

“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS OBTIDA DE PACIENTES COM DIFERENTES CONDIÇÕES PERIODONTAIS SOBRE O BIOFILME SUBGENGIVAL MULTIESPÉCIES”

Palavras-Chave: FIBRINA RICA EM PLAQUETAS, AÇÃO ANTIMICROBIANA, DOENÇA PERIODONTAL

Autores(as):

FELIPE MARCONDES, FOP – UNICAMP

GUSTAVO QUILLES VARGAS (coorientador), FOP – UNICAMP

Prof. Dr. BRUNO BUENO-SILVA (orientador), FOP – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A periodontite é uma doença inflamatória crônica e multifatorial que afeta os tecidos de suporte dos dentes, sendo desencadeada por uma resposta imune-inflamatória do hospedeiro frente à presença de microrganismos periodontopatogênicos no biofilme subgengival (Armitage, 1999). Em 2019, a classificação das doenças periodontais e peri-implantares foi atualizada, unificando os antigos diagnósticos de periodontite crônica e agressiva em um apenas “periodontite”, sendo avaliada em estágios (I, II, III e IV) e graus (A, B e C), que refletem, respectivamente, a severidade e a velocidade de progressão da doença (Caton et al., 2018).

O principal fator etiológico da periodontite é o biofilme bacteriano periodontopatogênico, composto por comunidades complexas e estruturadas de bactérias aderidas às superfícies dentárias (Socransky & Haffajee, 2002). Os microrganismos associados à doença são predominantemente gram-negativos, anaeróbios e dotados de motilidade (Socransky and Haffajee, 2002; 2005). Espécies são reunidas em complexos amarelo, verde, roxo e azul que foram associados à saúde, já as três espécies do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, foram fortemente relacionado ao aumento da profundidade de sondagem e do sangramento gengival (Socransky et al., 1988). Essas espécies desempenham papel central na disbiose do microbioma subgengival e na perpetuação da resposta inflamatória induzida pelo biofilme (Kinane et al., 2017).

A raspagem e alisamento radicular (RAR) constitui o tratamento de primeira escolha, pois é capaz de reduzir os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem e sangramento à sondagem, e favorecer o ganho do nível clínico de inserção e a mudança do perfil microbiano (Feres et al., 2015). Ela consiste na remoção mecânica do cálculo subgengival e, também, na desorganização do biofilme supra e subgengival. Contudo, em áreas com bolsas periodontais profundas ou de difícil acesso, como lesões infra-ósseas e regiões de furca, a eliminação completa dos microrganismos é desafiadora, favorecendo a recidiva (Cugini et al., 2000). Nestes casos, terapias regenerativas têm sido indicadas, com destaque para a utilização da fibrina rica em plaquetas (PRF), uma fonte de fatores de crescimento autógeno derivados do sangue colhido do próprio paciente sem uso de anticoagulantes. Esta membrana forma uma matriz de fibrina tridimensional, que atua como arcabouço para regeneração de tecidos e veículo

de liberação sustentada de fatores de crescimento e mediadores bioativos (Miron et al., 2017; Castro et al., 2019).

Na odontologia, a PRF tem sido aplicada com sucesso em diferentes contextos clínicos, incluindo regeneração periodontal, fechamento de feridas e cicatrização dos alvéolos pós extração. Em grande parte desses procedimentos, a PRF é colocada abaixo dos retalhos gengivais da mucosa oral em contato direto com os fibroblastos (Bi et al., 2020). Além disso, foi observado que a PRF obtida de pacientes com doença periodontal apresenta maior atividade inibitória sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* do que a PRF de pacientes saudáveis, sugerindo que a condição inflamatória do doador pode influenciar na composição e na eficácia antimicrobiana da PRF (Pham & Tran, 2023).

No entanto, uma revisão sistemática publicada em 2023, que selecionou 16 artigos, em nenhum dos trabalhos foi verificada a ação da PRF em biofilme multiespécies. Apenas dois trabalhos avaliaram a ação da PRF sobre o biofilme com duas espécies (Jasmine et al., 2020; Rafiee et al., 2020), alguns dos outros trabalhos dessa revisão coletaram biofilme diretamente de bolsas periodontais dos pacientes, mas não avaliaram especificamente nenhuma bactéria (Joshi et al., 2016; Karde et al., 2017), e o restante dos trabalhos analisou ação da PRF em bactérias planctônicas.

Diante da escassez de dados sobre a ação da PRF em modelos mais complexos, este estudo propõe avaliar sua atividade antimicrobiana, utilizando um modelo *ex-vivo* de biofilme subgengival multiespécie. Serão analisadas membranas de PRF obtidas de pacientes com diferentes condições periodontais, com o objetivo de verificar se a eficácia antimicrobiana do material varia de acordo com a condição periodontal (saudável ou doente) deles.

