



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

MARIA DAS GRAÇAS BARBOSA DA SILVA

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DE
INFECÇÃO SISTÊMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
Galleria mellonella

CAMPINA GRANDE/PB

2024

MARIA DAS GRAÇAS BARBOSA DA SILVA

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DE
INFECÇÃO SISTÊMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
*Galleria mellonella***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Estadual da
Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

CAMPINA GRANDE/PB

2024

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586t Silva, Maria Das Graças Barbosa da.

Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de infecção sistêmica em modelo experimental de *Galleria mellonella* [manuscrito] / Maria Das Graças Barbosa da Silva. - 2024.

79 p. : il. colorido.

Digitado. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024. "Orientação : Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS. "

1. Fotoquimioterapia. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Antibacterianos. 4. Resistência Microbiana a Medicamentos.

I. Título

21.ed. CDD 617.6

MARIA DAS GRAÇAS BARBOSA DA SILVA COSTA

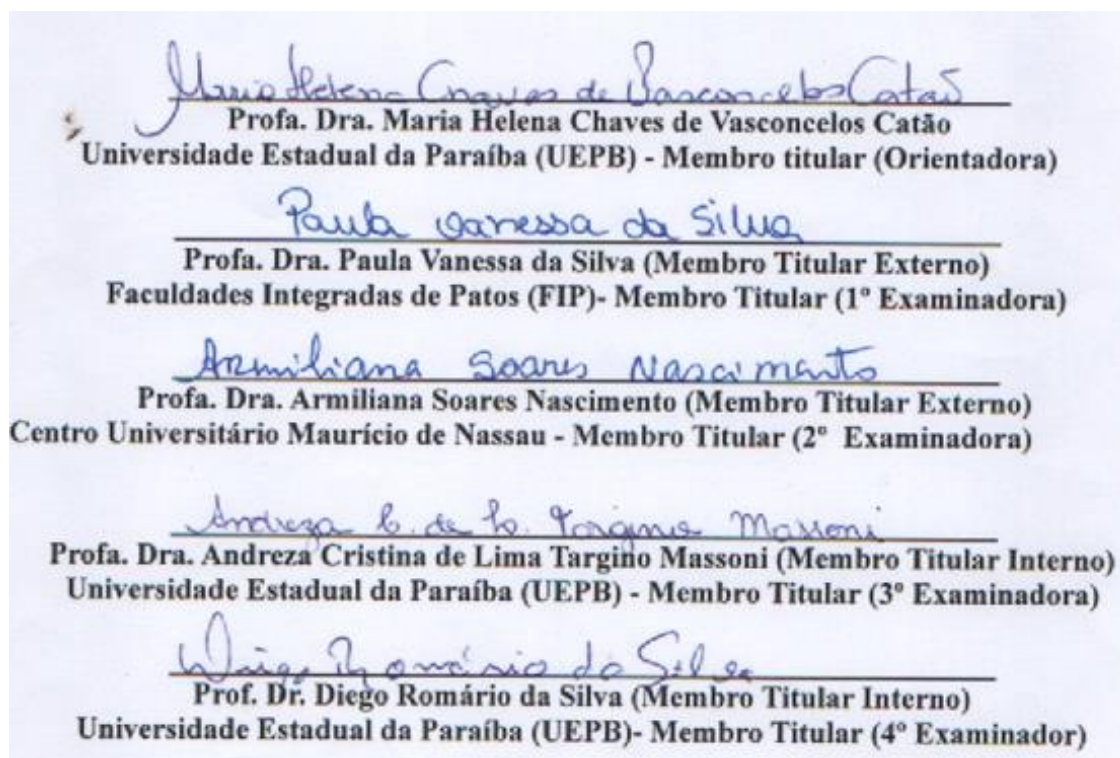
**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DE
INFECÇÃO SISTÊMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE *Galleria mellonella***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Estadual da
Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

DATA DA DEFESA: 31/07/2024

BANCA EXAMINADORA



*A João Rafael, pelas ausências provocadas
para a construção desta tese*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por sempre me guiar, cuidar e amparar. Por me ajudar a ser fiel, ainda que nas pequenas coisas, pela certeza indubitável de que É comigo e que sua misericórdia é sem fim. A Nossa Senhora da Conceição, minha grande intercessora, por sempre se antecipar aos meus passos e nunca permitir que o vinho falte.

A Maria Auxiliadora, minha mãe, a mulher mais guerreira que conheço, por me permitir crescer cercada de privilégios e oportunidades, por acreditar mais em mim do que eu mesma, por todo amor e incentivo.

A Valdomiro Ezequiel (*in memoriam*), meu pai, de quem guardo no coração tanta saudade, mas que a uso como mola propulsora para ser sempre uma pessoa íntegra e generosa como o senhor foi.

A João Rafael, meu filho, por trazer novo sentido à vida, por colorir meus dias, por dar ânimo novo para ir em busca de novas conquistas. Ainda que, vez por outra, sejamos tomados pelas ausências provocadas durante a travessia, no fim, sempre iremos compensar com muitos abraços, beijinhos e presença.

A Renato Feitosa, pelo companheirismo e parceria, por todo incentivo, para que eu sempre seja minha melhor versão, por ser minha grande rede apoio, por cuidar tão bem do nosso filho e me permitir ter a calma necessária para concluir mais essa estapa.

Ana Flávia, Anna Kellvya, Anna Kellssya e José Kleanto, meu núcleo familiar, por todo incentivo e motivação nos momentos de desânimo, pela fé incondicional e a certeza de que dias melhores sempre estão por vir. “Se é pra lutar, é pra vencer!”.

A Nanna (*in memoriam*), minha vó, por cuidar de mim, me ensinar a ter uma fé, pela fortaleza que sempre foi.

Aos meus tios e primos que lançaram a base sólida em que se encontra nossa família e pela vibração a cada conquista. Segue mais uma doutora com o padrão Barbosa de ser.

A Dom Marcelo Pinto Carvalheira (*in memoriam*) e a Pe. Cristiano Muffler (*in memoriam*), pela paternidade e cuidado que tiveram comigo quando da partida de meu pai e pelo incentivo aos estudos iniciais.

A querida Sofia Hiluey, por toda ajuda, parceria gentileza e carinho comigo. Pelo seu zelo, cuidado e paciência em todas as etapas do experimento. Espero que colhamos bons frutos desse período.

A Professora Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, por me acolher e por me presentear com ensinamentos, orientações e oportunidades, pela sua maternidade que me

alcançou. Por não desistir da orientação quando da gravidez e, ao contrário, me dar o tempo necessário para me refazer e descobrir uma nova versão minha. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Diego Romário da Silva, por todo direcionamento, acompanhamento, por me apresentar a área da microbiologia e ter toda paciência em me fazer compreender os mínimos detalhes de todas as etapas laboratoriais.

A Prof. Dra. Paula Vanessa da Silva, pela disponibilidade em se fazer presente com suas contribuições nesse momento tão valoroso e por ser um modelo de profissional a quem tantos se espelham.

A Prof. Dra. Andreza Cristina de Lima Targino Massoni, pela disponibilidade em prontamente contribuir com o aprimoramento dessa pesquisa.

A todo o Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, professores e funcionários, pela formação recebida, por toda disponibilidade, incentivo e motivação para que sejamos profissionais e pesquisadores capacitados.

RESUMO

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são particularmente difíceis de tratar devido à elevada taxa de resistência aos antibióticos, são patógenos oportunistas e importantes cepas hospitalares que podem ocasionar um quadro de doenças que variam de graus leves a graves, podendo chegar, inclusive, ao óbito. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) é um modelo alternativo promissor, com propriedades antimicrobianas, dependente de três fatores: luz, agente fotossensibilizador sensível à luz e moléculas de oxigênio do ambiente. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antibacteriana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento de infecção sistêmica em modelo experimental de *Galleria mellonella*. O estudo foi experimental *in vivo*, com observação direta em laboratório. Foram preparadas formas planctônicas de *Staphylococcus aureus* em concentrações letais, e as larvas de *G. mellonella* foram divididas em 6 grupos experimentais e cada grupo possuía 10 larvas. Para cada uma das formas após infecção com: 1. TFDa; 2. Laser vermelho; 3. Azul de Metileno; 4. Ceftriaxona; 5. Ceftriaxona + TFDa; 6. NaCl 0,9%. Após determinação da infecção e tratamento, as larvas foram observadas após as 4 primeiras horas e, posteriormente, em intervalos de 24 horas, durante 120 horas, para avaliação da curva de sobrevivência. Posteriormente, 3 larvas de cada grupo foram aleatoriamente escolhidas, maceradas, homogeneizadas e diluídas para plaqueamento. As placas foram incubadas por 24 horas e a quantidade de UFC foi contabilizada. A super infecção foi encontrada no inóculo de 10^9 . Após a observação das amostras de cada grupo, os resultados encontrados mostraram que para a curva de sobrevivência, os melhores resultados foram obtidos da terapia combinada entre ceftriaxona e TFDa, com melhores índices de sobrevida. Todos os grupos de tratamento demonstraram redução celular quando comparados ao grupo controle, com NaCl 0,9%. Portanto, os resultados apontam para um potencial do efeito bactericida *in vivo* da TFDa em infecção por *S. aureus*.

Palavras-chave: fotoquimioterapia; *Staphylococcus aureus*; antibacterianos; resistência microbiana a medicamentos.

ABSTRACT

Infections caused by *Staphylococcus aureus* are particularly difficult to treat due to the high rate of resistance to antibiotics. They are opportunistic pathogens and important hospital strains that can cause illnesses ranging from mild to severe, and can lead to death. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is a promising alternative model, with antimicrobial properties, dependent on three factors: light, light-sensitive photosensitizing agent and environmental oxygen molecules. The objective of this study was to evaluate the antibacterial action of aPDT in the treatment of systemic infection in an experimental model of *Galleria mellonella*. The study was experimental in vivo, with direct observation in the laboratory. Planktonic forms of *S. aureus* were prepared in lethal concentrations, and *G. mellonella* were divided into 6 experimental groups and each group had 10 larvae. For each of the forms after infection with: aPDT; Red laser; Methylene Blue; Ceftriaxone; Ceftriaxone + aPDT; NaCl 0.9%. After determining the infection and treatment, the larvae were observed after the first 4 hours and, subsequently, at intervals of 24 hours, for 120 hours, to evaluate the survival curve. Subsequently, 3 larvae from each group were randomly chosen, macerated, homogenized and diluted for plating. The plates were incubated for 24 hours and the amount of CFU was counted. Super infection was found in the inoculum of 10^9 . After observing the samples from each group, the results found showed that for the survival curve, the best results were obtained from the combined therapy between ceftriaxone and TFDa, with better survival rates. All treatment groups demonstrated cell reduction when compared to the control group, with NaCl 0,9%. Therefore, the results point to a potential in vivo bactericidal effect of TFDa in *S. aureus* infection.

Keywords: photochemotherapy; *Staphylococcus aureus*; anti-Bacterial agents; drug resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
Figura 1 –	Diferentes estágios de desenvolvimento da <i>Galleria mellonella</i>	17
Figura 2 –	Incubadora B.O.D.....	23
Figura 3 –	Preparo do inóculo de <i>S. aureus</i>	24
Figura 4 –	Inoculação em <i>Galleria mellonella</i>	24
Figura 5 –	Fluxograma com grupos experimentais considerando a aplicação de diferentes modelos de tratamento em larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>S. aureus</i>	25
Figura 6 –	Suporte para o laser (Vista Superior)	26
Figura 7 –	Suporte para o laser (Vista Frontal)	27
Figura 8 –	Maceração e Homogeneização das larvas	28
Figura 9 –	Plaqueamento com Ágar Sal Manitol	29

ARTIGO

Figura 1 –	Fluxograma com os diferentes grupos experimentais para o tratamento em modelo experimental de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>S. aureus</i>	35
Figura 2 –	Tratamento de infecção sistêmica por <i>S. aureus</i> com TFDa, LV, CFT, CFT+TFDa, NaCl 0,9%.....	38
Figura 3 –	Quantificação de células de <i>S. aureus</i>	38

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
EROs	Espécies Reativa de Oxigênio
LAD	Laboratório de Análises e Diagnóstico
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
mL	Mililitro
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
mW	miliwatts
nm	Nanometros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP2a	<i>Penicillin binding protein 2</i>
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VRSA	<i>Vancomycin Resistent Staphylococcus aureus</i>
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μM	Micrometro

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	14
1.3 <i>Galleria mellonella</i>	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 METODOLOGIA.....	21
3.1 Delineamento do estudo	22
3.2 Local de realização da pesquisa	22
3.3 Aspectos éticos.....	22
3.4 Microrganismos utilizados	22
3.5 Ensaio clínico em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	22
3.5.1 <i>Amostra</i>	22
3.5.2 <i>Análise da viabilidade de G. mellonella</i>	23
3.5.3 <i>Preparo do inóculo de S. aureus</i>	23
3.5.4 <i>Determinação dos níveis de infecção por S. aureus</i>	24
3.5.5 <i>Tratamento de infecção</i>	25
3.5.5.1 <i>Tratamento da infecção por S. aureus com TFDa</i>	25
3.5.5.2 <i>Tratamento da infecção por S. aureus com ceftriaxona</i>	27
3.5.5.3 <i>Tratamento de infecção por S. aureus com ceftriaxona e TFDa</i>	27
3.5.5.4 <i>Tratamento da infecção por S. aureus com laser vermelho</i>	27
3.5.5.5 <i>Tratamento de infecção por S. aureus com azul de metileno</i>	28
3.5.6 <i>Curva de Sobrevivência de G. mellonella</i>	28
3.5.7 <i>Quantificação de S. aureus na hemolinfa de G. mellonella</i>	28
3.6 Análise Estatística	29
4 ARTIGO	30
4.1 Apresentação	31
4.2 Artigo a ser submetido.....	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO PARA O PERIÓDICO PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY.....	55

1 Considerações Iniciais

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria amplamente conhecida que representa uma das espécies mais relevantes do ponto de vista médico de seu gênero, pertence a um grande grupo de cocos Gram-positivos, de 0,5–1,5 µm de diâmetro, dispostos em arranjos irregulares em forma de cachos de uva (Perez *et al.*, 2021). Embora façam parte da microbiota comensal humana, podem causar infecções que vão desde a superfície da pele até abscessos localizados, bem como infecções graves, como osteomielite, endocardite e outras doenças potencialmente fatais (Becker; Wardenburg, 2015).

