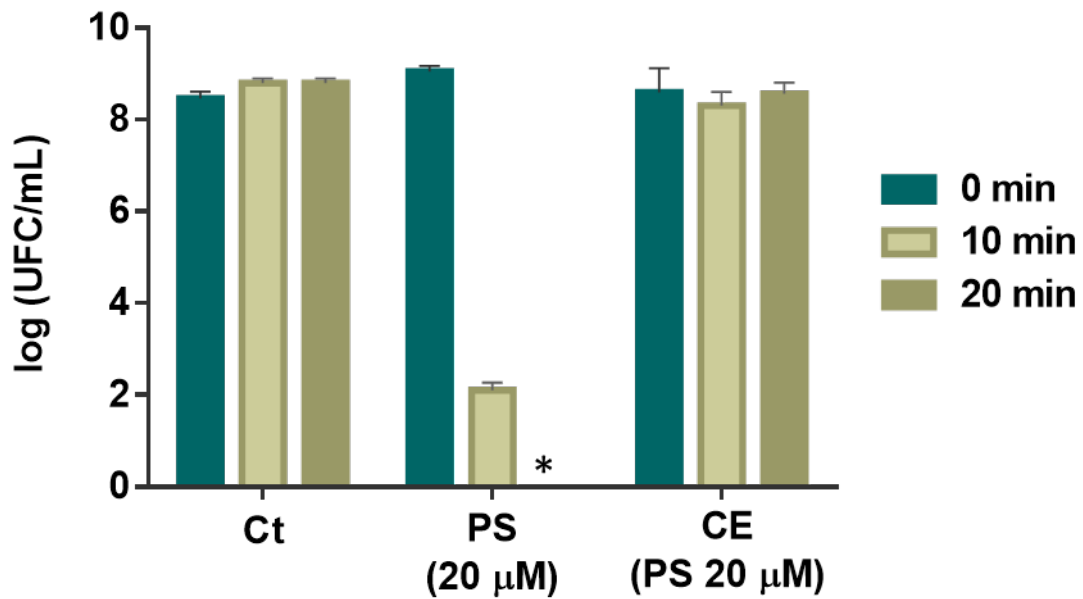


Figura 4. Fotoinativação da bactéria *E. faecalis*, incubado com Proto IX a 20 μM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 10 e 20 min em PBS. Os valores são expressos como a media de 2 ensaios independentes com 2 replicados; barras de erro representam o DP entre ensaios. * Não foi possível contar UFC.

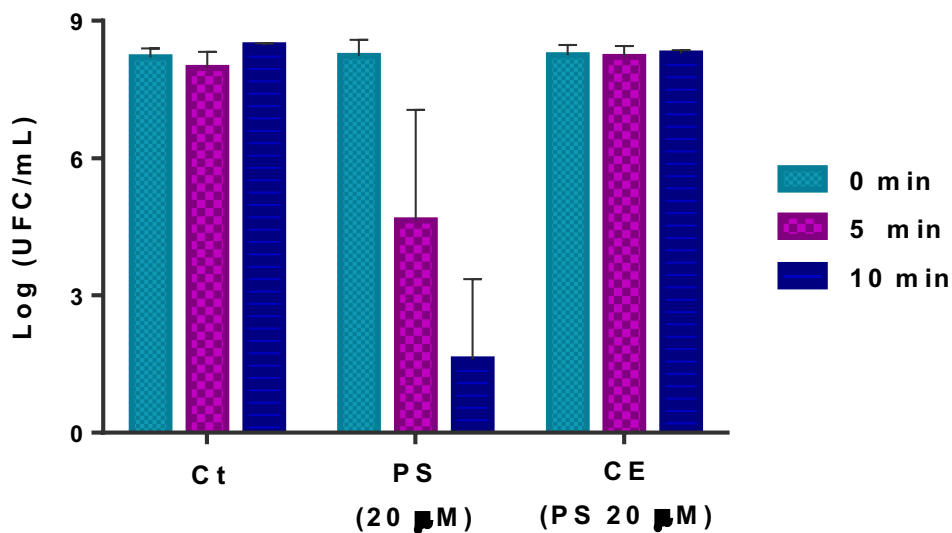


Figura 5. Fotoinativação da bactéria *E. faecalis*, incubado com Proto IX a 20 μM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 5 e 10 min em PBS. Os valores

são expressos como a média de 2 ensaios independentes com 2 replicados; barras de erro representam o DP entre ensaios.