METODOLOGIA:

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOP-UNICAMP (CAAE Nº 78356824.0.0000.5418). As amostras de PRF foram coletadas de 4 participantes de cada um dos grupos descritos abaixo. O cálculo amostral foi determinado por meio do Software G-Power utilizando ANOVA (análise de variância) com nível de significância $\alpha=0.05$ e poder do teste estatístico 80%. A diferença mínima a ser detectada entre as médias dos tratamentos foi considerada de 20 e a estimativa de desvio padrão foi considerada como 10, valores estimados de acordo com os resultados da atividade metabólica dos artigos prévios com modelo de biofilme do presente grupo de pesquisa.

Foram selecionados dois grupos de participantes: saudáveis (G1) e com doença periodontal (G2). Os participantes com doença periodontal foram classificados como portadores de periodontite estágio III ou IV, grau A ou B. As amostras de sangue de cada participante de cada grupo foram coletadas em tubos plásticos à vácuo. A punção foi realizada conforme protocolos específicos para obtenção do PRF, coletando a quantidade necessária de tubos na mesma punção, em veias periféricas do braço, sem remoção do garrote até o término da coleta.

Imediatamente, os tubos foram colocados na centrífuga DAIKI e centrifugados a 2110 rpm durante 10 minutos para formação das membranas de PRF. Após centrifugação, os coágulos de PRF foram colocados em caixas metálicas estéreis específicas "PRF box", para desidratação e obtenção das membranas. Os fragmentos de membrana foram padronizados utilizando lâmina punch para biópsia e utilizados para o tratamento dos biofilmes subgengivais multiespécies para avaliação dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana da PRF.

A metodologia do biofilme multiespécie foi realizada de acordo com Velsko et al., 2018, onde amostras do biofilme subgengival foram coletadas do sulco gengival do primeiro molar superior de cada participante. Imediatamente após a coleta foram armazenados em solução salina a 4°C, enquanto 5mL de saliva não estimulada foram coletados e diluídos 1:10 em solução salina. As amostras de saliva diluída foram centrifugadas a 1200g x 10 minutos e filtradas para remoção de partículas grandes.

As amostras de biofilme foram sonicadas em banho de água para quebrar o biofilme e armazenadas a 4°C enquanto os discos de hidroxiapatita (HA) foram preparados para inoculação do biofilme. Os discos de HA foram colocados em poços de placa de cultura de 24 poços, revestidos com a saliva do doador durante 2h à temperatura ambiente, cuja amostra de biofilme foi adicionada posteriormente. Após esse período, a saliva foi removida e 2mL de meio de cultura de tripton de soja (TSB) suplementado com 5 µg/mL de hemina e 1 µg/mL de menadiona foram adicionados a cada poço. Em cada um desses poços foram adicionados fragmentos da membrana de Fibrina Rica em Plaquetas, do mesmo doador que o biofilme e a saliva. As amostras de biofilme foram agitadas em vórtex para re-suspensão e os poços foram inoculados com 50 µL de amostra de biofilme do também mesmo doador que a saliva utilizada para revestir os discos de HA. As placas foram colocadas em anaerobiose a 37° par crescimento durante um período de 7 dias, sendo que houve troca do meio de cultura a cada 48 horas.

Após 7 dias de formação, os discos foram coletados em solução salina e adicionados em banho de ultrassom por 10 minutos para dispersão do biofilme aderido ao disco. Em seguida, foi realizada a análise a atividade metabólica. A atividade metabólica do biofilme foi avaliada por meio da redução do XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) e espectrofotometria. O XTT diferencia células metabolicamente ativas e inativas, sendo o substrato amarelo reduzido a formazano laranja solúvel por células bacterianas vivas devido à ação de desidrogenases. A mudança de cor é medida por espectrofotometria para determinar a taxa de redução, que serve como medida indireta da atividade metabólica bacteriana. Para isso, as amostras de biofilme serão incubadas em meio BHI fresco contendo hemina (1%) e solução de XTT (200 µg/mL), e a conversão do XTT será lida a 450 nm após 3 horas de incubação anaeróbica a 37 °C (Soares et al., 2015). Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos a partir das amostras de pacientes saudáveis periodontalmente e pacientes com doença periodontal está mostrado abaixo. O resultado da análise das amostras de biofilme tratado com PRF em sua forma de membrana coletado de pacientes saudáveis demonstrou uma redução de 20,5% da atividade metabólica do biofilme tratado com PRF em relação ao biofilme sem tratamento algum. A análise estatística por meio do teste ANOVA seguido do teste de Tukey revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,01$), indicando que a membrana de PRF tem ação antimicrobiana, como podemos observar na figura 1A.

Já no grupo composto por pacientes periodontais (Figura 1B), a análise das amostras revelou que quando em contato com a membrana de PRF, há uma redução de 22,9% na atividade metabólica, com médias de 77,1% para membrana e 100% para controle, entretanto não há diferença estatística significativa ($p = 0,05$) entre as amostras, como podemos ver na figura 1B (letras iguais indicam que não há diferença estatística). Isso pode indicar que a resposta do biofilme a membrana de PRF pode variar conforme a condição periodontal do paciente, aspecto já discutido por Pham et al. (2023) ao avaliar diferenças na eficácia da PRF entre pacientes saudáveis e com doença periodontal.