Além disso, o *S. aureus* atua como um colonizador precoce, criando um ambiente favorável para a adesão e colonização de biofilmes (Graf *et al.*, 2019). Biofilmes são aglomerados de células microbianas envolvidas por uma matriz extracelular, os biofilmes funcionam como um casulo protetor e facilitam a adesão, proliferação e disseminação da infecção para o resto do corpo. As bactérias produtoras de biofilmes podem ser difíceis de erradicar, pois as infecções relacionadas ao complexo maxilofacial ou às cavidades ósseas podem durar longos períodos e dificultar terapias convencionais eficazes (Araújo *et al.*, 2018). Ademais, várias outras propriedades do envelope do *S. aureus* ajudam na sua capacidade de escapar do sistema imunológico, como a morte de neutrófilos (Mcguinness; Kobayashi; Deleo, 2016).

Nos últimos anos, a resistência das bactérias aos antibióticos emergiu como um problema significativo, onde as bactérias, incluindo o *S. aureus*, ganharam rápida e progressivamente resistência a múltiplos antibióticos. *S. aureus* pode apresentar resistência a múltiplos medicamentos à penicilina, meticilina, vancomicina e outros medicamentos (Mcguinness; Malachowa; Deleo, 2017).

A resistência a múltiplos medicamentos pode levar a infecções com terapias antibióticas frustradas ou ineficazes (Liu *et al.*, 2020). O escasso desenvolvimento de novos antibióticos somado ao aumento progressivo da multirresistência desta e de outras bactérias clinicamente relevantes tem sido considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das ameaças globais mais prementes à saúde humana no século XXI (Perez *et al.*, 2021).

S. aureus apresenta vários mecanismos de resistência a antibióticos. Por exemplo, a resistência à penicilina é mediada por beta-lactamases, enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico inativando o medicamento (Bondi Jr; Dietz, 1945).

A enzima beta-lactamase é codificada pelo gene *blaZ*, normalmente transmitido por plasmídeos como parte de um grande transposon. Atualmente, este gene é encontrado em mais de 90% dos isolados humanos de *S. aureus*, tornando o uso da penicilina pouco útil para tratar infecções (Peacock; Paterson, 2015). As bactérias produtoras de beta-lactamases continuam a ser sensíveis às combinações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamase, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, ou à combinação de cefalosporinas e carbapenêmicos (Morosini *et al.*, 2012).

Em 1959, a meticilina, um beta-lactâmico semissintético resistente à penicilinase, foi introduzida para uso clínico para tratar *S. aureus* resistente à penicilina, mas o primeiro relato de resistência foi produzido rapidamente em 1960 (Eriksen, 1961). A resistência à meticilina é independente da produção de beta-lactamase e não é transmitida por plasmídeos (Lakhundi; Zhang, 2018).

Este tipo de resistência é mediado pela aquisição do gene *mecA* que codifica uma proteína diferente de ligação à penicilina (PBP2a). O novo PBP2a diminui a afinidade do *S. aureus* pela meticilina e, portanto, permite-lhe sobreviver aos tratamentos com todos os seus derivados (WONG *et al.*, 2019). As cepas que expressam *mecA* são chamadas de cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *methicillin-resistant S. aureus*) (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

MRSA (do inglês: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) são cepas multirresistentes, resistentes a todos os beta-lactâmicos (exceto cefalosporinas de 5ª geração) e geralmente a aminoglicosídeos, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e rifampicina. Embora a colonização de MRSA em um indivíduo saudável geralmente não seja grave, pode ser fatal para pacientes com feridas profundas, cateteres intravenosos ou outros instrumentos invasivos, bem como infecções secundárias em pacientes com um sistema imunológico enfraquecido (Lakhundi; Zhang, 2018).

Os antibióticos de escolha para tratar infecções por MRSA são glicopeptídeos, como a vancomicina (Tenover; Biddle; Lancaster, 2001). Entretanto, *S. aureus* que apresenta concentração inibitória mínima (CIM) ≥ 16 mg/L (VRSA – do inglês: *Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus*) são resistentes aos glicopeptídeos (Morosini *et al.*, 2012). Isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à meticilina e vancomicina são significativamente desafiadores para o tratamento de infecções graves, como bacteremia, endocardite ou osteomielite (Mcguinness; Malachowa; Deleo, 2017; Giulieri; Tong; Williamson, 2020).

Devido à alta taxa de resistência exibida pelo *S. aureus*, existe um desafio em encontrar urgentemente novas abordagens antimicrobianas para tratar bactérias sem produzir resistência

aos antibióticos (Kashef; Hamblin, 2017; Walter *et al.*, 2020). Nesse sentido, diversas novas estratégias foram desenvolvidas, como nanopartículas metálicas, polímeros catiônicos, nanocarreadores, fototermoterapia e TFDa (Suresh; Biswas; Biswas, 2019).

1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

O princípio da terapia fotodinâmica (TFD) foi descoberto acidentalmente em 1900 pelo estudante de medicina Oscar Raab, em Munique, que estava desenvolvendo um estudo sobre a toxicidade do corante vermelho de acridina em *Paramecium* spp. como parte de sua tese de doutorado. Os resultados de seus experimentos usando vermelho de acridina em pequenas concentrações foram inconsistentes e não reproduzíveis, apesar de muitas repetições. No entanto, ele e seu supervisor, Hermann von Tappeiner reconheceram que a toxicidade observada dependia da hora do dia e da quantidade de luz do dia, uma vez que este era o único parâmetro variável. Mais tarde, von Tappeiner aplicou clinicamente esta abordagem com Albert Jesionek para o tratamento de carcinomas de pele e cunhou o termo “fenômeno fotodinâmico” (Cieplik *et al.*, 2018).

Jodlbauer e von Tappeiner em 1904 e Huber em 1905 foram os primeiros a descrever a inativação fotodinâmica bem-sucedida de bactérias. Embora a utilização da TFD (Terapia Fotodinâmica) no tratamento antineoplásico seja uma realidade clínica há pelo menos 25 anos, as aplicações antimicrobianas do processo fotodinâmico só foram redescobertas em resposta ao surgimento das primeiras infecções resistentes a medicamentos na área da saúde durante o início da década de 1990 (Cieplik *et al.*, 2018).

A TFD evoluiu ao longo dos anos com o desenvolvimento de fotossensibilizadores e metodologias mais complexas, resultando em avanços no tratamento de áreas como terapia neoplásica (Shi *et al.*, 2019), alívio de complicações de doenças autoimunes (Gallardo-Villagrán *et al.*, 2019), auxílio na cicatrização de feridas (Tardivo *et al.*, 2017; Oyama *et al.*, 2020) e controle ou eliminação de infecções virais, fúngicas e bacterianas nas formas planctônica ou de biofilme (Hu *et al.*, 2018).

O mecanismo por trás da ocorrência da reação fotodinâmica desejada depende de três componentes: luz, agente fotossensibilizador sensível à luz e moléculas de oxigênio do ambiente. O fotossensibilizador, irradiado com um comprimento de onda de luz compatível, converte-se do estado base singleto para o estado de saída singleto, depois converte para o estado base liberando energia absorvida ou com a ocorrência de um cruzamento intersistema,

ele passa por dois tipos de vias de produção de espécies reativas de oxigênio (Cieplik *et al.*, 2018).

Ambas as vias são dependentes de oxigênio (Castano; Demidova; Hamblin, 2005; Robertson; Evans; Abrahamse, 2009). Na primeira, um elétron é liberado para outros substratos, com outras moléculas ou estruturas celulares, resultando em radicais livres que produzem espécies reativas de oxigênio ao reagir com o oxigênio no estado tripleto. A segunda via ocorre pela transferência de energia diretamente do fotossensibilizador para as moléculas de oxigênio tripleto do estado base para serem convertidas para o estado singleto com características extremamente oxidantes (Hu *et al.*, 2018). Essas duas vias acontecem simultaneamente e a dominância de cada uma depende da concentração de oxigênio, das características do fotossensibilizador, do pH e da constante dielétrica do tecido (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Recentemente, um novo mecanismo foi proposto como via Tipo III, que é independente do oxigênio e não se limita ao espectro de luz visível. Este mecanismo pode ser encontrado em condições anaeróbicas e com fotossensibilizadores como psoralenos e tetraciclina e com adição de sais orgânicos como iodeto de potássio e azida de sódio (Abrahamse; Hamblin, 2020). Devido às diversas vias do metabolismo intracelular atingidas pelos agentes de espécies reativas de oxigênio, o desenvolvimento de resistência contra a TFDa é altamente improvável (Azaripour *et al.*, 2018), embora seja necessário considerar alterações no fator de virulência, adaptação ou fuga de microrganismos desses tratamentos à base de luz (Marasini; Leanse; Dai, 2021).

Os fotossensibilizadores podem ser ativados por diferentes fontes de luz. Para a ativação luminosa de um fotossensibilizador, três fontes principais de luz são descritas para o campo de TFDa na literatura até agora: *lasers* (do inglês: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, por exemplo, lasers dopados com argônio, diodo ou neodímio: lasers de ítrio, alumínio e granada), diodos emissores de luz (LEDs, do inglês: *Light-Emitting Diode*) e lâmpadas de descarga de gás (por exemplo, lâmpadas de quartzo-tungstênio-halogênio ou de descarga de xenônio) (Wilson; Patterson, 2008; Nagata *et al.*, 2012).

Os *lasers* são aplicados devido à sua monocromaticidade e não por suas outras propriedades (coerência, paralelismo, intensidade espacial estreita). Portanto, pode ser facilmente acoplado em uma única fibra óptica e montado em diferentes dispositivos de distribuição de luz. Comparados aos *lasers*, os LEDs oferecem um espectro de emissão um pouco mais amplo e seus custos são mais baixos (Wilson; Patterson, 2008). Em contraste com lasers e LEDs, as lâmpadas halógenas têm a vantagem de poderem ser filtradas espectralmente para corresponder a qualquer fotossensibilizador; no entanto, eles não podem ser acoplados de forma eficiente em

feixes de fibras ópticas ou guias de luz líquida e causam mais aquecimento em comparação com lasers e LEDs (Nagata *et al.*, 2012).

O aquecimento causado por uma determinada fonte de luz deve ser considerado para qualquer aplicação clínica no corpo humano. Dependendo do período de irradiação e da respectiva fonte de luz utilizada, a dose de energia aplicada pode causar aumento de temperatura, podendo levar a danos teciduais (Spranley *et al.*, 2012).

A maioria dos fotossensibilizadores comuns usados para fins medicinais são ativados pelo espectro próximo da luz vermelha (630–700 nm) (Ozog *et al.*, 2016). Os comprimentos de onda elevados não têm energia para excitar as moléculas de oxigênio e os comprimentos de onda baixos não têm a capacidade de penetrar na pele e atingir as regiões alvo. Além disso, responder a comprimentos de onda baixos leva à ativação dos fotossensibilizadores pela luz solar, o que pode interferir no tratamento. E, ainda, o espectro de ativação do fotossensibilizador não deve se sobrepor à faixa de absorção dos corantes endógenos do corpo, tais como a hemoglobina e a melanina (Allison *et al.*, 2004; Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Existe um potencial para efeitos colaterais no uso dos fotossensibilizadores, como manchamento dentário, danos teciduais e celulares locais, possibilidade de superaquecimento dos tecidos orais e também risco de danos aos olhos e à pele com superexposição a irradiações de alta intensidade que devem ser considerados na condução de estudos clínicos (Nielsen *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016; Afrasiabi *et al.*, 2022; Solarte *et al.*, 2022).

Entretanto, o amplo espectro de ação e o baixo nível de efeitos adversos associados à TFDa fizeram com que os pesquisadores ficassem ansiosos para considerar os efeitos antimicrobianos da TFDa como alternativa adequada aos métodos convencionais de tratamento de infecções (Høiby, 2017).

1.3 *Galleria mellonella*

É um parasita onipresente das abelhas *Apis mellifera* e *Apis cerana* e de suas colmeias, e pode ser encontrado em colmeias, ninhos de abelhas, ninhos de vespas ou em ceras armazenadas. Na natureza, as lagartas se alimentam de mel e também de pólen, cera de abelha, pele de pupa, casulos e fezes da colmeia (Serrano *et al.*, 2023).

A grande mariposa da cera ou mariposa do favo de mel, *G. mellonella* (Linnaeus, 1758), é uma mariposa inseto do Filo Arthropoda, Classe Insetos, ordem Lepidoptera e família Pyralidae (mariposas de focinho). Trata-se de um inseto holometabólico típico que passa por quatro

estágios de desenvolvimento em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto (Hood; Horton; Mccreadie, 2003; Ellis; Graham; Mortensen, 2013; Kwadha *et al.*, 2017).

A duração de um ciclo completo é de aproximadamente seis a oito semanas a 29°–39° C e alta umidade (Ellis; Graham; Mortensen, 2013), com quatro a seis gerações por ano. A metamorfose completa é afetada por fatores abióticos, como temperatura, dieta e umidade relativa, e por fatores bióticos, como competição por comida e canibalismo (Nielsen; Brister, 1979; Kwadha *et al.*, 2017). Os 50-150 ovos colocados pela fêmea têm formato esferoidal e cor variando de branco a rosa claro. O desenvolvimento em larvas depende da temperatura e dura entre três a oito dias a 24°-27°C e trinta dias a 10-16°C (Charrière; Imdorf, 1999). (Figura 1).

Figura 1: Diferentes estágios de desenvolvimento da *Galleria mellonella*. Ovos (1), lagarta de aproximadamente 10 dias (2), lagarta de aproximadamente 20 dias (3), lagarta de 25-35 dias (4 e 5), lagarta de aproximadamente 40 dias (último estágio larval) (6), pré-pupas e pupas (7 e 8), mariposas adultas (9).



Fonte: Jorjão et al., 2018

As larvas branco-creme apresentam uma cabeça em forma de cúpula marrom-avermelhada e tornam-se cinza claro à medida que crescem. Medem de 1 a 23 mm e lembram uma lagarta, apresentando estrutura tubular para processamento e armazenamento de alimentos. Eles podem permanecer na fase larval de 28 dias, em condições ideais, até seis meses, e passam por cerca de 8 a 10 estágios de muda durante esse período (Serrano *et al.*, 2023).

A larva do inseto *G. mellonella* tem sido amplamente utilizada nas últimas décadas como modelo de infecção para estudar infecções bacterianas e fúngicas e para avaliar a eficácia de novos medicamentos antimicrobianos, antes de prosseguir para estudos pré-clínicos em mamíferos, reforçando a aplicação dos princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento, do inglês: *replacement, reduction and refinement*) em experimentação animal. O modelo de *G. mellonella* oferece diversas vantagens sobre os modelos de mamíferos: não necessita de aprovação ética, é facilmente manipulado, é barato, permite a criação em larga escala e permite

uma rápida execução experimental, associada à capacidade de incubar larvas em temperaturas entre 25° e 37° C, além de permitir uma inoculação relativamente simples dos patógenos a serem testados (Serrano *et al.*, 2023).