3.2 Ensaios de fotoinativação em dentes (estudos *ex vivo*)

Após a realização dos estudos *in vitro* da fotoinativação da *C. albicans*, onde se verificou que este fungo foi eficientemente inativado usando a ProtoIX a 20 µM como PS e o fotopolimerizador como fonte de luz, procedeu-se ao estudo *ex vivo* da fotoinativação deste fungo em dentes. Para tal foram usadas as melhores condições de irradiação e concentração de ProtoIX encontradas nos ensaios *in vitro*, isto é, 20 minutos de irradiação e 20 µM de ProtoIX. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6 e mostram que, tal como nos ensaios *in vitro*, não ocorreram variações significativas na viabilidade do fungo nos controlos realizados (Ct e CE), mostrando que nem as condições de irradiação nem a presença do fotossensibilizador afetam a viabilidade da *C. albicans*. Porém, também não foi possível observar qualquer decréscimo na sobrevivência da *C. albicans* quando incubada com a ProtoIX e irradiada com o fotopolimerizador.

De forma a aumentar a taxa de fotoinativação da *C. albicans*, a concentração da ProtoIX foi aumentada para 50 µM (Figura 7). Os resultados mostram que, após 20 minutos de irradiação, ocorre um ligeiro decréscimo de 0,84 Log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,0001$) na sobrevivência deste fungo.

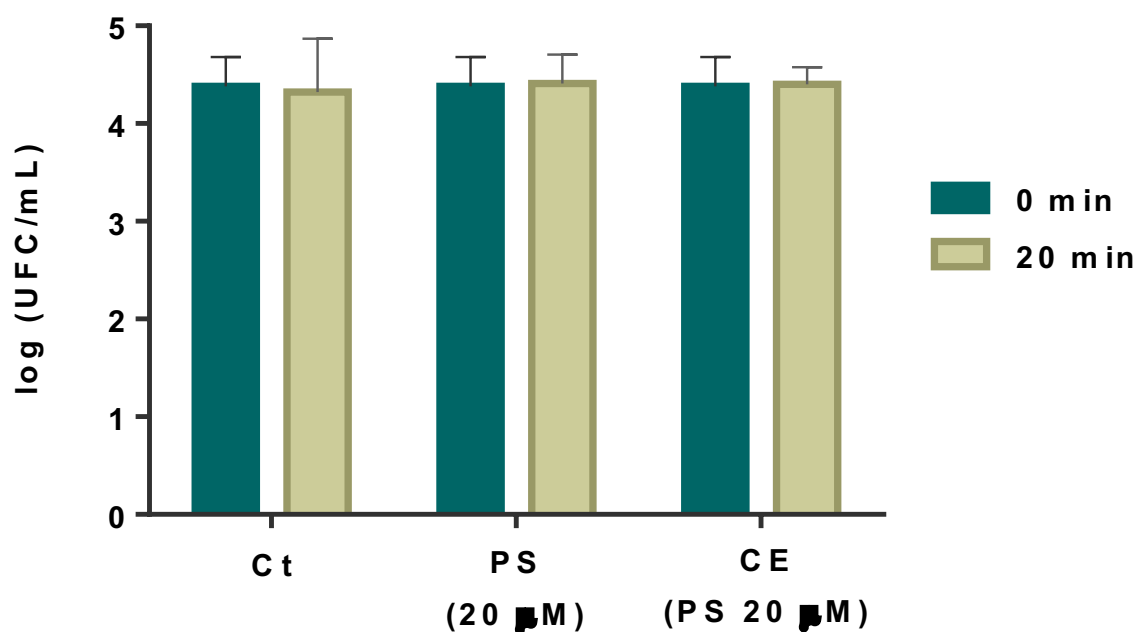


Figura 6. Fotoinativação do fungo *C. albicans*, incubado com Proto IX a 20 μM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 0 e 20 min. Os valores são expressos como a média de 2 ensaios independentes com 2 replicados; barras de erro representam o DP entre ensaios.

