



Eficácia da terapia fotodinâmica do ácido 5-aminolevulínico associado ao LED vermelho em biofilmes polimicrobianos formados em titânio

Palavras-chave: Implantes dentários -1, Biofilme-2, Fototerapia-3, Titânio-4

Autores:

João Vitor Suzano Teixeira — FOP-UNICAMP,

Maria Helena Rossy Borges — FOP-UNICAMP,

Samuel Santana Malheiros — FOP-UNICAMP,

Thais Terumi Sadamitsu Takeda — FOP- UNICAMP,

Bruna Egumi Nagay — FOP-UNICAMP

Raphael Cavalcante Costa — FOP-UNICAMP

Valentim Adelino Ricardo Barão (orientador) — FOP-UNICAMP

INTRODUÇÃO

A utilização de implantes dentários tem se difundido amplamente, resultando em um aumento dos casos de mucosite e peri-implantite (Costa et al., 2021), que são processos inflamatórios dos tecidos ao redor dos implantes. O sucesso dos implantes está diretamente relacionado à manutenção e aos cuidados dos tecidos periodontais (Esposito et al., 1998). Portanto, é imprescindível aprofundar os estudos sobre descontaminação e tratamento das doenças peri-implantares.

O tratamento da peri-implantite inclui procedimentos tanto cirúrgicos quanto não-cirúrgicos, que podem envolver instrumentação mecânica, terapias antimicrobianas, fototerapia e lasers (Renvert et al., 2008; Subramani & Wismeijer, 2012). No entanto, ainda não há um tratamento padrão-ouro definido. As terapias de descontaminação mecânica incluem a debridamento do implante com curetas de titânio, escovas de polimento, dispositivos ultrassônicos e sistemas de pó abrasivo (Schwarz et al., 2005; Gosau et al., 2010). Embora essas terapias mecânicas mostrem sucesso na limpeza da superfície dos implantes, elas também podem danificar as microestruturas e a geometria dos implantes (Al-Hashedi et al., 2017), afetando sua longevidade e funcionalidade.

Uma alternativa aos tratamentos mecânicos é a terapia fotodinâmica, que age de duas maneiras principais. Indiretamente, utiliza moléculas fotossensíveis que, ao serem ativadas por um comprimento de onda específico, geram espécies reativas de oxigênio, que oxidam e desestruturam os microrganismos (Kwiatkowski et al., 2018). Diretamente, a terapia fotodinâmica utiliza fótons de alta energia, como o ultravioleta, que danificam o DNA bacteriano e outras estruturas vitais da célula (Schuch & Menck, 2010). Dentre os tratamentos fotodinâmicos indiretos, destaca-se o uso do ácido aminolevulínico (ALA), um

precursor natural da molécula fotossensível protoporfirina IX. Embora a protoporfirina IX seja produzida naturalmente na mitocôndria, o ALA pode ser administrado exogenamente como uma pró-droga (Wachowska et al., 2011). A preferência pelo uso do precursor em vez da molécula fotossensível em si deve-se à melhor absorção intracelular do precursor, resultando em maior efeito oxidante (Peng et al., 1997). O ALAD é um gel contendo esse precursor em uma concentração de 5%, que é ativado por luz com comprimento de onda de 630 nm \pm 10 nm. Sua fotoativação desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio dentro da célula bacteriana. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito do Gel ALAD contra biofilmes microbiologicamente complexos, como os encontrados ao redor dos implantes dentários. Portanto, dado o potencial promissor do ALAD na terapia fotodinâmica para descontaminação de implantes, pesquisas devem investigar detalhadamente sobre seu efeito em biofilmes patogênicos peri-implantares e possível aplicabilidade clínica. Desta forma, a terapia fotodinâmica pode emergir como uma alternativa eficaz e menos danosa às terapias mecânicas tradicionais no combate às doenças peri-implantares.

METODOLOGIA

1 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/Unicamp) para anuência da participação dos voluntários no estudo in situ. Apenas os voluntários que concordarem e assinarem o termo de consentimento serão incluídos no estudo. O número CAAE do projeto é 77316924.2.0000.5418.

2 Preparo das Amostras

Discos cpTi grau II (Realum Indústria e Comércio de Metais Puros e Ligas Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foram polidos com lixas de SiC de granulação #320 e #400 (Carbimet 2, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em polidora automática (EcoMet 300 Pro com Auto-Met 250; Buehler) para padronizar as condições da superfície. Para reproduzir o perfil morfológico das superfícies dos implantes comerciais, o tratamento “sandblasted and acid-etched” (SLA) foi realizado. Para isso, as superfícies de SLA foram obtidas por jateamento de óxido de alumínio (Al₂O₃) a uma distância de 50 mm com 90 de angulação e 0,45 MPa de pressão por 30 s e tratadas quimicamente com uma solução aquosa contendo 18% de HCl (v/v) e 49% de H₂SO₄ (v/v) a 60 C por 1 h, de acordo com procedimentos padrão (Costa et al., 2020).