As larvas de *G. mellonella* têm ampla aplicabilidade para os diversos tipos de ensaios clínicos, o que pode ampliar as perspectivas de novos estudos *in vivo* em mamíferos. No entanto, a sua limitação é a falta de resposta imunológica adaptativa, a elevação de anticorpos e citocinas e a participação de células *natural killers* e células dendríticas, o que torna difícil prever a resposta imunológica em mamíferos. Outro obstáculo é a falta de disponibilidade de larvas mutantes, o que torna os estudos genéticos problemáticos (Bugyna; Kendra; Bujdáková, 2023).

Embora os vertebrados tenham desenvolvido uma resposta imune adaptativa, sua resposta imune inata ainda mantém semelhanças notáveis com a resposta imune em insetos, permitindo o estabelecimento de uma correlação positiva entre a maioria dos resultados obtidos em modelos de *G. mellonella* e de mamíferos (Jander; Rahme; Ausubel, 2000; Tsai; Loh; Proft, 2016). Além disso, o modelo de *G. mellonella* tem sido citado como adequado para a pré-triagem da avaliação da eficácia de novos agentes antibacterianos (Desbois; Coote, 2012; Tsai; Loh; Proft, 2016), antifúngicos (Mukherjee *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2017), de terapias que combinam novos compostos com antibióticos convencionais, e também modelo adequado para estudar a expressão dos fatores de virulência, coinfeções, interações hospedeiro-patógeno, resposta imune inata a microrganismos e toxicidade (Serrano *et al.*, 2023).

Diferentes parâmetros podem ser analisados a fim de avaliar o efeito da infecção bacteriana sobre *G. mellonella*, incluindo: observações clínicas, análise histopatológica, determinação da carga bacteriana, monitoramento da ativação da resposta imune (quantificação e viabilidade de hemócitos, detecção de radicais livres de oxigênio e outros marcadores), análise de miRNA do hospedeiro e bioluminescência de genes bacterianos e/ou expressão de RNA bacteriano (Serrano *et al.*, 2023).

Considerando os fatos elencados, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antibacteriana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento de infecção sistêmica em modelo experimental de *Galleria mellonella*.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento de infecção sistêmica em modelo experimental de *Galleria mellonella*.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar as densidades de inóculo de *S. aureus* para diferentes níveis de infecção (não letal, letal e super infecção) em *G. mellonella*;
- Avaliar a eficácia da TFDa no tratamento da infecção sistêmica de *S. aureus* em *G. mellonella* infectadas;
- Verificar a eficácia do laser vermelho no tratamento da infecção sistêmica de *S. aureus* em *G. mellonella* infectadas;
- Avaliar a eficácia do azul de metileno no tratamento da infecção sistêmica de *S. aureus* em *G. mellonella* infectadas;
- Averiguar a eficácia do tratamento convencional associado com a TFDa no tratamento da infecção sistêmica de *S. aureus* em *G. mellonella* infectadas;

3 Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento do estudo

Tratou-se de um estudo experimental *in vivo*, em modelo invertebrado, com observação direta em laboratório.

3.2 Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análises e Diagnóstico (LAD) situado no Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB.

3.3 Aspectos éticos

Modelos animais invertebrados, como *G. mellonella*, não estão inclusos na legislação de bem-estar animal e nas diretrizes de ética. Dessa forma, as análises realizadas nesta pesquisa são legalmente dispensadas da apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) (Pereira *et al.*, 2021b).

3.4 Microrganismos utilizados

Foi utilizada uma cepa padronizada de *S. aureus* (ATCC 25923). disponíveis em estoque do Laboratório de Análises e Diagnóstico do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, campus I, Campina Grande, Paraíba.

3.5 Ensaio clínico em modelo experimental de *Galleria mellonella*

3.5.1 Amostra

A amostra foi composta por larvas de *G. mellonella*, de aparência saudável, com cor clara e livres de manchas e/ou pigmentos escuros, com peso médio de 0,25 g, distribuídas em diferentes grupos, de acordo com o nível de infecção e tratamento. Cada grupo contendo 10 larvas. Todas as análises foram realizadas em triplicata (Silva *et al.*, 2019).

Durante todo o experimento, as larvas foram mantidas em incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 30° C, sendo removidas exclusivamente para troca dos papéis de filtro, fornecimento de ração, aplicação de inóculo, tratamento e registros da análise (Figura 2).

Figura 2 – Incubadora B.O.D



Fonte: Elaborada pela autora, 2024

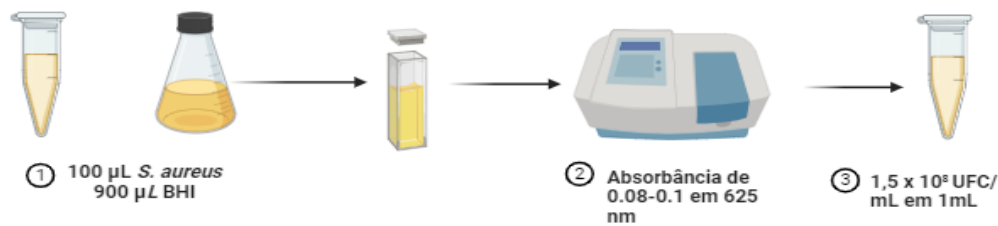
3.5.2 Análise da viabilidade de *G. mellonella*

As larvas com alto grau de melanização e falta de movimento ao toque foram consideradas inviáveis ao experimento (Silva *et al.*, 2019).

3.5.3 Preparo do inóculo de *S. aureus*

Culturas de cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) foram ativadas em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24h e padronizada em espectrofotômetro, a partir das densidades 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 células.

Figura 3 – Preparo do inóculo de *S. aureus*



Fonte: Elaborada pela autora, 2024

3.5.4 Determinação dos níveis de infecção por *S. aureus*

A classificação dos níveis de baseou-se nos seguintes critérios, conforme VERTYPOROKH e WOJDA (2020):

- Infecção não letal: Infecção capaz de matar 5% do número total de larvas que compõem o grupo experimental, após o tempo total de análise.
- Infecção letal: Infecção capaz de matar 50% do número total de larvas que compõem o grupo experimental, após o tempo total de análise.
- Super infecção: Infecção capaz de matar 100% das larvas em 24 h.

Para determinar os diferentes níveis de infecção, as larvas foram separadas em 6 grupos. Cada grupo contendo 10 larvas. Foram injetados 5 µl de diferentes densidades de inóculos (densidades 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9) de *S. aureus*, na última pró-pata esquerda de cada larva, utilizando uma seringa de Hamilton (25 µl). Os grupos foram observados por 48 horas.

Figura 4 – Inoculação em *Galleria mellonella*



Fonte: Elaborada pela autora, 2024

3.5.5 Tratamento de infecção

Os tratamentos da infecção por *S. aureus* foram tratados de acordo com a figura 6.

Figura 5 – Fluxograma com grupos experimentais considerando a aplicação de diferentes modelos de tratamento em larvas de *G. mellonella* infectadas por *S. aureus*

ATCC 25923	TFDa
	Ceftriaxona
	Ceftriaxona + TFDa
	Laser Vermelho
	Azul de Metileno
	Solução salina

Fonte: Elaborada pela autora, 2024

Com o propósito de controlar fatores que poderiam trazer prejuízos à saúde da larva como trauma pela inoculação, toxicidade ao meio de cultura ou contaminação do meio foi incluído o grupo controle negativo, o qual foi inoculado com 5µl de solução salina.

3.5.5.1 Tratamento da infecção por *S. aureus* com TFDa

A energia laser utilizada foi na dose de 15 J/cm² com comprimento de onda de 650 nm (vermelho visível) e potência de 100 mW de modo contínuo, durante 2 minutos e 30 segundos.

O aparelho utilizado foi o THERAPY XT (D.M.C. equipamentos LTDA®). O azul de metileno (ACS científica®) foi o fotossensibilizador utilizado neste estudo, na concentração de 1500 μM e foi preparado dissolvendo o corante em água destilada, na proporção de 0,0047 gramas para cada 10 ml. A quantidade inoculada por larva foi de 5 μL (Paziani *et al.*, 2019).

A injeção com azul de metileno foi realizada na última pró-pata direita 30 minutos após a infecção. A seguir, as larvas permaneceram mais 30 minutos no escuro (tempo pré-irradiação) para proporcionar uma boa dispersão do fotossensibilizador (Figueiredo-Godoi *et al.*, 2019).

Com o objetivo de padronizar a distância na irradiação com a luz laser, foi adaptado um suporte para fixação do aparelho laser utilizado e as larvas foram inseridas em placas de 24 poços.

Figura 6 – Suporte para o laser (Vista Superior)



Fonte: Elaborada pela autora, 2024

Figura 7 – Suporte para o laser (Vista Frontal)



Fonte: Elaborada pela autora, 2024

3.5.5.2. Tratamento da infecção por *S. aureus* com ceftriaxona

Ceftriaxona foi o antibacteriano sistêmico selecionado para a realização do tratamento da infecção. A dose utilizada, após realização da CIM, foi de 6,25 ($\mu\text{g/mL}$). Para o preparo das soluções, a quantidade de antibacteriano correspondente à dosagem foi diluída em água destilada estéril e inoculada na última pró pata direita da larva. Previamente, um grupo com 10 larvas foi utilizado para avaliação da citotoxicidade do antibacteriano.

3.5.5.3 Tratamento da infecção por *S. aureus* com ceftriaxona e TFDA

Os mesmos parâmetros anteriormente mencionados foram mantidos. 30 minutos após a infecção foi realizada a inoculação da ceftriaxona, transcorridos novos 30 minutos foi realizada a inoculação do azul de metileno e, posteriormente, a aplicação do laser vermelho. Ambas inoculações foram realizadas na última pró pata direita.

3.5.5.4 Tratamento da infecção por *S. aureus* com laser vermelho

Conforme mencionado para a TFDa, utilizou-se o aparelho THERAPY XT, na dose de 15 J/cm² com comprimento de onda de 650 nm e potência de 100 mW de modo contínuo, durante 2 minutos e 30 segundos (Paziani *et al.*, 2019).

3.5.5.5 Tratamento da infecção por *S. aureus* com azul de metileno

Conforme mencionado para a TFDa, 5 µL de azul de metileno foi inoculado na última pró pata direita da larva, 30 minutos após infecção, conforme concentração anteriormente descrita (Paziani *et al.*, 2019).

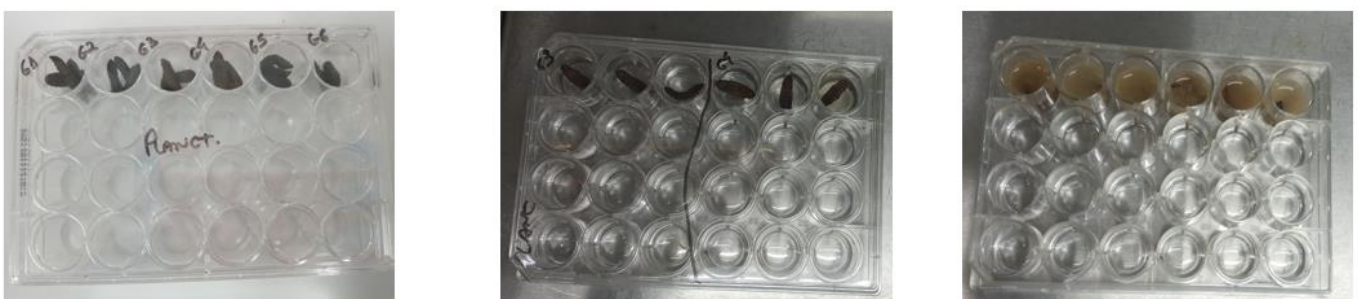
3.5.6 Curva de Sobrevivência de *G. mellonella*

Após realização dos tratamentos, conforme cada um dos grupos experimentais, os animais foram acondicionados em placas de Petri e incubados a 37°C. As placas foram observadas após 4 horas e depois em intervalos de 24 horas, durante o tempo total de 120 horas. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque por uma pinça metálica. O número de larvas mortas foi anotado em formulário próprio para avaliação da curva de sobrevivência (Tsai; Loh; Proft, 2016).

3.5.7 Quantificação de *S. aureus* na hemolinfa de *G. mellonella*

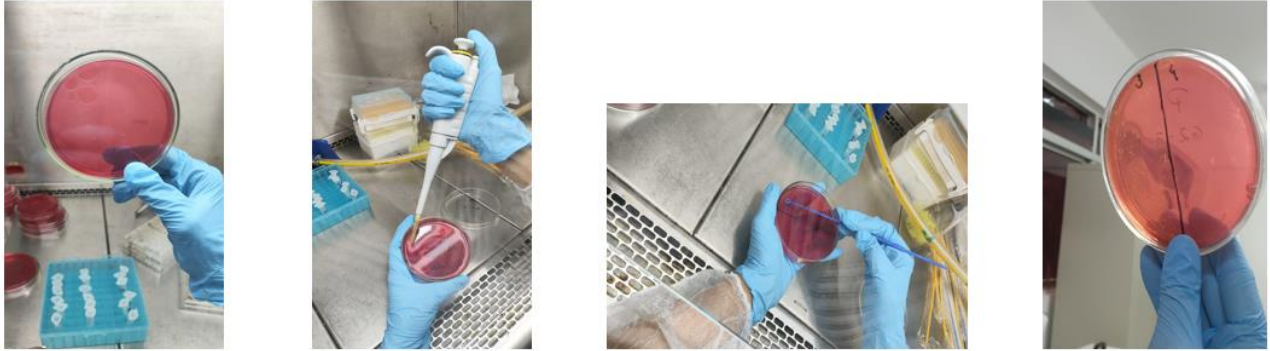
Após as 120 horas de observação, foram selecionadas 3 larvas aleatoriamente de cada um dos grupos experimentais para determinação da quantificação bacteriana. As larvas selecionadas foram maceradas e homogeneizadas em 1 ml de solução salina estéril. Após diluição seriada, foi realizado o plaqueamento em volume de 20 µL de Ágar Sal Manitol (Himedia®). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) (Vega-Chacon *et al.*, 2021).

Figura 8 – Maceração e Homogeneização das larvas



Fonte: Elaborada pela autora, 2024

Figura 9 – Plaqueamento com Ágar Sal Manitol



Fonte: Elaborada pela autora, 2024

3.6 Análise Estatística

As análises de sobrevivência foram realizadas com GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e analisadas pelo teste Log-rank (Mantel-Cox). Os dados da quantificação de UFC/ml para formação bacteriana na hemolinfa foram analisados por análise de variância (ANOVA) e post-hoc de Tukey. Foram considerados valores de $p < 0,05$ como significativos.