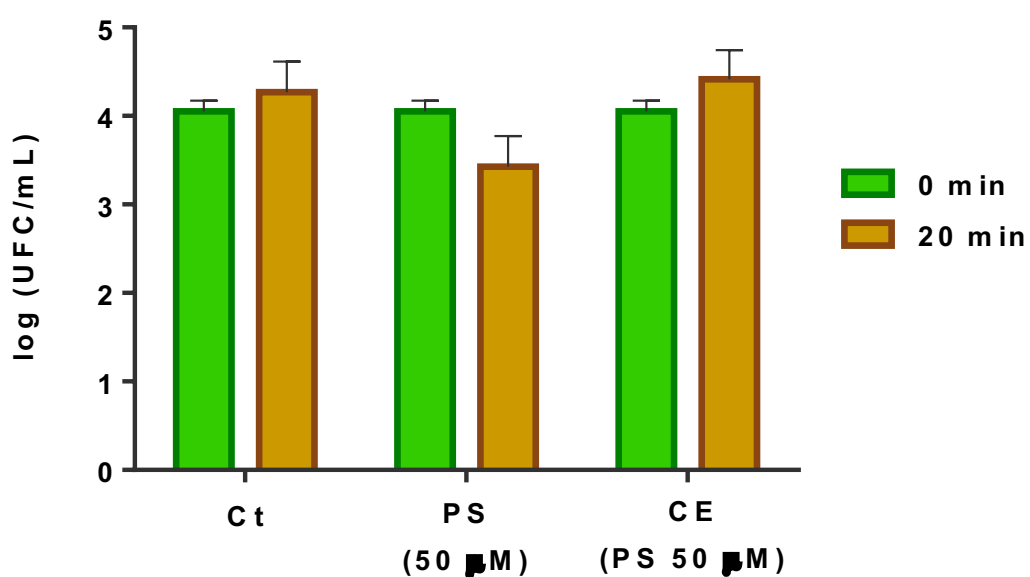


Figura 7. Fotoinativação do fungo *C. albicans*, incubado com a Proto IX a 50

μM e irradiado com luz azul do fotopolimerizador por 0 e 20 min. Os valores são expressos como a media de 2 ensaios independentes com 2 replicados; barras de erro representam o DP entre ensaios.

Tendo em conta a baixa taxa de fotoinativação da *C. albicans* em dentes utilizando este protocolo de aPDT e a escassez de tempo para encontrar soluções para aumentar a eficiência desta terapia, não foram realizados mais ensaios em dentes.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O grande objetivo deste estudo foi estudar a eficiência da aPDT como terapia na doença periodontal, através da realização de estudos, *in vitro* e *ex vivo* em dentes, de inativação dos microorganismos periodontopagênicos *C. albicans* e *E. faecalis*, usando a ProtoIX como PS e o fotopolimerizador como fonte de luz.

Existem muitos estudos sobre a aPDT neste campo, mas utilizam outro tipo de fotossensibilizadores e fontes de luz. (11,20) Neste trabalho, foi possível verificar que aPDT, usando porfirinas como PS e o fotopolimerizador como fonte de luz, é eficiente na inativação dos microorganismos *C. albicans* e *E. faecalis*.

Os ensaios *in vitro* tiveram como objetivo verificar se os agentes periodontopatogênicos escolhidos eram suscetíveis a esta terapia. Nos primeiros ensaios *in vitro* foi estudado o efeito fotodinâmico da ProtoIX a 10 µM na inativação do fungo *C. albicans*, onde foi possível verificar que com esta concentração apenas ocorreu uma ligeira diminuição da viabilidade do fungo.

De forma a aumentar a taxa de fotoinativação da *C. albicans* a concentração da ProtoIX foi aumentada para 20 µM, concentração onde se verificou que houve diminuição significativa na viabilidade deste fungo após 10 e 20 min de irradiação.

Com estes resultados, é possível concluir que a *C. albicans* é suscetível à aPDT usando a ProtoIX como PS e o fotopolimerizador como fonte luz.