3 Modelo microcosmos de biofilme polimicrobiano

Para mimetizar a complexa microfauna do biofilme oral formado ao redor dos implantes, foi usado nesse estudo um modelo de microcosmo oriundo de saliva humana para a formação de biofilme multiespécie. Além disso, o inóculo de saliva será submetido a duas condições de incubação, uma aeróbica e outra anaeróbica, a fim de imitar a transição das condições de mucosite para peri-implantite. Para isso foram coletados saliva de quatro pacientes saudáveis, os quais estavam em jejum de no mínimo de 2 h (Souza et al., 2019b).

As amostras de titânio foram cobertas com saliva humana filtrada por 30 minutos à 37°C, a fim de promover a adsorção de proteínas e criar uma réplica da película salivar. Após a formação da película, todas as amostras foram transferidas para uma placa de 24 poços contendo o inóculo de saliva não filtrada, meio de cultura contendo 90% 'brain heart infusion' caldo (BHI) e sacarose 10%. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 24 horas em condições estáveis a 37°C e em CO₂ a 10%. As amostras foram diariamente lavadas com a solução de NaCl 0,9% e imersas em um meio de cultura fresco; esse procedimento foi repetido por dois dias sob condições aeróbicas, para simular a condição supragengival. Em seguida, as amostras foram submetidas à condições anaeróbicas (10% H₂, 5% CO₂, 85% N₂, 37°C), e o meio de cultura mFUM (modified fluid universal medium) foi renovado a cada 24 horas por 48 horas, para que haja um bom crescimento de patógenos peri-implanteres.

4 Formação dos grupos experimentais

As amostras foram preparadas e randomizadas nos seguintes grupos:

1) Controle: discos sem tratamento; 2) Controle positivo: discos tratados com gel de clorexidina (CHX) 2%; 3) Discos tratados com gel fotossensibilizante à base de ácido 5-aminolevulínico 5% (ALADENT, Melzo, Itália); 4) Discos irradiados com Luz tipo LED vermelha ($\lambda = 630 \pm 10\text{nm}$); 5) Fototerapia com Gel + Luz: discos foram tratados com gel ALADENT e irradiação com LED.

5 Descontaminação dos discos

Após a formação do biofilme, os discos foram submetidos aos tratamentos de acordo com os seus respectivos grupos. Para o grupo Gel, após a aplicação do gel os discos ficaram incubados por 7 minutos no escuro. Para o grupo Gel + Luz, as amostras foram expostas a uma luz LED com comprimento de onda de 630nm \pm 10 nm por 7 minutos, com potência de 380 mW/cm². A fonte de irradiação ficou aproximadamente 0,5mm de distância da amostra.

6 Análise do biofilme

6.1 Contagem de unidade formadora de colônia (UFC)

Após os respectivos tratamentos, os discos tratados foram transferidos para tubos criogênicos contendo 1 mL de NaCl 0,9%, agitados em vortex (AP-56, Phoenix) por 10 s e então sonicados (7 W por 30 s) (S 150D, Branson Ultrasonics Corp.) para destacar as células da superfície (Costa et al., 2020). Uma alíquota de 100 μ L da suspensão sonicada foi diluída sequencialmente em 900 μ L de NaCl 0,9% e 10 μ L de cada diluição foi semeada em duplicata em placas de petri contendo meio Columbia Blood Agar (CBA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado para contagem de microrganismos totais. As placas de CBA foram incubadas por 48 h. A contagem de UFC foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico.

6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de viabilidade por confocal

As amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura após os tratamentos. O biofilme sobre o disco foi fixado em solução Karnovsky (PBS, pH 7,2) por 2 horas, desidratado em banhos com concentrações crescentes de álcool etílico (70% etanol por 10 minutos, 95% etanol por 10 minutos e 100% etanol por 20 minutos) e secos em ar em temperatura ambiente (Nagay et al., 2019b). Os discos foram montados em stubs, revestidos com ouro e examinados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5600LV), a uma voltagem de aceleração de 15 kV (Pereira-Cenci et al., 2008). Para análise de viabilidade (presença de células vivas/mortas), as amostras foram analisadas por um microscópio invertido (DMI 600 CS) acoplado ao sistema operacional de confocal (Leica Microsystems CMS). As células vivas foram coradas em verde com 1 μ L/mL de reagente SYTO-9 (480–500 nm) e células mortas foram coradas em vermelho com 1 μ L/mL de solução de iodeto de propídio (490–635 nm). Os biofilmes foram incubados, protegidos da luz por 20 minutos à 30°C, e em seguida imagens foram capturadas em CLSM. As imagens foram analisadas por meio do software ZEN Blue (versão 2.3) para reconstruções (Souza et al. 2022).