4 Artigo

4 ARTIGO

Eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento de infecções bacterianas provocadas por *S. aureus*

Maria das Graças Barbosa da Silva Costa (mgbarbosasilva11@gmail.com), Sofia Hiluey de Aguiar Leite (sofiahilueyleite@gmail.com), Diego Romário da Silva (diegoroomarioo@gmail.com), Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão (mhcvcatao@gmail.com).

Departamento de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Autor Correspondente: Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

<https://orcid.org/0000-0001-7681-3225>

Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande – PB. 58429-500, Brasil

E-mail: mhcvcatao@gmail.com

* Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (ANEXO A)

Fator de impacto 2023: 3.1 / Qualis-CAPES: A2

Eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento de infecções bacterianas provocadas por *S. aureus*

RESUMO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria que causa infecções em humanos, em diferentes graus, incluindo àquelas mais graves nos ambientes de assistência à saúde. Infecções causadas por esse patógeno representam desafios à saúde pública devido à alta taxa de resistência aos antibióticos. O objetivo deste estudo foi avaliar eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) no tratamento de infecção sistêmica, por *S. aureus*, em modelo de *Galleria mellonella*. Trata-se de um estudo experimental *in vivo*, com observação direta em laboratório. Curvas de morte foram definidas a partir de diferentes concentrações de inóculo de *S. aureus* ATCC 25923 para chegar ao inóculo letal ideal. As larvas de *G. mellonella* foram divididas em 6 grupos experimentais (n: 10) para cada uma das formas de tratamento após infecção (TFDa; Laser vermelho; Azul de Metileno; Ceftriaxona; Ceftriaxona + TFDa; NaCl 0,9%), bem como os grupos controle de sobrevivência (NaCl 0,9%) e controle de morte (DMSO puro). Após determinação da infecção e tratamento, as larvas foram observadas após as 4 primeiras horas e, posteriormente, em intervalos de 24 horas, durante 120 horas, para análise de sobrevivência. Posteriormente, 3 larvas de cada grupo foram escolhidas aleatoriamente, maceradas, homogeneizadas e diluídas para plaqueamento em Ágar Salt Manitol (Himedia). As placas foram incubadas por 24 horas, para posterior contagem de UFC/mL. Na análise estatística foram utilizados os testes de ANOVA one-way com pós teste de Tukey ($p < 0,05$) para análise das UFC/mL e curvas de mortalidade de Kaplan-Meier com test log-rank para análise de sobrevivência das larvas. A combinação de ceftriaxona e TFDa apresentou os melhores índices de sobrevida no tratamento da infecção. Observamos diferenças significativas na contagem celular entre o grupo controle e todos os grupos experimentais. Esses resultados indicam que a TFDa tem um forte potencial bactericida *in vivo* contra *S. aureus*.

1 Introdução

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva responsável por muitas infecções em humanos, desde infecções cutâneas não complicadas até infecções invasivas graves. Exemplos incluem furúnculos, abscessos e infecções de feridas, que geralmente não são fatais,

mas podem causar morbidade e dor significativas, além de bacteremias hospitalares com alta taxa de mortalidade.[1,2]. Assim, esse patógeno é um preocupante agente etiológico da pneumonia e de outras infecções do trato respiratório, sítios cirúrgicos, próteses articulares e infecções cardiovasculares, bem como em infecções hospitalares [3].

As infecções causadas por *S. aureus* ainda representam uma das principais causas de infecções hospitalares, em particular bacteremia, especialmente em indivíduos com cateteres vesicais ou com infecções de pele [1]. Bacteremia por *S. aureus* é responsável por mais mortes do que as causadas pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), tuberculose e hepatite viral combinadas [4,5], o que evidencia o grave problema de saúde pública causado por esse microrganismo

As infecções por *S. aureus* são muito difíceis de tratar devido à frequente resistência aos antibióticos e pela sua capacidade de formar biofilmes, que potencializa essa resistência antimicrobiana. Um fator agravante é que os medicamentos penetram no biofilme com dificuldade, muitas vezes em concentrações subinibitórias, levando ao aumento da formação de biofilme e à resistência aos antibióticos, dificultando o curso do tratamento. Além disso, os biofilmes facilitam a troca transversal de genes de resistência com outras espécies aumentando as chances de multiplicação de cepas resistentes. Desse modo, novas abordagens terapêuticas precisam ser estudadas e definidas como tratamentos alternativos a essas infecções [6].

Nessa perspectiva, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) é uma estratégia alternativa ao combate de microrganismos patógenos e seus biofilmes. Essa abordagem é baseada no uso de um fotossensibilizador de corante não tóxico, uma fonte de luz com o comprimento de onda adequado e a presença de oxigênio [7].

A interação ideal de todos os fatores anteriormente citados resulta em estresse oxidativo, que leva à morte das células-alvo [8,9]. Nesta estratégia, uma vez que não há um componente especificamente direcionado, mas um dano geral na célula, dificulta a adaptação do microrganismo e, conseqüentemente, as chances de desenvolvimento de resistência [10].

Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas alternativas para impedir a formação de biofilmes bacterianos e a conseqüente resistência aos antibióticos. Os estudos *in vivo* são, em partes, limitados devido à ausência de um sistema compatível com as políticas dos 3Rs (substituição, redução e refinamento, do inglês: *replacement, reduction and refinement*) proposta por Russell e Burch [11] para modelos experimentais em animais, e que possibilite a geração de resultados rápidos e permita a triagem de múltiplas interações em um curto espaço de tempo [12].

O modelo invertebrado *Galleria mellonella* (*G. mellonella*), vem recebendo cada vez mais destaque como um método alternativo satisfatório para estudos sobre virulência de patógenos microbianos e para avaliar a eficácia de agentes antimicrobianos devido as vantagens associadas ao seu uso [13]. Esses invertebrados não possuem nociceptores e, portanto, são insensíveis à dor; consequentemente, não existem regras éticas restritivas, ao contrário dos vertebrados [14]. Ainda, o seu baixo custo e a sua facilidade de utilização, contribuem para a sua crescente popularidade. Embora não possuam um sistema imunológico adaptativo, os invertebrados compartilham com os vertebrados um grande número de genes otológicos responsáveis pelas funções gerais, explicando assim que o seu sistema imunológico inato seja semelhante ao de mamíferos [15]. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antibacteriana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento de infecção sistêmica em modelo experimental de *Galleria mellonella*.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismos utilizados

Foi utilizada uma cepa padronizada de *S. aureus* (ATCC 25923) disponível em estoque do Laboratório de Análises e Diagnóstico do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba.

2.2 Amostra

A amostra foi composta por larvas de *G. mellonella*, de aparência saudável, com cor clara e livres de manchas e/ou pigmentos escuros, com peso médio de 0,25 g, distribuídas em diferentes grupos, de acordo com o nível de infecção e tratamento. Cada grupo possuía 10 larvas. Todas as análises foram realizadas em triplicata [16]. As larvas foram mantidas em incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 30° C, sendo removidas exclusivamente para troca dos papéis de filtro, fornecimento de ração, aplicação de inóculo, tratamento e registros da análise.

3.4.2 Análise da viabilidade de *G. mellonella*

As larvas com alto grau de melanização e falta de movimento ao toque foram consideradas mortas e, portanto, inviáveis ao experimento [16].

3.4.3 Preparo do inóculo de *S. aureus*

Culturas de cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) foram ativadas em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24h e padronizada em espectrofotômetro, a partir das densidades 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 células, com vistas a identificar a super infecção[17].

3.4.4 Tratamento de infecção

Os tratamentos da infecção por *S. aureus* foram tratados de acordo com a Figura 1.

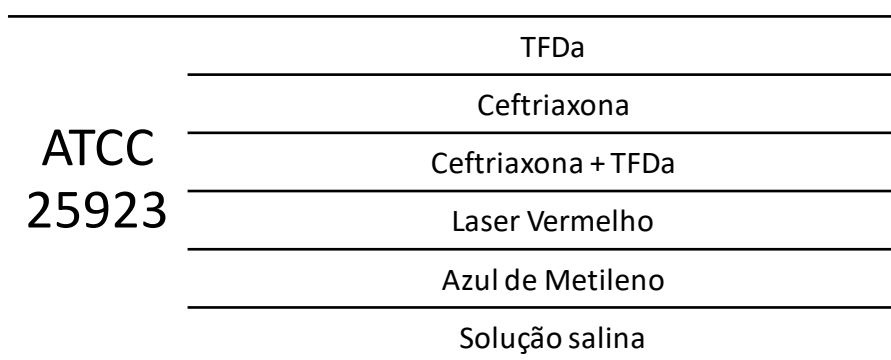


Figura 1 – Fluxograma com os diferentes grupos experimentais para o tratamento em modelo experimental de *G. mellonella* infectadas por *S. aureus*

Com o propósito de controlar fatores que possam trazer prejuízos à saúde da larva como trauma pela inoculação, toxicidade ao meio de cultura ou contaminação do meio foi incluído o grupo controle negativo, com solução salina (0.9 % NaCl, Sorimax, Campo Grande, Brazil) e um grupo de controle de morte com o agente tóxico Dimetilsulfóxido (DMSO).

3.4.4.1 Tratamento da infecção por *S. aureus* com TFDa

A energia laser utilizada foi na dose de 15 J/cm^2 com comprimento de onda de 650 nm (vermelho visível) e potência de 100 mW de modo contínuo, durante 2 minutos e 30 segundos. O aparelho utilizado foi o THERAPY XT (DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil). O azul de metileno (ACS científica, Sumaré, SP, Brasil) foi o fotossensibilizador utilizado neste estudo, na concentração de $1500 \mu\text{M}$ e foi preparado dissolvendo o corante em água destilada, na proporção de 0,0047 gramas para cada 10 ml. A quantidade inoculada por larva foi de $5 \mu\text{L}$ [18].

A injeção com azul de metileno foi realizada na última pró-pata direita 30 minutos após a infecção. A seguir, as larvas permaneceram mais 30 minutos no escuro (tempo pré-irradiação) para proporcionar uma boa dispersão do fotossensibilizador [19].

Com o objetivo de padronizar a distância na irradiação com a luz laser, foi adaptado um suporte para fixação do aparelho laser utilizado e as larvas foram inseridas em placas de 24 poços.

3.5.5.3. Tratamento da infecção por *S. aureus* com ceftriaxona

Ceftriaxona (Sigma-Aldrich®) foi o antibacteriano sistêmico selecionado para a realização do tratamento da infecção. A dose utilizada foi de 6,25 ($\mu\text{g/mL}$). Para o preparo das soluções, a quantidade de antibacteriano correspondente à dosagem foi diluída em água destilada estéril e inoculada na última pró pata direita da larva

. Previamente, um grupo com 10 larvas foi utilizado para avaliação da citotoxicidade do antibacteriano.

2.2.1.1 Tratamento da infecção por *S. aureus* com ceftriaxona e TFDa

Os mesmos parâmetros anteriormente mencionados foram mantidos. 30 minutos após a infecção foi realizada a inoculação da ceftriaxona, transcorridos novos 30 minutos foi realizada a inoculação do azul de metileno e, posteriormente, a aplicação do laser vermelho. Ambas inoculações foram realizadas na última pró para direita.

2.2.1.2 Tratamento da infecção por *S. aureus* com laser vermelho e azul de metileno

Os parâmetros de tratamento do uso de laser vermelho e azul de metileno seguem os mesmos parâmetros anteriormente mencionados.

3.5.6 Curva de Sobrevivência de *G. mellonella*

Após realização dos tratamentos, conforme cada um dos grupos experimentais, os animais foram acondicionados em placas de Petri e incubados a 37°C. As placas foram observadas após 4 horas e depois em intervalos de 24 horas, durante o tempo total de 120 horas. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque por uma pinça metálica. O número de larvas mortas foi anotado em formulário próprio para avaliação da curva de sobrevivência [20].

2.2.2 Quantificação de *S. aureus* na hemolinfa de *G. mellonella*

Após as 120 horas de observação, foram selecionadas 3 larvas aleatoriamente de cada um dos grupos experimentais para determinação da quantificação bacteriana. As larvas selecionadas foram maceradas e homogeneizadas em 1 ml de solução salina estéril. Após diluição seriada, foi realizado o plaqueamento em volume de 20 µL de Ágar Sal Manitol (Himedia®). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) [21].

3.5 *Análise Estatística*

As análises de sobrevivência foram realizadas com curvas de morte de Kaplan-Meier no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e analisadas pelo teste Log-rank (Mantel-Cox). Os dados da quantificação de UFC/ml para formação bacteriana na hemolinfa foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey, com nível de significância de 5%.

3. Resultados e Discussão

O inóculo na densidade de 10^9 foi classificado como super infecção; o inóculo de 10^8 foi classificado como letal; e as demais densidades foram consideradas como não-letais. Fez-se uso, portanto, do inóculo com a densidade de 10^9

A figura 2 mostra a curva de sobrevivência com o tratamento de infecção sistêmica por *S. aureus* com TFDa, LV (Laser vermelho), CFT (Ceftriaxona), CFT+TFDa (Ceftriaxona+TfDa) e os controles com NaCl 0,9% (Cloreto de sódio) e DMSO (Dimetilsulfóxido). Os resultados demonstram que o tratamento com CFT e a terapia combinada entre CFT e TFDa favorecem a sobrevida das larvas de *G. mellonella*.