No que toca aos ensaios *in vitro* com *E. faecalis*, fomos também verificar se a bactéria era suscetível à técnica de aPDT. Como foi anteriormente verificado no ensaio *in vitro* de fotoinativação da *C. albicans* que a concentração mais eficaz de PS foi com 20 µM, os ensaios foram realizados apenas com esta concentração. Conferimos que, com esta concentração e após 20 minutos de irradiação, ocorreu a inativação total desta bactéria. De forma a verificar se tempos menores de irradiação eram igualmente eficazes na inativação da *E. faecalis*, foram realizados estudos com menores tempos de irradiação. Verificou-se que eram igualmente observadas elevadas taxas de inativação desta bactéria. Estes resultados permitem concluir que a *E. faecalis* é mais suscetível à aPDT do que a *C. albicans*.

Após o estudo *in vitro* das melhores condições de fotoinativação da *C. albicans* e do *E. faecalis*, foram realizados estudos *ex vivo* da fotoinativação em dentes. Inicialmente foram realizados os estudos de fotoinativação da *C. albicans* usando as melhores condições de irradiação e concentração de ProtolX encontradas nos ensaios *in vitro*, isto é, 20 minutos de irradiação e 20 μM de ProtolX.

Os resultados deste estudo *ex vivo* mostraram que não foi possível inativar a *C. albicans* em dentes. Mesmo após o aumento da concentração do fotossensibilizador para 50 μM , a redução da viabilidade do fungo foi ligeira. Este facto pode ser devido à matriz do dente que, por ser demasiada complexa, não permite a difusão eficiente das espécies reativas de oxigénio que se produzem no processo da PDT.

Tal como foi referido anteriormente, são escassos os artigos científicos estudando o efeito fotossensibilizador das porfirinas conjugados com o uso do fotopolimerizador no tratamento da periodontite.

De acordo com a literatura disponível, é possível verificar a eficácia da aPDT na inativação de microorganismos prevalentes na doença periodontal. (21,22)

Prasanth et al. 2014, estudaram o efeito fotodinâmico utilizando as porfirinas catiónicas meso- substituída com grupos imidazole (ImP) e a porfirina meso- substituída por grupos piridinium (PyP), sobre as bactérias *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) (Gram-negativo), *E. faecalis* (Gram-positivo) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) (Gram-negativo), com uma fonte de luz de comprimento de onda de 637nm. Foi possível verificar que a PyP, a uma concentração de 22 μM não apresentava toxicidade no escuro, ao contrário da ImP, que apresentava toxicidade em todas as concentrações (2-22 μM). Relativamente à inativação das bactérias, os autores mostraram que, com uma concentração de 2 μM de ImP, ocorre a inativação *E. faecalis*. Nas bactérias de Gram-negativo, a PyP a 5 μM permitiu a inativação completa da *A.a* e *F. nucleatum*.

Comparando estes resultados e o resultado obtido neste trabalho é possível verificar que porfirinas são, regra geral, compostos não tóxicos, nas concentrações testadas. É possível também verificar que as porfirinas são

capazes de fotoinativar bactérias periodontopatogénicas. Além disso, é legítimo afirmar que existe uma lógica de proporcionalidade, no que toca à quantidade de concentração de PS, ou seja, usando maior concentração, é induzido um efeito fotodinâmico mais eficaz. Apesar disso, no trabalho de *Prasanth et. al.* foram utilizados dois PSs, sendo que ambos são catiónicos. Em adição, foram utilizadas bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo, ao passo que no nosso estudo foi utilizada uma bactéria de Gram-positivo. O que se pretende afirmar é que, apesar das semelhanças e dos pontos em comum, que permitem estabelecer pontos de consenso entre os resultados obtidos em ambos os estudos, há algumas variáveis diferentes, que têm a sua quota parte na influência dos resultados recolhidos.

Song et al. estudaram o efeito fotodinâmico do PS aniónico sinoporfirina de sódio (DVDMS) sobre a *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), bactéria de Gram-negativo, irradiada com uma fonte de luz LD, cujo comprimento de onda é de 390-400 nm. (22) Este estudo mostrou que a DVDMS promove uma inativação eficaz na bactéria periodontopatogénica em concentrações superiores a 10 µM.

Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho e comparando com o estudo descrito por *Song et al.* é possível constatar, mais uma vez, a potencialidade do uso de porfirinas como PSs no tratamento de infeções orais, como a periodontite.

Portanto, tal como foi referido, em contexto de ensaios *in vitro*, foi possível retirar alguns pontos de contacto em termos de resultados obtidos. Efetivamente, é relevante acrescentar que a escassa literatura existente se foca apenas em ensaios *in vitro*, contrariamente à nossa produção científica, que realizou ensaios *ex vivo*, além dos ensaios *in vitro*. Invariavelmente, isso pode ser considerado como algo inovador e um avanço em termos de evidência científica, visto que através de ensaios *ex vivo* é possível simular com maior precisão a realidade na cavidade oral, em ambiente clínico.

Porém, é importante referir que no futuro será necessário otimizar o procedimento laboratorial, de forma a obter resultados mais eficientes, nomeadamente nos ensaios *ex vivo*. Essa otimização poderá passar por testar

concentrações mais elevadas de PS, garantindo sempre que essa concentração não possuía potencial tóxico. Também se poderá ponderar a utilização de PSs catiónicos, visto que estes apresentam um efeito fotodinâmico geralmente mais eficaz na inativação de bactérias e fungos. (16) Seguidamente, após ter sido obtido maior evidência científica em laboratório, sobre a abordagem mais eficiente deste protocolo de aPDT (usando porfirinas como PSs e o fotopolimerizador como fonte de luz), seria pertinente realizar estudos em ambiente clínico, com pacientes de forma a obter maior fundamento científico. Não esquecer que a aPDT já é utilizada como técnica adjuvante da terapia periodontal básica e da RAR, com resultados que revelam ter boas perspectivas de futuro (13), porém utilizam componentes distintos deste estudo científico (outros PSs e outras fontes de luz). Visto que este trabalho assenta sobre um tipo de procedimento inovador, é essencial esse estudo em ambiente clínico, de forma a sustentar com evidência científica a pertinência clínica deste novo procedimento, do qual temos bons indicadores *in vitro*.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Este estudo comprova a elevada potencialidade da aPDT para a inativação de microrganismos periodontopatogénicos usando a ProtoIX como PS e o fotopolimerizador como fonte de luz. No entanto, mais estudos deverão ser realizados de forma a otimizar este protocolo para a sua aplicação em ambiente clínico. Os resultados obtidos nos estudos *in vitro* permitem concluir que a Proto IX a 20 µM é eficiente na inativação da *C. albicans* e do *E. faecalis* quando irradiados como fonte de luz azul, com comprimento de onda de 385-515 nm.

No entanto, mais estudos deverão ser realizados de forma a otimizar este protocolo de aPDT para a sua aplicação em ambiente clínico.

Por fim, é de enfatizar as boas perspetivas relativamente a esta abordagem clínica, visto que, apesar de inovadora, logo, com escassa literatura relacionada, configura-se como um procedimento clínico promissor.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA:

1. Michaud DS, Fu Z, Shi J, Chung M. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk. *Epidemiologic Reviews*. 2017 Jan 1;39(1):49–58.
2. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Vol. 3, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2017.
3. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. Vol. 75, *Periodontology 2000*. Blackwell Munksgaard; 2017. p. 7–23.
4. Kumar S. Evidence-Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis. Vol. 63, *Dental Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2019. p. 69–81.
5. Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000*. 2014 Jun;65(1):13–26.
6. G. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, S. Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018 Jun 1;45:S1–8.
7. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 Jun 1;89:S159–72.
8. van der Weijden GA, Dekkers GJ, Slot DE. Success of non-surgical periodontal therapy in adult periodontitis patients: A retrospective analysis. *International Journal of Dental Hygiene*. 2019 Nov 1;17(4):309–17.
9. Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS, Gruwell SF, Powell CA. Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. 2016.
10. da Costa LFNP, Amaral C da SF, Barbirato D da S, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. Vol. 148, *Journal of the American Dental Association*. American Dental Association; 2017. p. 308–18.
11. Moro MG, de Carvalho VF, Godoy-Miranda BA, Kassa CT, Horliana ACRT, Prates RA. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT)