6.3 Atividade metabólica

O ensaio de XTT foi utilizado para avaliar o efeito da terapia fotodinâmica com ALAD no metabolismo do biofilme. Para isso, o reagente XTT e o metossulfato de fenazina (PMS) foram preparados e misturados na proporção de 9:1. Em seguida, 100 μ L da solução contendo biofilmes foi transferida para placas de 96 poços junto com 100 μ L da solução XTT/PMS, incubadas a 37°C por 30 minutos no escuro. As alterações colorimétricas foram medidas a 492 nm usando um espectrofotômetro.

6.4 Quantificação de biomassa do biofilme

O peso seco do biofilme foi mensurado como um indicador de biomassa insolúvel. A princípio, 400 mL da solução vortexada contendo o biofilme coletado foi inserido em um tubo com peso verificado previamente. Posteriormente, o tubo contendo a amostra foi seco usando uma bomba à vacuo (SpeedVac™ SPD120) e pesado novamente para estimar o peso seco do biofilme em mg (Costa Oliveira et al. 2017).

6.5 Teste de viabilidade celular

Foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando o teste BacLight LIVE/DEAD Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen detection technologies, Eugene, OR, USA). As porcentagens de células foram posteriormente calculadas entre os valores obtidos nas amostras examinadas, para que houvesse maior precisão.

7 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade para determinação do teste mais adequado (paramétrico versus não paramétrico), com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

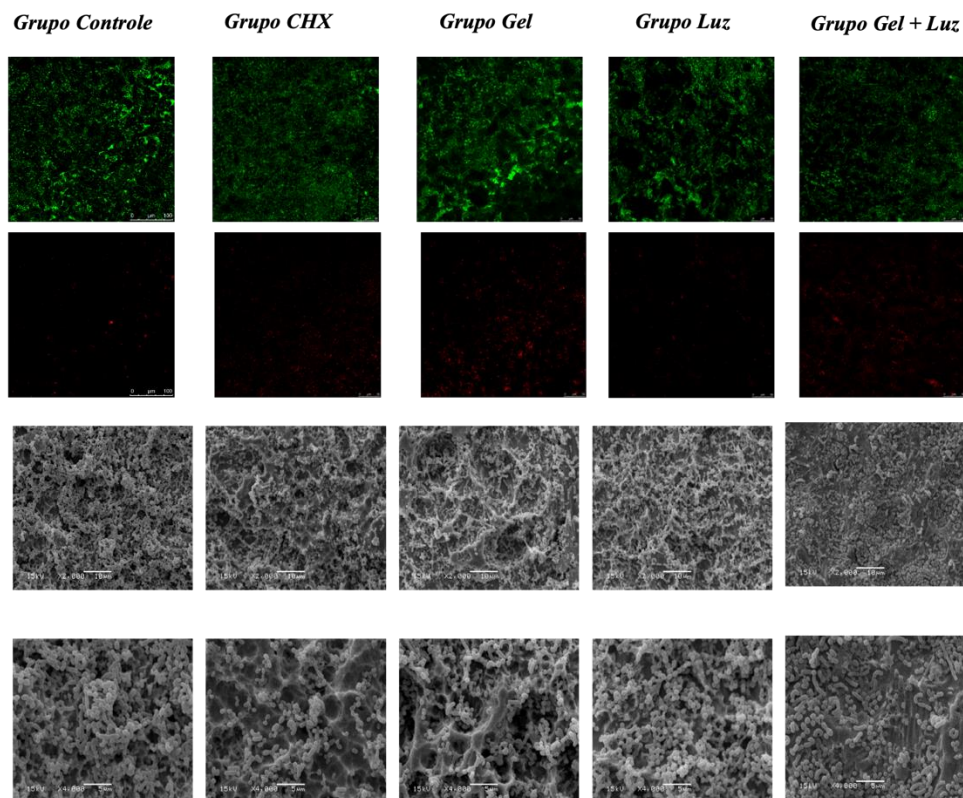


Figura 1: Imagens obtidas por microscopia confocal após a segunda etapa e por microscopia eletrônica de varredura, (aumentos 2000x e 4000x), após a segunda etapa (anaeróbica).

Observa-se por meio da microscopia confocal que o complexo biofilme polimicrobiano, sofreu reduções nos grupos Clorexidina e Gel + Luz, indicando assim a efetividade similar, e potencialmente maior, do gel ALAD quando associado a luz LED. Conseguimos inferir também que o gel isolado também foi capaz de inviabilizar os microrganismos. As imagens do microscópio eletrônico de varredura (MEV) nos revela a caracterização de superfície dos grupos avaliados, nos quais averiguamos uma diminuição acentuada da matriz extracelular e da quantidade de microrganismos nos grupos CHX, Gel isolado e Gel + Luz. Essa ocorrência dialoga com os resultados obtidos nas imagens de viabilidade celular. Ademais, as imagens de MEV permitem visualizar a diversidade que o biofilme multiespécie possui após as fases aeróbica e anaeróbica, mas também a complexidade que uma condição peri-implantar pode apresentar.