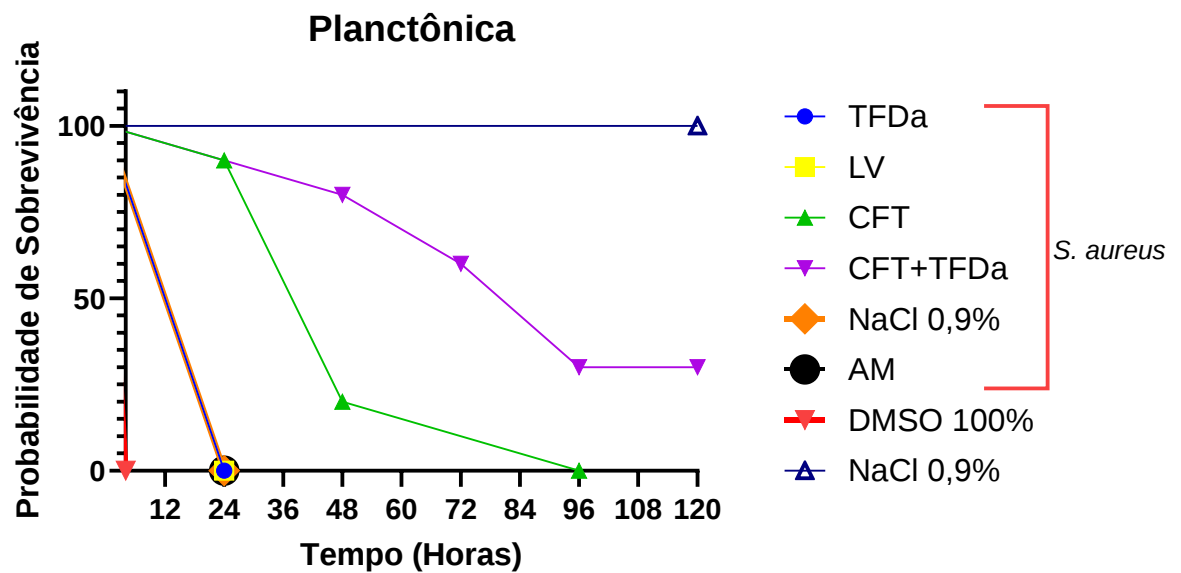


Figura 2: Tratamento de infecção sistêmica por *S. aureus* com TFDa, LV, CFT, CFT+TFDa, NaCl 0,9%, AM. Controle: Inoculação com NaCl 0,9%. ($p < 0,0001$, teste log-rank (Mantel-Cox))

A figura 3 mostra a quantificação de células de *S. aureus* após os respectivos tratamentos. Todos os grupos de tratamento demonstraram redução celular quando comparados ao grupo controle, com NaCl 0,9%. *S. aureus* é uma bactéria que comumente causa várias infecções que podem variar de superficiais a potencialmente fatais. As cepas hospitalares de *S. aureus* são frequentemente resistentes aos antibióticos, o que vem dificultando seu tratamento ao longo das últimas décadas. Outras alternativas terapêuticas foram postuladas para superar as desvantagens da multirresistência aos antibióticos. Destes, a TFDa é uma abordagem promissora para abordar a notável escassez de novos antibióticos ativos contra *S. aureus* [22].

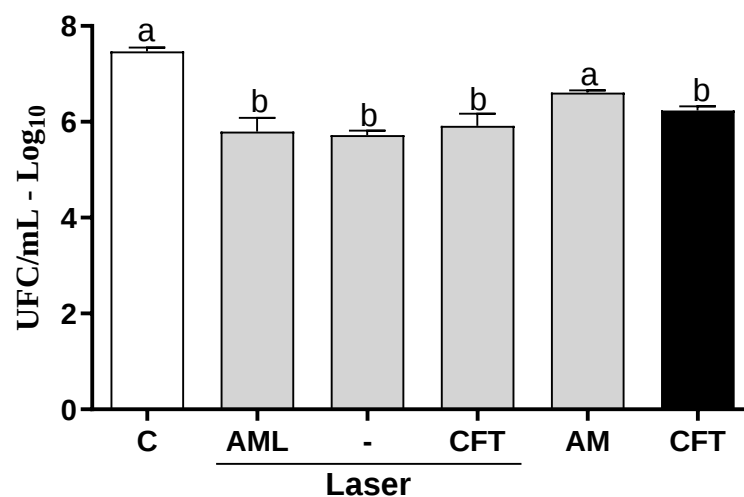


Figura 3: Quantificação de células de *S. aureus*. Controle: Inoculação com NaCl 0,9%. Diferentes letras indicam diferenças intragrupos estatisticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA one-way, seguida de teste post-hoc de Tukey)

Os resultados positivos demonstrados pela TFDa no tratamento das infecções podem ser combinados com a antibioticoterapia convencional [22]. Esta combinação permitiria evitar o aumento da resistência, tanto aos fotossensibilizadores como aos antibióticos. No presente estudo, a TFDa combinada com CFT apresentou bons resultados no que se refere à curva de sobrevivência das larvas, porém não obteve os mesmos resultados quando avaliado a viabilidade bacteriana.

A gentamicina (GEN) é um dos antibióticos mais utilizados para tratamento de diversas bacteremias. Vários autores avaliaram o efeito sinérgico da GEN com a TFDa no tratamento antibacteriano de *S. aureus* [23-27]. Estes estudos utilizaram uma metodologia semelhante, onde as bactérias são acondicionadas no escuro com diferentes concentrações de fotossensibilizadores. As bactérias são, então, colocadas em poços de placas de microtitulação, que contêm diferentes concentrações de GEN e irradiadas com diferentes doses de luz. Por fim, a contagem de UFC reduziu significativamente a viabilidade bacteriana [22].

Outro antibiótico amplamente utilizado para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes é a Linezolida (LN). Um grande conjunto de evidências mostra que a TFDa aumenta significativamente a eficácia do tratamento com LN de forma sinérgica para diferentes cepas de *S. aureus* [28,29]. Kashef *et al.* observaram que a combinação de Azul de Toluidina (AT) e AM na TFDa com LN erradica o *S. aureus* isolado de úlceras crônicas do pé diabético. Por si só, a terapia TFDa com AT ou AM não diminuiu a viabilidade bacteriana de nenhuma das cepas de *S. aureus*. No entanto, a combinação de TFDa com LN resultou na redução da viabilidade em comparação com o antibiótico sozinho (reduções de 0,6 log₁₀) [28]. A ausência de efeito sinérgico deste estudo, para a viabilidade bacteriana, comparado com os resultados obtidos na literatura, pode indicar que o mecanismo de ação do antibiótico utilizado pode ser diferencial para o sucesso da combinação da terapia fotodinâmica com a antibioticoterapia [32].

Uma das resistências mais críticas que *S. aureus* demonstrou durante as últimas duas décadas é a resistência à vancomicina. Por esse motivo, a TFDa tem sido estudada como opção terapêutica que potencializa a ação bactericida da vancomicina [30,31]. O sinergismo com TFDa melhorou a atividade antimicrobiana da VAN com uma diminuição de cinco vezes na viabilidade bacteriana em comparação com amostras tratadas apenas com TFDa [30].

No presente estudo, a TFDa combinada com CFT não apresentou aumento na eficácia terapêutica, com manutenção da redução do crescimento bacteriano, independente do

tratamento utilizado, corroborando com o estudo *in vitro* de Costa-Machado [32] que avaliou a eficácia da terapia combinada em cepas de *S. aureus*. A ceftriaxona, como ciclosporina de 3ª geração, possui mecanismo de ação enzimático capaz de impedir a síntese de peptidoglicano pela bactéria [33] e alterar o padrão de resistência a antibióticos após sua aplicação. No entanto, no presente estudo não foram observadas diferenças na inativação bacteriana quando CFT e TFDa foram combinados.

A aplicação de TFDa permitiu redução do crescimento bacteriano, em relação ao controle, com redução da carga bacteriana, porém não houve inativação completa e nem significativa para os demais grupos que usaram a fotobiomodulação. Da mesma forma, outros estudos concluíram que houve redução na maioria das bactérias estudadas, tanto com cepas bacterianas Gram-negativas quanto Gram-positivas, o que promoveu redução do crescimento bacteriano sem inativação total, sendo uma possível limitação para a eficácia do TFDa [32,33].

Os protocolos da concentração de azul de metileno utilizada e a dose de luz irradiada foram definidas por um estudo prévio para avaliação da TFDa em modelo experimental de *G. mellonella* com cepas fúngicas, onde a TFDa (com utilização do AM) prolongou e aumentou a sobrevivência de larvas [18]. Ressaltando que os mecanismos de morte celular da TFDa dependem da quantidade de EROS (Espécies Reativas de Oxigênio) gerados e sugerem dependência entre densidade de energia, dose, concentração e composição do fotossensibilizador para garantir a eficácia antibacteriana. No presente estudo, tal observação não pôde ser observada, uma vez que a TFDa, de modo isolado, não apresentou uma diferença significativa, para os demais grupos experimentais.

Uma das particularidades deste estudo é a utilização de TFDa em cepas de *S. aureus* em modelo de *G. mellonella*, não permitindo uma comparação direta entre estudos fazendo com que os dados para cargas fúngicas sejam ampliados para as cargas bacterianas também.

Como indicativo para futuros estudos, em que se pese, a importância da formação dos biofilmes bacterianos nos quadros de graves infecções, faz-se mister a continuidade dos estudos com biofilmes bacterianos. Também se faz necessário estudos comparativos com diferentes fontes de luz e fotossensibilizadores, com vistas a selecionar os melhores parâmetros para efetividade da TFDa.

Conclusão

TFDa apresenta um forte efeito bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de possuir baixa toxicidade e baixo risco de desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Neste estudo, nas concentrações de inóculo utilizadas no modelo de *G.*

mellonella, a TFDa apresentou ação antimicrobiana positiva contra *S. aureus*, indicando que essa técnica tem potencial como agente bactericida in vivo para infecções por *S. aureus*. Análises com outras variações de inóculo, tipo de laser e corante associado, bem como variações de tempo na análise podem, ainda, permitir resultados ainda mais promissores.

Referencias

1. Gould IM, David MZ, Esposito S, et al. New insights into meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(2):96-104. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.028.
2. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688. PMID: 33522395; PMCID: PMC7872022.
3. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603-661. doi:10.1128/CMR.00134-14.
4. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Apr;25(2):362-86. doi: 10.1128/CMR.05022-11.
5. Abraham L, Bamberger DM. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Contemporary Management. *Mo Med*. 2020 Jul-Aug;117(4):341-345.
6. Burlacchini G, Sandri A, Papetti A, et al. Evaluation of Antibacterial and Antibiofilm Activity of Rice Husk Extract against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*. 2024;13(1):80. doi:10.3390/pathogens13010080.
7. Bugyna L, Kendra S, Bujdáková H. *Galleria mellonella*-A Model for the Study of aPDT-Prospect and Drawbacks. *Microorganisms*. 2023;11(6):1455. doi:10.3390/microorganisms11061455.
8. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016;473(4):347-364. doi:10.1042/BJ20150942.
9. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, et al. Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):e49-e55. doi:10.1016/S1473-3099(16)30268-7.
10. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):571-589. doi:10.1080/1040841X.2018.1467876
11. Russell WMS; Burch RL The Principles of Humane Experimental technique. Methuen & Co Ltd. Londres, RU: 1959.
12. Sheehan G, Tully L, Kavanagh KA. *Candida albicans* increases the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* during polymicrobial infection of *Galleria mellonella* larvae. *Microbiology (Reading)*. 2020;166(4):375-385. doi:10.1099/mic.0.000892.
13. Ménard G, Rouillon A, Cattoir V, Donnio PY. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Dec 22;11:782733. doi: 10.3389/fcimb.2021.782733.
14. Eisemann, C.H., Jorgensen, W.K., Merritt, D.J. et al. Do insects feel pain? — A biological view. *Experientia* 40, 164–167 (1984). <https://doi.org/10.1007/BF01963580>.
15. Champion OL, Titball RW, Bates S. Standardization of *G. mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(3):108. doi:10.3390/jof4030108.

16. Silva DR, Rosalen PL, Freires IA, et al. Anadenanthera Colubrina vell Brenan: anti-Candida and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. *Braz Oral Res.* 2019;33:e023. doi:10.1590/1807-3107bor-2019.
17. Vertyporokh L, Wojda I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. *J Invertebr Pathol.* (2020),170: e107327.
18. Paziani MH, Tonani L, de Menezes HD, et al. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:197-203. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.12.010.
19. Figueiredo-Godoi LMA, Menezes RT, Carvalho JS, et al. Exploring the *Galleria mellonella* model to study antifungal photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;27:66-73. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.05.010.
20. Tsai CJ, Loh JM, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence.* 2016;7(3):214-229. doi:10.1080/21505594.2015.1135289.
21. Vega-Chacón Y, de Albuquerque MC, Pavarina AC, Goldman GH, Mima EGO. Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2021 Dec;12(1):231-243. doi: 10.1080/21505594.2020.1868814.
22. Pérez C, Zúñiga T, Palavecino CE. Photodynamic therapy for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34:102285. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102285.
23. Liu S, Mai B, Jia M, et al. Synergistic antimicrobial effects of photodynamic antimicrobial chemotherapy and gentamicin on *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [published correction appears in *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021 Sep;35:102338. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102338]. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;30:101703. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101703.
24. Barra F, Roscetto E, Soriano AA, Vollaro A, Postiglione I, Pierantoni GM, Palumbo G, Catania MR. Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination to Fight Biofilms and Resistant Surface Bacterial Infections. *Int J Mol Sci.* 2015 Aug 28;16(9):20417-30. doi: 10.3390/ijms160920417.
25. Adibhesami M, Ahmadi M, Farshid AA, Sarrafzadeh-Rezaei F, Dalir-Naghadeh B. Effects of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* contaminated open wounds healing in mice: An experimental study. *Vet Res Forum.* 2017;8(1):23-28.
26. Lu X, Chen R, Lv J, et al. High-resolution bimodal imaging and potent antibiotic/photodynamic synergistic therapy for osteomyelitis with a bacterial inflammation-specific versatile agent. *Acta Biomater.* 2019;99:363-372. doi:10.1016/j.actbio.2019.08.043.
27. Pérez-Laguna V, García-Luque I, Ballesta S, et al. Antimicrobial photodynamic activity of Rose Bengal, alone or in combination with Gentamicin, against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;21:211-216. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.11.012.
28. Kashef N, Akbarizare M, Razzaghi MR. *In vitro* Activity of Linezolid in Combination with Photodynamic Inactivation Against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2017 Jan-Mar;9(1):44-48.
29. Pérez-Laguna V, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, et al. Bactericidal Effect of Photodynamic Therapy, Alone or in Combination with Mupirocin or Linezolid,

- on *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2017;8:1002. Published 2017 May 31. doi:10.3389/fmicb.2017.01002.
30. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. 2009;30(18):3158-3166. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.038.
 31. Zhang QZ, Zhao KQ, Wu Y, Li XH, Yang C, Guo LM, Liu CH, Qu D, Zheng CQ. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its strain-dependent combined effect with antibiotics on *Staphylococcus aureus* biofilm. *PLoS One*. 2017 Mar 30;12(3):e0174627. doi: 10.1371/journal.pone.0174627.
 32. Costa Magacho C, Guerra Pinto J, Müller Nunes Souza B, Correia Pereira AH, Ferreira-Strixino J. Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30:101691. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101691.
 33. Pereira AHC, Pinto JG, Freitas MAA, Fontana LC, Pacheco Soares C, Ferreira-Strixino J. Methylene blue internalization and photodynamic action against clinical and ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;22:43-50. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.02.008.
 34. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):250-281. doi:10.3322/caac.20114

5 Considerações finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após os resultados encontrados e ampliando o conhecimento com a literatura vigente observa-se lacunas referentes ao impacto da TFDa no tratamento da infecção bacteriana *in vivo*. Os resultados pioneiros desta pesquisa ajudam a ampliar a temática para que cada vez mais o modelo experimental de *G. mellonella* possa ser utilizado como veículo confiável para os mais diversos tratamentos contra as infecções bacterianas, assim como já acontece com as infecções fúngicas.