- for nonsurgical treatment of periodontal disease: a systematic review. Vol. 36, *Lasers in Medical Science*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 1573–90.
12. Diogo P, Faustino MFA, Neves GMPMS, Palma PJ, Baptista IP, Gonçalves T, et al. An insight into advanced approaches for photosensitizer optimization in endodontics—a critical review. *Journal of Functional Biomaterials*. 2019 Dec 1;10(4).
 13. Zhao P, Song X, Nie L, Wang Q, Zhang P, Ding Y, et al. Efficacy of adjunctive photodynamic therapy and lasers in the non-surgical periodontal treatment: A Bayesian network meta-analysis. Vol. 32, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V.; 2020.
 14. Santos AR, Batista AFP, Gomes ATPC, Neves M da GPMS, Faustino MAF, Almeida A, et al. The remarkable effect of potassium iodide in eosin and rose bengal photodynamic action against salmonella typhimurium and staphylococcus aureus. *Antibiotics*. 2019 Dec 1;8(4).
 15. Batalha PN, Gomes ATPC, Forezi LSM, Costa L, de Souza MCBV, Boechat FDCS, et al. Synthesis of new porphyrin/4-quinolone conjugates and evaluation of their efficiency in the photoinactivation of *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*. 2015 Aug 14;5(87):71228–39.
 16. Vieira C, Gomes ATPC, Mesquita MQ, Moura NMM, Neves GPMS, Faustino AF, et al. An insight into the potentiation effect of potassium iodide on APDT efficacy. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Nov 19;9(NOV).
 17. Sousa V, Gomes ATPC, Freitas A, Faustino MAF, Neves MGPMS, Almeida A. Photodynamic inactivation of candida albicans in blood plasma and whole blood. *Antibiotics*. 2019 Dec 1;8(4).
 18. Vieira C, Santos A, Mesquita MQ, Gomes ATPC, Neves MGPMS, Faustino MAF, et al. Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: Effectiveness on bacteria and fungi planktonic/biofilm forms and viruses. In: *Porphyrin Science By Women (In 3 Volumes)*. World Scientific Publishing Co.; 2020. p. 290–301.
 19. Braz M, Salvador D, Gomes ATPC, Mesquita MQ, Faustino MAF, Neves MGPMS, et al. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus on skin using a porphyrinic formulation.
Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2020 Jun 1;30.
20. Świder K, Dominiak M, Grzech-Leśniak K, Matys J. Effect of different laser wavelengths on periodontopathogens in peri-implantitis: A review of in vivo studies. Vol. 7, Microorganisms. MDPI AG; 2019.
 21. Prasanth CS, Karunakaran SC, Paul AK, Kussovski V, Mantareva V, Ramaiah D, et al. Antimicrobial Photodynamic Efficiency of Novel Cationic Porphyrins towards Periodontal Gram-positive and Gram-negative Pathogenic Bacteria. Photochemistry and Photobiology. 2014 May;90(3):628–40.
 22. Song Y, Lin J, Zhang Z, Xu B, Bi L. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using sinoporphyrin sodium and 390–400 nm light-emitting diode on Porphyromonas gingivalis in vitro. Lasers in Medical Science. 2021 Feb 3;36(1):153–64.

7. ANEXOS

7.1 Parecer sobre o projeto nº 160



Parecer sobre o projeto nº 160
Comissão de Ética para a Saúde da Universidade Católica Portuguesa
Mandato 2019/2023