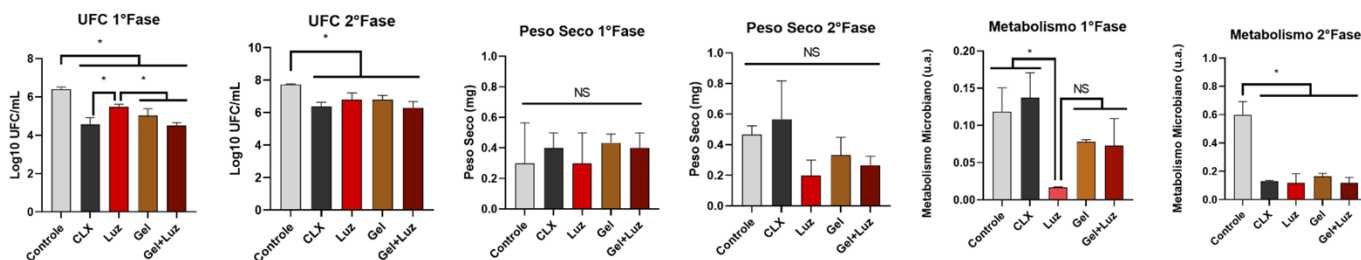


Figura 2: Gráficos gerados por meio de análise estatística dos resultados dos experimentos microbiológicos

Os gráficos formados pela análise da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) corroboram com as imagens microscópicas ao evidenciar as reduções nas populações bacterianas dos grupos Clorexidina e Gel + Luz. Somado a isso conseguimos constatar que o cultivo de um biofilme multiespécie com uma matriz extracelular robusta dificulta a penetração de tratamentos químicos auxiliares, não obstante, o gel de ácido aminolevulínico obteve uma efetividade similar à clorexidina em gel e foram capazes de promover uma degradação do biofilme bacteriano.

CONCLUSÕES

Assim como os demais tratamentos aplicados, o gel ALADENT associado à luz LED pode ser uma estratégia eficaz para a descontaminação dos discos de titânio e, conseqüentemente, manejo de doenças peri-implantares.

BIBLIOGRAFIA

- Radunović M, Petrini M, Vlajic T, et al. Effects of a novel gel containing 5-aminolevulinic acid and red LED against bacteria involved in peri-implantitis and other oral infections. *J Photochem Photobiol B*. 2020
- Rossi R, Rispoli L, Lopez MA, Netti A, Petrini M, Piattelli A. Photodynamic Therapy by Mean of 5-Aminolevulinic Acid for the Management of Periodontitis and Peri-Implantitis: A Retrospective Analysis of 20 Patients. *Antibiotics (Basel)*. 2022
- Costa RC, Souza JGS, Bertolini M, Retamal-Valdes B, Feres M, Barão VAR. Extracellular biofilm matrix leads to microbial dysbiosis and reduces biofilm susceptibility to antimicrobials on titanium biomaterial: An in vitro and in situ study. *Clin Oral Implants Res*. 2020
- Petrini M, Di Lodovico S, Iezzi G, et al. Photodynamic Antibiofilm and Antibacterial Activity of a New Gel with 5-Aminolevulinic Acid on Infected Titanium Surfaces. *Biomedicines*. 2022
- Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, et al. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol*. 2017
- A.P. Schuch, C.F.M. Menck, The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight, *J. Photochem. Photobiol. B Biol*. 2010
- Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol*. 1997
- Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, et al. Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules*. 2011
- Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018
- Al-Hashedi AA, Laurenti M, Benhamou V, Tamimi F. Decontamination of titanium implants using physical methods. *Clin Oral Implants Res*. 2017
- Sanz M, Chapple IL; Working Group 4 of the VIII European Workshop on Periodontology. Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4. *J Clin Periodontol*. 2012
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998
- Lang NP, Pjetursson BE, Tan K, Brägger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. II. Combined tooth--implant-supported FPDs. *Clin Oral Implants Res*. 2004
- Papaspyridakos P, Chen CJ, Chuang SK, Weber HP, Gallucci GO. A systematic review of biologic and technical complications with fixed implant rehabilitations for edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012
- Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM Jr, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2013
- Dini C, Costa RC, Bertolini M, Shibli JA, Feres M, Klein MI, de Avila ÉD, Souza JGS, Barão VAR. In-vitro polymicrobial oral biofilm model represents clinical microbial profile and disease progression during implant-related infections. *J Appl Microbiol*. 2023.