Na concentração do inóculo encontrado para super infecção em modelo de *G. mellonella*, observamos que a TFDa, o uso de laser vermelho, o azul de metileno e a associação entre terapêutica medicamentosa e TFDa possuem ação antimicrobiana positiva contra *S. aureus* indicando que essa técnica tem potencial como agente bactericida *in vivo* para infecções por *S. aureus*. Análises com outros níveis de infecção, variações de inóculo, tipos de laser e LEDs, fotossensibilizadores e variações de tempo na análise podem permitir resultados ainda mais promissores.

Referências

REFERÊNCIAS

- AFRASIABI, S. *et al.* The potential application of natural photosensitizers used in antimicrobial photodynamic therapy Against Oral infections. **Pharmaceuticals**. v.15, n. 767, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15060767>.
- AGUAYO-REYES, A. *et al.* Molecular basis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Rev. Chilena Infectol.** v. 35, n.1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>.
- BECKER R.E.; BUBECK WARDENBURG J. *Staphylococcus aureus* and the skin: a longstanding and complex interaction, **Skinmed**. v. 13, n. 2, p. 111–119, 2015.
- BONDI JR, A; DIETZ, C.C. Penicillin resistant staphylococci, proceedings of the society for experimental biology and medicine. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 60, p. 55–58, 1945. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-60-15089>.
- WALTER, A.B. *et al.* Optimization of optical parameters for improved photodynamic therapy of *Staphylococcus aureus* using endogenous coproporphyrin III. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** v. 29, n. 101624, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101624>.
- GRAF, A.C. *et al.* Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. **Mol. Cell Proteomics**. v. 18, n. 6, p.1036–1053, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001120>.
- ABRAHAM, L.; BAMBERGER, D.A. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Contemporary Management. **Mo Med**. 2020, 117, 341–345.
- ABRAHAMSE H.; HAMBLIN M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem J**. v. 473, n.4, p. 347-364, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
- ALLISON, R. R. *et al.* Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.
- ARAUJO N.C. *et al.* Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. **Lasers Med Sci**. v. 29, n.2, p. 629–635, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1369-3>.
- ARCHER N.K. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**. v. 2, n. 5, p. 445-59, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>.
- AZARIPOUR, A. *et al.* Efficacy of photodynamic therapy as adjunct treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med. Sci.** v. 33, p. 407–423, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2383-7>
- BEIRÃO, S. *et al.* Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. **Photochem. Photobiol.** v. 90, n. 6, p. 1387–1396, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/php.12331>.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS Suppl.** v. 136, p. 1-51, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12099>.

BUGYNA, L; KENDRA S.; BUJDÁKOVÁ H. *Galleria mellonella*-A Model for the Study of aPDT-Prospects and Drawbacks. **Microorganisms.** v. 11, n. 6, 2023. p. 1-21, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061455>.

BURLACCHINI, G. *et al.* Evaluation of Antibacterial and Antibiofilm Activity of Rice Husk Extract Against *Staphylococcus aureus*. **Pathogens.** v. 13, n.1, p. 1-10, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens13010080>.

CAMINOS, D. A. *et al.* (2008). Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 7, n.9, p. 1071–1078, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1039/b804965c>.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two— cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* v. 2, n.1, p. 1-23, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X).

CHAMPION O. L.; TITBALL R. W.; BATES S. Standardization of *G. Mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. **J. Fungi. (Basel).** v. 4, n. 3, p. ,2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof4030108>.

CHARRIÈRE, J.-D.; IMDORF, A. Protection of honey combs from wax moth damage. **Am. Bee J.** v. 139, n.8, p. 627–630, 1999.

CHEUNG, G.Y.C; BAE, J.S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence.** v.12, n.1, p. 547–569, 2021.

CHIBEBE JUNIOR J. *et al.* Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. **BMC Microbiol.** v. 13, n. 217, p.1-9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-217>.

CIEPLIK F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Crit Rev Microbiol.** v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.

COSTA, L. M. *et al.* Tooth color change caused by photosensitizers after photodynamic therapy: an in vitro study. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** v. 160, p. 225–228, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.019>

DEROSA M.C., CRUTCHLEY R.J. Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications. **Coord. Chem. Rev.** v. 233, n. 234, p. 351–371, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).

DESBOIS, A.P.; COOTE, P.J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 78, p. 25-53, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394805-2.00002-6>.

DONLAN R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 9, p. 881-90, 2002. doi: <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.

EISEMANN C. H. *et al.* Do Insects Feel Pain? – A Biological View. **Experientia.** v. 40, p. 164–167, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01963580>.

ELLIS, J.; GRAHAM, J.; MORTENSEN, A. Standard methods for wax moth research. **J. Apic. Res.** v. 52, n. 1, p. 1-7, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.10>.

ENAUD, R. *et al.* The gut-lung Axis in health and respiratory diseases: a place for inter-organ and inter-kingdom Crosstalks. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 10, n. 9, p. 1-11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00009>.

ERIKSEN KR. ["Celbenin"-resistant staphylococci]. **Ugeskr Laeger.** v. 123, p. 384-6, 1961.

FELGENTRAGER A. *et al.* Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: photophysics and antimicrobial efficiency. **BioMed Res Int.** v. 2013, p. 1-12, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/482167>.

FIGUEIREDO-GODOI L.M.A. *et al.* Exploring the *Galleria mellonella* model to study antifungal photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v.27, p. 66-73, 2019. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.010.

GALLARDO-VILLAGRÁN M. *et al.* Photosensitizers Used in the Photodynamic Therapy of Rheumatoid Arthritis. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20, n.13, p. 1-21, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20133339>

GARCEZ, A. S. *et al.* Effects of photodynamic therapy on Grampositive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. **Photomed. Laser Surg.** v. 31, n.11, p. 519–525, 2013. doi: <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3341>.

GARCIA-LARA J.; NEEDHAM A. J; FOSTER S. J. Invertebrates as Animal Models for *Staphylococcus Aureus* Pathogenesis: A Window Into Host–Pathogen Interaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 43, n.3, p. 311–323, 2005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.11.003>.

GIULIERI S.G., TONG S.Y.C., WILLIAMSON D.A. Using genomics to understand meticillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Microb Genom.** v. 6, n.1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000324>.

GOULART R DE C. *et al.* Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomed Laser Surg.** v. 28(Suppl 1), p. 53-60, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1089/pho.2009.2591>

GOULD, I.M. *et al.* New insights into meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v. 39, n. 2, p. 96–104, 2012. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.028.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; AND STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.

HENDI, S. S. *et al.* Antibacterial effects of a 940 nm diode laser with/without silver nanoparticles against enterococcus faecalis. **J. Lasers Med. Sci.** v.12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34172/jlms.2021.73>

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS.** v. 125, n. 4, p. 272–275, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12686>.

HOOD, W.M.; HORTON, P.M.; MCCREADIE, J. Field Evaluation of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) for the Control of Wax Moths (Lepidoptera: Pyralidae) in Stored Honey Bee Comb. **J. Agric. Urban Entomol.** v. 20, n.2, p. 93-103, 2003.

HU X. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. **Front Microbiol.** v. 9, n. 1299, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/10.3389/fmicb.2018.01299>.

JANDER, G.; RAHME, L.G.; AUSUBEL, F.M. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. **J. Bacteriol.** v. 182, n. 13, p. 3843–3845, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.182.13.3843-3845.2000>.

KASHEF N., HAMBLIN M.R., Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resist. Updat.** v. 31, p. 31-42, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2017.07.003>.

KWADHA, C.A. *et al.* The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. **Insects.** v. 8, n. 2, 2017. DOI: : <https://doi.org/10.3390/insects8020061>.

KWIATKOWSKI S. *et al.* Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed Pharmacother.** v. 106, p. 1098-1107, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.

LAKHUNDI S.; ZHANG K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology, **Clin. Microbiol. Rev.** v. 31, n. 4, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>.

LAM, M. *et al.* Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*. **Photochem. Photobiol.** v. 87, n.4, p. 904–909, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00938.x>.

LIU S. *et al.* Synergistic antimicrobial effects of photodynamic antimicrobial chemotherapy and gentamicin on *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 30, n. 101703, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101703>.

LUKE-MARSHALL, N. R. *et al.* *Moraxella catarrhalis* is susceptible to antimicrobial photodynamic therapy with Photofrin. **Lasers Surg. Med.** v. 46, n.9, p. 712–717, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/lsm.22287>.

MAISCH T. *et al.* 2014. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. **PLoS One**. v. 9, n.12, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111792>.

MARASINI, S.; LEANSE, L. G.; DAI, T. Can microorganisms develop resistance against light based anti-infective agents? **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 75, n. 113822, p. 1-17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.032>

MCGUINNESS, W.A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F.R. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Yale J. Biol. Med.** v. 90, n. 2, p. 269-281, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005>

MCGUINNESS, W.A.; KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. Evasion of neutrophil killing by *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**. v. 5, n. 1, p. 1-13, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens5010032>.

MÉNARD G. *et al.* *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 11, p. 1-18, DOI: <https://doi.org/10.1371/10.3389/fcimb.2021.782733>.

MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W. Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange. **J. Bacteriol.** v. 182, n. 4, p.1172–1175, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1172-1175.2000>.

MIZUNO K. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy with functionalized Fullerenes: quantitative structure-activity relationships. **J Nanomed Nanotechnol.** v. 2, n. 2, p.1–9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000109>.

MOROSINI, M.I. *et al.* Phenotypic detection of resistance mechanisms in gram-positive bacteria. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 30, n.6, p. 325-332, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.009>.

MROZ P. Photodynamic therapy with fullerenes. **Photochem Photobiol Sci.** v. 6, n. 11, p. 1139–1149, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1039/b711141j>.

MUKHERJEE, K. *et al.* The Greater Wax Moth *Galleria mellonella* as an Alternative Model Host for Human Pathogens. In: Vilcinskas, A. (eds) Insect Biotechnology. **Biologically-Inspired Systems**, v. 2. Springer, Dordrecht, 2010. DOI:https://doi.org/10.1007/978-90-481-9641-8_1.

NAGATA J.Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* v. 9, n.2, p. 122-131, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.11.006>.

NIELSEN, H. *et al.* Comparison of riboflavin and toluidine blue O as photosensitizers for Photoactivated disinfection on endodontic and periodontal pathogens in vitro. **PLoS One**. v.10, n. 10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140720>.

OLIVER P.M. *et al.* Localization of anionic phospholipids in *Escherichia coli* cells. **J Bacteriol.** v. 196, n. 19, p. 3386-98, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01877-14>.

OYAMA J. *et al.* Photodynamic therapy in wound healing in vivo: a systematic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 30, n.101682, p. 1-10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101682>.

OZOG D.M. *et al.* Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. **Dermatol Surg.** v. 42, n. 7, p. 804-27, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000800>.

PAZIANI M.H. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 25 p.197-203, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.12.010>.

PEACOCK S.J.; PATERSON G.K., Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annu. Rev. Biochem.** v. 84, p. 577–601, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>.

REGENSBURGER J. *et al.* Fatty acids and vitamins generate singlet oxygen under UVB irradiation. **Exp Dermatol.** v. 21, n. 2, p.135–139, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01414.x>.

ROBERTSON C.A., EVANS D.H., ABRAHAMSE H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J Photochem Photobiol B.** v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>.

NIELSEN R. A.; BRISTER C. D. Greater Wax Moth: Behavior of Larvae. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 72, n. 6, p. 811-815, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1093/aesa/72.6.811>.

RUSSELL W.M.S.; BURCH R.L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Methuen & Co Ltd. Londres, RU: 1959.

SARDI J.C.O. *et al.* Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. **J Med Microbiol.** v. 66, n. 6, p. 816-824, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000494>.

SERRANO I. *et al.* The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. **Antibiotics.** v. 12, n. 3, p. 1-25, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030505>.

SHAHMORADI, S. *et al.* The application of selenium nanoparticles for enhancing the efficacy of photodynamic inactivation of planktonic communities and the biofilm of *Streptococcus mutans*. **BMC. Res. Notes.** v. 15, n. 84, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-022-05973-w>.

SHARMA S.K.; CHIANG L.Y.; HAMBLIN M.R. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? **Nanomedicine.** v. 6, n.10, p. 1813-25, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm.11.144>.

SHEEHAN, G.; TULLY, L.; KAVANAGH, K.A. *Candida albicans* increases the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* during polymicrobial infection of *Galleria mellonella* larvae. **Microbiology**. v. 166, n. 4, p.166, 375–385, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000892>

SHI X. *et al.* Metronomic photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and autophagy in human SW837 colorectal cancer cells. **J Photochem Photobiol B**. v. 198, n. 111586, p. 1-9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111586>.

SHRESTHA, A., AND KISHEN, A. Antibiofilm efficacy of photosensitizerfunctionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. **J. Endod.** v. 40, n. 10, p. 1604–1610, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.03.009>.

SHRESTHA, A. *et al.* Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. **J. Endod.** v. 36, p. 1030–1035, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.008>.

SILVA D.R. *et al.* *Anadenanthera Colubrina vell Brenan*: anti-Candida and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Braz Oral Res.** v. 33, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0023>.

SOLARTE, D. L. G. *et al.* Antimicrobial behavior and cytotoxicity of Indocyanine green in combination with visible light and water-filtered infrared a radiation against periodontal bacteria and subgingival biofilm. **Biomedicine**. v. 10, n. 956. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050956>

SPAETH, A. *et al.* CureCuma–cationic curcuminoids with improved properties and enhanced antimicrobial photodynamic activity. **Eur J Med Chem.** v. 159, p. 423-440, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.072>].

SPATH, A. *et al.* Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colored type-II photosensitizers. **J Med Chem.** v. 57, n. 12, p. 5157–5168, 2014.

SPRANLEY, T.J. *et al.* Curing light burns. **Gen Dent.** v. 60, n. 4, p. 210–214, 2012.

STEWART, P.S. New ways to stop biofilm infections. **Lancet**. v. 361, n. 97, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12245-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12245-3).

SURESH, M.K.; BISWAS R.; BISWAS L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Int J Med Microbiol.** v. 309, n. 1, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>.

SUN, N. *et al.* Repurposing an inhibitor of ribosomal biogenesis with broad anti-fungal activity. **Sci. Rep.** V. 7, n.1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17147-x>.