Projeto de Investigação Na reunião do dia 23 de setembro de 2021, a CES-UCP esteve reunida e apreciou do ponto de vista ético os elementos submetidos pela investigadora principal. Após apreciação redige o seguinte parecer.
Título: Avaliação de novos materiais e/ou compostos com atividade antimicrobiana e de novas metodologias para desinfeção intracanal em endodontia: um modelo <i>ex vivo</i> .
Investigadora Principal: Rita Brandão de Pinho Noites Equipa de investigação: Ana Sofia Duarte; Ana Peixoto Gomes Todas da Faculdade de Medicina Dentária da UCP, Viseu.
Resumo: Justificação No âmbito da endodontia, a integridade do complexo dentino-pulpar pode ser comprometida devido a diversos fatores, externos ou internos como é o caso de traumatismos ou o caso de patologias pulpares respetivamente, contudo, nas diversas situações este comprometimento é devido à infeção por microrganismos. A irrigação é parte essencial de um tratamento endodóntico radical bem-sucedido, pois cumpre várias funções mecânicas, químicas e (micro) biológicas importantes. A irrigação também é a única forma de aceder às áreas da parede do canal radicular que não são alcançadas por instrumentação mecânica, assim sendo é de elevada importância a pesquisa constante de novos irrigantes, de forma a encontrar aquele que satisfaça de melhor forma as necessidades terapêuticas, de modo a diminuir valores de citotoxicidade e genotoxicidade elevados. Objetivos Este estudo tem como objetivo testar novos materiais irrigantes endodónticos, compostos e/ou metodologias de desinfeção em dentes que tenham sido extraídos, por diferentes razões clínicas, visando a sua aplicação futura e segura em tratamentos endodónticos. A biocompatibilidade e segurança das estratégias antimicrobianas desenvolvidas será previamente estudada através de ensaios <i>ex vivo</i> . Será ainda considerada o estudo de outras metodologias para a desinfeção intracanal como é o caso da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Local e participantes A componente experimental do estudo irá ser realizada no SalivaTec, Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde (CIIS), integrante da U C P – Viseu. Participantes: “Dentes superiores e inferiores com canal radicular único (incisivos, caninos e pré-molares) que que possuam ápices completamente formados, e que tenham sido extraídos por razões clínicas como doença periodontal ou motivos ortodónticos”. Não estão incluídos nem menores, nem grupos vulneráveis. Não se aplica a alínea de potenciais riscos / incómodos, assim como benefícios para os participantes, uma vez que não há contacto com pacientes, já que o estudo versa sobre dentes previamente extraídos. O projeto não é financiado, não foi submetido a outra Comissão de Ética, nem é necessário um seguro. Documentos apresentados: - Currículo académico de cada uma das investigadoras. - Projeto de investigação. - Cronograma. De janeiro de 2022 a 2023. Não tem data nem está assinado. - Declaração de que não há conflito de interesses.

- Modelo de autorização do dador, feito em duplicado, um exemplar para a investigadora e outro para a pessoas que consente.
- Declaração de confidencialidade dos dados obtido. O estudo “não irá tratar dados de nenhum paciente, no entanto todos os dentes recolhidos serão usados exclusivamente para o estudo em questão. Após o término do estudo todos os dentes recolhidos serão destruídos. O projeto final a tornar público não conterá nenhuma referência que permita a identificação dos participantes”.
- Autorização da Diretora Clínica da Clínica Dentária da FMD – UCP, para a recolha de dentes na clínica.
- Avaliação de impacto sobre a proteção de dados: Refere-se “o que está em vigor pela Comissão Europeia referente à AIPD e de acordo com a natureza do estudo em causa: “um médico da comunidade que efetua o tratamento dos dados pessoais dos seus doentes. Neste caso, não é necessário realizar uma AIPD, uma vez que o tratamento efetuado pelos médicos comunitários não é efetuado em grande escala caso o número de doentes seja limitado”.

Estiveram presentes na reunião nº 32 da CES-UCP


Presidente: Doutora Mara de Sousa Freitas
Vice-Presidente: Doutora Teresa Marques
Doutor Jerónimo Santos Trigo
Doutor Pedro Garcia Marques
Dr. Eugénio Fonseca
Doutora Marta Brites

Conclusão

Ouvido o Relator, e o plenário da reunião de 23 de setembro de 2021, realizada por videoconferência, esta CES delibera, por unanimidade, emitir **Parecer Favorável**. Notamos apenas que o cronograma deve estar datado e assinado, o que solicitamos que seja efetuado.

Esta CES solicita à Investigadora Principal que, aquando da conclusão do estudo, lhe seja enviada uma síntese dos resultados obtidos e respetivas conclusões, via eletrónica, para o correio eletrónico da CES UCP.

A Presidente,



Mara de Sousa Freitas
23/09/2021