TARDIVO J.P. *et al.* Is surgical debridement necessary in the diabetic foot treated with photodynamic therapy? **Diabet Foot Ankle.** v. 8, n. 1, p. 1-6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/2000625X.2017.1373552>.

TENOVER F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER M.V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infect. Dis.** v.7, n. 2, p. 327-332, 2001. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0702.010237>.

TABENSKI L. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy vs. local minocycline in addition to nonsurgical therapy of deep periodontal pockets: a controlled randomized clinical trial. **Clin Oral Investig.** v.21, n.7, p.2253–2264, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-016-2018-6>.

TONG, S.Y.C. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clin. Microbiol. Rev.** v.28, n. 3, p. 603–661, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.

TORTIK N, SPAETH A, PLAETZER K. 2014. Photodynamic decontamination of foodstuff from *Staphylococcus aureus* based on novel formulations of curcumin. **Photochem Photobiol Sci.** v.13, n.10, p.1402–1409, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4pp00123k>

TSAI, C.J.; LOH, J.M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence.** v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>.

VAN HAL, S.J. *et al.* Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 25, n. 2, p. 362–386, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.05022-11>

WAINWRIGHT M. *et al.* Photoantimicrobials-are we afraid of the light? **Lancet Infect Dis.** v.17, n. 2, p. 49-55, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7).

WANG, Y. *et al.* In vitro photodynamic inactivation effects of Ru(II) complexes on clinical methicillinresistant *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cultures. **Photochem. Photobiol.** v. 91, n.1, p. 124–133, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/php.12378>.

WILSON B.C.; PATTERSON M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys Med Biol.** v. 53, n. 9, p. 61-109, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>.

WOLCOTT R.D.; EHRLICH G.D. Biofilms and chronic infections. **JAMA.** v. 299, n. 22, p. 2682-4. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.299.22.2682>.

WONG, T.W. *et al.* Indocyanine green-mediated photodynamic therapy reduces methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* drug resistance, **J. Clin. Med.** v. 8, n. 3, p. 1-19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm8030411>.

Anexos

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO PARA O PERIÓDICO PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY

About the journal

Aims and scope

Official Journal of the European Platform for Photodynamic Medicine

Affiliated with the **International Photodynamic Association**

Also affiliated with the British Medical Laser Association and the Polish Society for Photodynamic Medicine

INDEXED in MEDLINE/PubMed, SciSearch/Science Citation Index Expanded, Current Contents/Clinical Medicine.

Aims and Scope:

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of **Photodiagnosis** and **Photodynamic Therapy** in all medical specialties. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer-review process.

Article types

Research Papers should report original clinical studies or research not previously published or being considered for publication elsewhere. Work in Progress may also be submitted. See below for the standard layout. Submission of a manuscript to this journal gives the publisher the right to publish that paper if it is accepted. Manuscripts may be edited to improve clarity and expression.

Review articles, including institutional reviews of recent developments are welcome, and will undergo peer review. Reviews should have an abstract of up to 250 words.

Editorials

Although most Editorials in the journal are commissioned, authors may contact the Editor-in-Chief to request submission of their own Editorial.

Correspondence. Readers are encouraged to write about any topic that relates to photodiagnosis or photodynamic therapy, clinical, scientific, educational, social or economic. Letters should be no longer than 500 words and may include discussions on material previously printed in the Journal.

Case report will be considered if formatted as a research letter with 2 figures maximum. Maximum length is up to 1000 words with no headings and up to 6 references and 2 tables or figures. An abstract of 150-200 words should also be provided.

Short Communications should not exceed 1000 words and should consist of a background section (not to exceed 100 words), aims (not to exceed 50 words), methods (not to exceed 250 words), results (not to exceed 250 words) and conclusion (not to exceed 250 words). An abstract of 150-200 words should also be provided. The editorial team reserves the right to decide which tables/figures submitted are necessary.

Peer review

This journal follows a single anonymized review process. Your submission will initially be assessed by our editors to determine suitability for publication in this journal. If your submission is deemed suitable, it will typically be sent to a minimum of two reviewers for an independent expert assessment of the scientific quality. The decision as to whether your article is accepted or rejected will be taken by our editors. Authors who wish to appeal the editorial decision for their manuscript may submit a formal appeal request in accordance with the procedure outlined in [Elsevier's Appeal Policy](#). Only one appeal per submission will be considered and the appeal decision will be final.

Read more about [peer review](#).

Our editors are not involved in making decisions about papers which:

- they have written themselves.
- have been written by family members or colleagues.
- relate to products or services in which they have an interest.

Any such submissions will be subject to the journal's usual procedures and peer review will be handled independently of the editor involved and their research group. Read more about [editor duties](#).

Special issues and article collections

The peer review process for special issues and article collections follows the same process as outlined above for regular submissions, except, a guest editor will send the submissions out to the reviewers and recommend a decision to the journal editor. The journal editor oversees the peer review process of all special issues and article collections to ensure the high standards of publishing ethics and responsiveness are respected and is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Ethics and Policies

Ethics in publishing

Authors must follow ethical guidelines stated in [Elsevier's Publishing Ethics Policy](#).

Submission declaration

When authors submit an article to an Elsevier journal it is implied that:

- the work described has not been published previously except in the form of a preprint, an abstract, a published lecture, academic thesis or registered report. See our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).
- the article is not under consideration for publication elsewhere.
- the article's publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out.
- if accepted, the article will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

To verify compliance with our journal publishing policies, we may check your manuscript with our screening tools.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following:

1. The conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data.
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content.
3. Final approval of the version to be submitted.

All authors should agree to be accountable for all aspects of the work to ensure that the questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Changes to authorship

The editors of this journal generally will not consider changes to authorship once a manuscript has been submitted. It is important that authors carefully consider the authorship list and order of authors and provide a definitive author list at original submission.

The policy of this journal around authorship changes:

- All authors must be listed in the manuscript and their details entered into the submission system.
- Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should only be made prior to acceptance, and only if approved by the journal editor.
- Requests to change authorship should be made by the corresponding author, who must provide the reason for the request to the journal editor with written confirmation from all authors, including any authors being added or removed, that they agree with the addition, removal or rearrangement.
- Only in exceptional circumstances will the journal editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors post acceptance.
- Publication of the manuscript may be paused while a change in authorship request is being considered.

- Any authorship change requests approved by the journal editor will result in a corrigendum if the manuscript has already been published.
- Any unauthorised authorship changes may result in the rejection of the article, or retraction, if the article has already been published.

Declaration of interests

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias their work. Examples of potential competing interests include:

- Employment
- Consultancies
- Stock ownership
- Honoraria
- Paid expert testimony
- Patent applications or registrations
- Grants or any other funding

The [Declaration of Interests tool](#) should always be completed.

Authors with no competing interests to declare should select the option, "I have nothing to declare".

The resulting Word document containing your declaration should be uploaded at the "attach/upload files" step in the submission process. It is important that the Word document is saved in the .doc/.docx file format. Author signatures are not required.

We advise you to read our [policy on conflict of interest statements, funding source declarations, author agreements/declarations and permission notes](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of generative AI in scientific writing

Authors must declare the use of generative AI in scientific writing upon submission of the paper. The following guidance refers only to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process:

- Generative AI and AI-assisted technologies should only be used in the writing process to improve the readability and language of the manuscript.
- The technology must be applied with human oversight and control and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. Authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.
- Authors must not list or cite AI and AI-assisted technologies as an author or co-author on the manuscript since authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans.

The use of generative AI and AI-assisted technologies in scientific writing must be declared by adding a statement at the end of the manuscript when the paper is first submitted. The statement will appear in the published work and should be placed in a new section before the references list. An example:

- Title of new section: Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process.
- Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the published article.

The declaration does not apply to the use of basic tools, such as tools used to check grammar, spelling and references. If you have nothing to disclose, you do not need to add a statement.

We advise you to read our [policy for authors on the use of generative AI](#) and AI-assisted technologies for Elsevier.

Please note: to protect authors' rights and the confidentiality of their research, this journal does not currently allow the use of Generative AI or AI-assisted technologies such as ChatGPT or similar services by [reviewers](#) or [editors](#) in the peer review and manuscript evaluation process. We are actively evaluating compliant AI tools and may revise this policy in the future.

Preprints

Preprint sharing

Authors may share preprints, anywhere and at any time, in line with Elsevier's [article sharing policy](#). Sharing preprints, such as on a preprint server, will not count as prior publication.

We advise you to read our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).

Free preprint posting on SSRN

In support of [open science](#) this journal offers authors a free preprint posting service on [SSRN](#) to ensure early registration and dissemination of research and facilitate early citations and collaboration. Posting to SSRN is subject to SSRN's standard checks.

You will be provided with the option to release your manuscript on SSRN during the submission process. Agreeing to this option will have no effect on the editorial process or outcome, and your manuscript will remain publicly available and free to read on SSRN whether our editors accept or reject your manuscript.

You will receive an email when your preprint is posted online on SSRN and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned.

Corresponding authors must seek approval from all co-authors before agreeing to release a manuscript publicly on SSRN.

We advise you to read about [SSRN](#), including the [SSRN Terms of Use](#) and [SSRN FAQs](#) before selecting this option.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Authors should ensure their work uses inclusive language throughout and contains nothing which might imply one individual is superior to another on the grounds of:

- age
- gender
- race
- ethnicity
- culture
- sexual orientation
- disability or health condition

We recommend avoiding the use of descriptors about personal attributes unless they are relevant and valid. Write for gender neutrality with the use of plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default. Wherever possible, avoid using "he, she," or "he/she."

No assumptions should be made about the beliefs of readers and writing should be free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions.

These guidelines are meant as a point of reference to help you identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

There is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender. We offer the following guidance:

- Sex and gender-based analyses (SGBA) should be integrated into research design when research involves or pertains to humans, animals or eukaryotic cells. This should be done in accordance with any requirements set by funders or sponsors and best practices within a field.
- Sex and/or gender dimensions of the research should be addressed within the article or declared as a limitation to the generalizability of the research.
- Definitions of sex and/or gender applied should be explicitly stated to enhance the precision, rigor and reproducibility of the research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer.

We advise you to read the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER checklist](#) (PDF) on the EASE website, which offer systematic approaches to the use of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation.

For further information we suggest reading the rationale behind and recommended [use of the SAGER guidelines](#).

Definitions of sex and/or gender

We ask authors to define how sex and gender have been used in their research and publication. Some guidance:

- Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features such as chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy. A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth") and is in most cases based solely on the visible external anatomy of a newborn. In reality, sex categorizations include people who are intersex/have differences of sex development (DSD).
- Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society.

Jurisdictional claims

Elsevier respects the decisions taken by its authors as to how they choose to designate territories and identify their affiliations in their published content. Elsevier's policy is to take a neutral position with respect to territorial disputes or jurisdictional claims, including, but not limited to, maps and institutional affiliations. For journals that Elsevier publishes on behalf of a third party owner, the owner may set its own policy on these issues.

- Maps: Readers should be able to locate any study areas shown within maps using common mapping platforms. Maps should only show the area actually studied and authors should not include a location map which displays a larger area than the bounding box of the study area. Authors should add a note clearly stating that "*map lines delineate study areas and do not necessarily depict accepted national boundaries*". During the review process, Elsevier's editors may request authors to change maps if these guidelines are not followed.
- Institutional affiliations: Authors should use either the full, standard title of their institution or the standard abbreviation of the institutional name so that the institutional name can be independently verified for research integrity purposes.

Writing and Formatting

File format

We ask you to provide editable source files for your entire submission (including figures, tables and text graphics). Some guidelines:

- Save files in an editable format, using the extension .doc/.docx for Word files and .tex for LaTeX files. A PDF is not an acceptable source file.
- Lay out text in a single-column format.
- Use spell-check and grammar-check functions to avoid errors.

We advise you to read our [Step-by-step guide to publishing with Elsevier](#).

Title page

You are required to include the following details in the title page information:

- Article title. Article titles should be concise and informative. Please avoid abbreviations and formulae, where possible, unless they are established and widely understood, e.g., DNA).
- Author names. Provide the given name(s) and family name(s) of each author. The order of authors should match the order in the submission system. Carefully check that all names are accurately spelled. If needed, you can add your name between parentheses in your own script after the English transliteration.
- Affiliations. Add affiliation addresses, referring to where the work was carried out, below the author names. Indicate affiliations using a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the corresponding address. Ensure that you provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence for your article at all stages of the refereeing and publication process and also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about your results, data, methodology and materials. It is important that the email address and contact details of your corresponding author are kept up to date during the submission and publication process.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in your article was carried out, or the author was visiting during that time, a "present address" (or "permanent address") can be indicated by a footnote to the author's name. The

address where the author carried out the work must be retained as their main affiliation address. Use superscript Arabic numerals for such footnotes.

Abstract

You are required to provide a concise and factual abstract. The abstract should briefly state the purpose of your research, principal results and major conclusions. Some guidelines:

- Abstracts must be able to stand alone as abstracts are often presented separately from the article.
- Avoid references. If any are essential to include, ensure that you cite the author(s) and year(s).
- Avoid non-standard or uncommon abbreviations. If any are essential to include, ensure they are defined within your abstract at first mention.

Keywords

You are required to provide 1 to 7 keywords for indexing purposes. Keywords should be written in English. Please try to avoid keywords consisting of multiple words (using "and" or "of").

We recommend that you only use abbreviations in keywords if they are firmly established in the field.

Highlights

You are required to provide article highlights at submission.

Highlights are a short collection of bullet points that should capture the novel results of your research as well as any new methods used during your study. Highlights will help increase the discoverability of your article via search engines. Some guidelines:

- Submit highlights as a separate editable file in the online submission system with the word "highlights" included in the file name.
- Highlights should consist of 3 to 5 bullet points, each a maximum of 85 characters, including spaces.

We encourage you to view example [article highlights](#) and read about the benefits of their inclusion.

Graphical abstract

You are encouraged to provide a graphical abstract at submission.

The graphical abstract should summarize the contents of your article in a concise, pictorial form which is designed to capture the attention of a wide readership. A graphical abstract will help draw more attention to your online article and support readers in digesting your research. Some guidelines:

- Submit your graphical abstract as a separate file in the online submission system.

- Ensure the image is a minimum of 531 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more and is readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi.
- Our preferred file types for graphical abstracts are TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

We encourage you to view example [graphical abstracts](#) and read about the benefits of including them.

Tables

Tables must be submitted as editable text, not as images. Some guidelines:

- Place tables next to the relevant text or on a separate page(s) at the end of your article.
- Cite all tables in the manuscript text.
- Number tables consecutively according to their appearance in the text.
- Please provide captions along with the tables.
- Place any table notes below the table body.
- Avoid vertical rules and shading within table cells.

We recommend that you use tables sparingly, ensuring that any data presented in tables is not duplicating results described elsewhere in the article.

Figures, images and artwork

Figures, images, artwork, diagrams and other graphical media must be supplied as separate files along with the manuscript. We recommend that you read our detailed [artwork and media instructions](#). Some excerpts:

When submitting artwork:

- Cite all images in the manuscript text.
- Number images according to the sequence they appear within your article.
- Submit each image as a separate file using a logical naming convention for your files (for example, Figure_1, Figure_2 etc).
- Please provide captions along with the artwork.
- Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX, text graphics may also be embedded in the file.

Artwork formats

When your artwork is finalized, "save as" or convert your electronic artwork to the formats listed below taking into account the given resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations:

- Vector drawings: Save as EPS or PDF files embedding the font or saving the text as "graphics."
- Color or grayscale photographs (halftones): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 300 dpi (for single column: min. 1063 pixels, full page width: 2244 pixels).
- Bitmapped line drawings: Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 1000 dpi (for single column: min. 3543 pixels, full page width: 7480 pixels).

- Combinations bitmapped line/halftones (color or grayscale): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 500 dpi (for single column: min. 1772 pixels, full page width: 3740 pixels).

Please do not submit:

- files that are too low in resolution (for example, files optimized for screen use such as GIF, BMP, PICT or WPG files).
- disproportionally large images compared to font size, as text may become unreadable.

Figure captions

All images must have a caption. A caption should consist of a brief title (not displayed on the figure itself) and a description of the image. We advise you to keep the amount of text in any image to a minimum, though any symbols and abbreviations used should be explained.

Provide captions in a separate file.

Color artwork

If you submit usable color figures with your accepted article, we will ensure that they appear in color online.

Please ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision. Learn more about [color and web accessibility](#).

For articles appearing in print, you will be sent information on costs to reproduce color in the printed version, after your accepted article has been sent to production. At this stage, please indicate if your preference is to have color only in the online version of your article or also in the printed version.

Generative AI and Figures, images and artwork

Please read our [policy on the use of generative AI and AI-assisted tools in figures, images and artwork](#), which states:

- We do not permit the use of Generative AI or AI-assisted tools to create or alter images in submitted manuscripts.
- The only exception is if the use of AI or AI-assisted tools is part of the research design or methods (for example, in the field of biomedical imaging). If this is the case, such use must be described in a reproducible manner in the methods section, including the name of the model or tool, version and extension numbers, and manufacturer.
- The use of generative AI or AI-assisted tools in the production of artwork such as for graphical abstracts is not permitted. The use of generative AI in the production of cover art may in some cases be allowed, if the author obtains prior permission from the journal editor and publisher, can demonstrate that all necessary rights have been cleared for the use of the relevant material, and ensures that there is correct content attribution.

Supplementary material

We encourage the use of supplementary materials such as applications, images and sound clips to enhance research. Some guidelines:

- Cite all supplementary files in the manuscript text.
- Submit supplementary materials at the same time as your article. Be aware that all supplementary materials provided will appear online in the exact same file type as received. These files will not be formatted or typeset by the production team.
- Include a concise, descriptive caption for each supplementary file describing its content.
- Provide updated files if at any stage of the publication process you wish to make changes to submitted supplementary materials.
- Do not make annotations or corrections to a previous version of a supplementary file.
- Switch off the option to track changes in Microsoft Office files. If tracked changes are left on, they will appear in your published version.

We recommend you upload research data to a suitable specialist or generalist repository. Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

Video

This journal accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. We encourage you to include links to video or animation files within articles. Some guidelines:

- When including video or animation file links within your article, refer to the video or animation content by adding a note in your text where the file should be placed.
- Clearly label files ensuring the given file name is directly related to the file content.
- Provide files in one of our [recommended file formats](#). Files should be within our preferred maximum file size of 150 MB per file, 1 GB in total.
- Provide "stills" for each of your files. These will be used as standard icons to personalize the link to your video data. You can choose any frame from your video or animation or make a separate image.
- Provide text (for both the electronic and the print version) to be placed in the portions of your article that refer to the video content. This is essential text, as video and animation files cannot be embedded in the print version of the journal.

We publish all video and animation files supplied in the electronic version of your article.

For more detailed instructions, we recommend that you read our guidelines on [submitting video content to be included in the body of an article](#).

Research data

We are committed to supporting the storage of, access to and discovery of research data, and our [research data policy](#) sets out the principles guiding how we work with the research community to support a more efficient and transparent research process.

Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

For this journal, the following instructions from our [research data guidelines](#) apply.

Option B: Research data deposit, citation and linking

You are **encouraged** to:

- Deposit your research data in a relevant data repository.
- Cite and link to this dataset in your article.
- If this is not possible, make a statement explaining why research data cannot be shared.

Data statement

To foster transparency, you are encouraged to state the availability of any data at submission.

Ensuring data is available may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you can state the reason why (e.g., your research data includes sensitive or confidential information such as patient data) during the submission process. This statement will appear with your published article on ScienceDirect.

Read more about the importance and benefits of providing a [data statement](#).

Data linking

Linking to the data underlying your work increases your exposure and may lead to new collaborations. It also provides readers with a better understanding of the described research.

If your research data has been made available in a data repository there are a number of ways your article can be linked directly to the dataset:

- Provide a link to your dataset when prompted during the online submission process.
- For some data repositories, a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.
- You can also link relevant data or entities within the text of your article through the use of identifiers. Use the following format: Database: 12345 (e.g. TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Learn more about [linking research data and research articles in ScienceDirect](#).

Research Elements

This journal enables the publication of research objects (e.g. data, methods, protocols, software and hardware) related to original research in [Elsevier's Research Elements journals](#).

Research Elements are peer-reviewed, open access journals which make research objects findable, accessible and reusable. By providing detailed descriptions of objects and their application with links to the original research article, your research objects can be placed into context within your article.

You will be alerted during submission to the opportunity to submit a manuscript to one of the Research Elements journals. Your Research Elements article can be prepared by you, or by one of your collaborators.

Article structure

Article sections

Divide your manuscript into clearly defined sections covering all essential elements. For example:

- Abstract
- Keywords
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Conclusions
- Artwork
- Tables with captions

Introduction

The introduction should clearly state the objectives of your work. We recommend that you provide an adequate background to your work but avoid writing a detailed literature overview or summary of your results.

Material and methods

The materials and methods section should provide sufficient details about your materials and methods to allow your work to be reproduced by an independent researcher. Some guidelines:

- If the method you used has already been published, provide a summary and reference the originally published method.
- If you are quoting directly from a previously published method, use quotation marks and cite the source.
- Describe any modifications that you have made to existing methods.

Results

Results should be clear and concise. We advise you to read the sections in this guide on supplying tables, artwork, supplementary material and sharing research data.

Discussion

The discussion section should explore the significance of your results but not repeat them. You may combine your results and discussion sections into one section, if appropriate. We

recommend that you avoid the use of extensive citations and discussion of published literature in the discussion section.

Conclusion

The conclusion section should present the main conclusions of your study. You may have a stand-alone conclusions section or include your conclusions in a subsection of your discussion or results and discussion section.

Glossary

Please provide definitions of field-specific terms used in your article, in a separate list.

Abbreviations

Abbreviations which are not standard in the field should be defined in a footnote on the first page of your article.

Abbreviations which are essential to include in your abstract should be defined at first mention in your abstract, as well as in a footnote on the first page of your article.

Before submission we recommend that you review your use of abbreviations throughout your article to ensure that it is consistent.

Acknowledgements

Include any individuals who provided you with help during your research, such as help with language, writing or proof reading, in the acknowledgements section. Acknowledgements should be placed in a separate section which appears directly before the reference list. Do not include acknowledgements on your title page, as a footnote to your title, or anywhere else in your article other than in the separate acknowledgements section.

Author contributions: CRediT

Corresponding authors are required to acknowledge co-author contributions using [CRediT \(Contributor Roles Taxonomy\)](#) roles:

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Funding acquisition
- Investigation
- Methodology
- Project administration
- Resources
- Software
- Supervision
- Validation
- Visualization
- Writing – original draft

- Writing – review and editing

Not all CRediT roles will apply to every manuscript and some authors may contribute through multiple roles.

We advise you to read [more about CRediT and view an example of a CRediT author statement](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendices

We ask you to use the following format for appendices:

- Identify individual appendices within your article using the format: A, B, etc.
- Give separate numbering to formulae and equations within appendices using formats such as Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc. and in subsequent appendices, Eq. (B.1), Eq. (B. 2) etc. In a similar way, give separate numbering to tables and figures using formats such as Table A.1; Fig. A.1, etc.

References

References within text

Any references cited within your article should also be present in your reference list and vice versa. Some guidelines:

- References cited in your abstract must be given in full.

- We recommend that you do not include unpublished results and personal communications in your reference list, though you may mention them in the text of your article.
- Any unpublished results and personal communications included in your reference list must follow the standard reference style of the journal. In substitution of the publication date add "unpublished results" or "personal communication."
- References cited as "in press" imply that the item has been accepted for publication.

Linking to cited sources will increase the discoverability of your research.

Before submission, check that all data provided in your reference list are correct, including any references which have been copied. Providing correct reference data allows us to link to abstracting and indexing services such as Scopus, Crossref and PubMed. Any incorrect surnames, journal or book titles, publication years or pagination within your references may prevent link creation.

We encourage the use of Digital Object Identifiers (DOIs) as reference links as they provide a permanent link to the electronic article referenced. See the example below, though be aware that the format of such citations should be adapted to follow the style of other references in your paper.

DOI link example (for an article not yet in an issue):

VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambek W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>.

Reference format

This journal does not set strict requirements on reference formatting at submission. Some guidelines:

- References can be in any style or format as long as the style is consistent.
- Author names, journal or book titles, chapter or article titles, year of publication, volume numbers, article numbers or pagination must be included, where applicable.
- Use of DOIs is recommended.

Our journal reference style will be applied to your article after acceptance, at proof stage. If required, at this stage we will ask you to correct or supply any missing reference data.

Reference style

Indicate references by adding a number within square brackets in the text. You can refer to author names within your text, but you must always give the reference number, e.g., "as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result".

Number references in the order they appear in your article.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, T. Handgraaf, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2020) 51 – 59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2020.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, T. Handgraaf, R.A. Lupton, 2022. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in a book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2020, pp. 281 - 304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2023 (accessed 13 March 2023).

Reference to a dataset:

[6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions [dataset], Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.1234/abc12nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)* [software], Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.1234/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations

We ask you to abbreviate journal names according to the [List of Title Word Abbreviations](#) (LTWA).

Web references

When listing web references, as a minimum you should provide the full URL and the date when the reference was last accessed. Additional information (e.g. DOI, author names, dates or reference to a source publication) should also be provided, if known.

You can list web references separately under a new heading directly after your reference list or include them in your reference list.

Data references

We encourage you to cite underlying or relevant datasets within article text and to list data references in the reference list.

When citing data references, you should include:

- author name(s)
- dataset title
- data repository
- version (where available)
- year
- global persistent identifier

Add [dataset] immediately before your reference. This will help us to properly identify the dataset. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

We ask you to mark preprints clearly. You should include the word "preprint" or the name of the preprint server as part of your reference and provide the preprint DOI.

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, use the formal publication as your reference.

If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but they are not yet formally published, you may reference the preprint.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in popular reference management software products. These include products that support [Citation Style Language \(CSL\)](#) such as [Mendeley Reference Manager](#).

If you use a citation plug-in from these products, select the relevant journal template and all your citations and bibliographies will automatically be formatted in the journal style. We advise you to [remove all field codes](#) before submitting your manuscript to any reference management software product.

If a template is not available for this journal, follow the format given in examples in the reference style section of this Guide for Authors.

Submitting your Manuscript

Submission checklist

Before completing the submission of your manuscript, we advise you to read our submission checklist:

- One author has been designated as the corresponding author and their full contact details (email address, full postal address and phone numbers) have been provided.
- All files have been uploaded, including keywords, figure captions and tables (including a title, description and footnotes) included.
- Spelling and grammar checks have been carried out.
- All references in the article text are cited in the reference list and vice versa.
- Permission has been obtained for the use of any copyrighted material from other sources, including the Web.
- For gold open access articles, all authors understand that they are responsible for payment of the article publishing charge (APC) if the manuscript is accepted. Payment of the APC may be covered by the corresponding author's institution, or the research funder.

Submit online

Our online submission system guides you through the process steps of entering your manuscript details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process.

Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the editor's decision and requests for revision, is sent by email.

Please follow this link to [submit your paper](#).

After Receiving a Final Decision

Article Transfer Service

If your manuscript is more suitable for an alternative Elsevier journal, you may receive an email asking you to consider transferring your manuscript via the [Elsevier Article Transfer Service](#).

The recommendation could come from the journal editor, a dedicated [in-house scientific managing editor](#), a tool-assisted recommendation or a combination.

If you agree with the recommendation, your manuscript will be transferred and independently reviewed by the editors of the new journal. You will have the opportunity to make revisions, if necessary, before the submission is complete at the destination journal.

Publishing agreement

Authors will be asked to complete a publishing agreement after acceptance. The corresponding author will receive a link to the online agreement by email. We advise you to read [Elsevier's policies related to copyright](#) to learn more about our copyright policies and your, and your employer's/institution's, additional rights for subscription and gold open access articles.

License options

Authors will be offered [open access user license options](#) which will determine how you, and third parties, can reuse your gold open access article. We advise that you review these options and any funding body license requirements before selecting a license option.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Permission for copyrighted works

If excerpts from other copyrighted works are included in your article, you must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) within your article using [Elsevier's permission request and license form](#) (Word).

Proof correction

To ensure a fast publication process we will ask you to provide proof corrections within two days.

Corresponding authors will be sent an email which includes a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to Word. You can edit text, comment on figures and tables and answer questions raised by our copy editor. Our web-based proofing service ensures a faster and less error-prone process.

You can choose to annotate and upload your edits on the PDF version of your article, if preferred. We will provide you with proofing instructions and available alternative proofing methods in our email.

The purpose of the proof is to check the typesetting, editing, completeness and correctness of your article text, tables and figures. Significant changes to your article at the proofing stage will only be considered with approval of the journal editor.

Share Link

A customized [Share Link](#), providing 50 days free access to the final published version of your article on [ScienceDirect](#), will be sent by email to the corresponding author. The Share Link can be used to share your article on any communication channel, such as by email or on social media.

For an extra charge, you will be provided with the option to order paper offprints. A link to an offprint order form will be sent by email when your article is accepted for publication.

A Share Link will not be provided if your article is published gold open access. The final published version of your gold open access article will be openly available on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