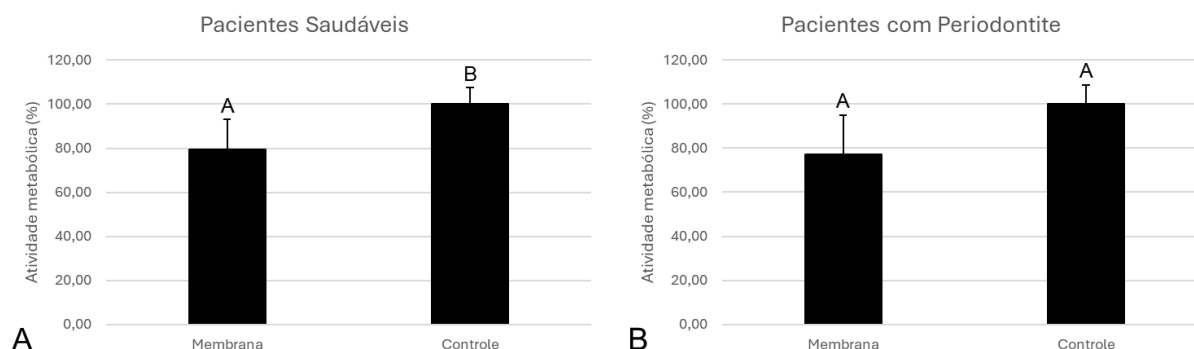


Figura 1: **A:** Média e desvio padrão da atividade metabólica de amostras de biofilme de pacientes saudáveis periodontalmente tratados com membrana de PRF (membrana) e sem tratamento (controle); **B:** Média e desvio padrão da atividade metabólica de amostras de biofilme de pacientes periodontais tratados com membrana de PRF (membrana) e sem tratamento (controle). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa e letras iguais representam que não há diferença estatisticamente significativa por meio do teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

Quando comparados entre si (figura 2), os biofilmes tratados com PRF obtidos de pacientes saudáveis e pacientes com periodontite não apresentaram diferença estatisticamente ($p = 0,55$). Sugerindo que a PRF pode agir de maneira semelhante independentemente da condição do paciente.

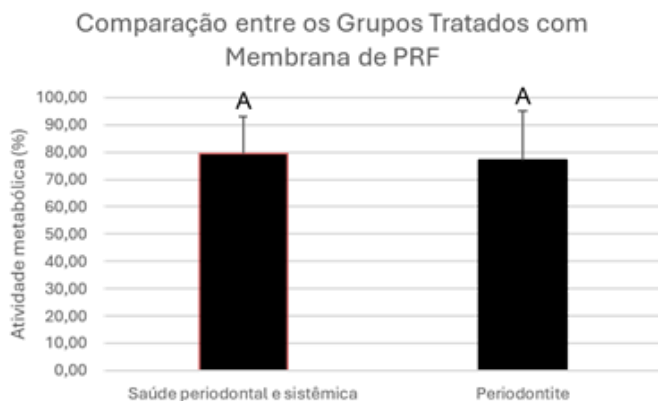


Figura 2: Média e desvio padrão de atividade metabólica pacientes saudáveis periodontalmente e com doença periodontal. Letras iguais representam que não há diferença estatisticamente significativa por meio do teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

CONCLUSÕES:

A PRF demonstrou efeito antimicrobiano sobre biofilmes subgingivais, com redução significativa da atividade metabólica no grupo de pacientes saudáveis. No grupo periodontal, apesar da redução observada, não houve diferença estatística. A comparação entre os grupos também não revelou diferenças significativas, sugerindo que a condição periodontal do doador pode não influenciar de forma relevante essa atividade. Os dados indicam que a PRF pode ser uma estratégia auxiliar no controle microbiológico em terapias periodontais e periimplantares, embora estudos futuros sejam necessários para validação.

BIBLIOGRAFIA

1. **ARMITAGE, G. C.** Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, v. 4, n.1, p. 1-6, 1999.
2. **BI, J. et al.** Leucocyte- and platelet-rich fibrin regulates expression of genes related to early wound healing in human gingival fibroblasts. *J. Clin. Periodontol.*, v. 47, n. 7, p. 851–862, jul. 2020.
3. **CASTRO, A. B. et al.** Antimicrobial capacity of Leucocyte-and Platelet Rich Fibrin against periodontal pathogens. *Sci Rep*, v. 9, n. 1, p. 8188, 2019.
4. **CATON, J. G. et al.** A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*, v. 89, Suppl 1, p. S1-S8, 2018.
5. **CUGINI, M. A. et al.** The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol*, v. 27, n. 1, p. 30-6, 2000.
6. **FERES, M. et al.** Group B. Initiator paper. Non-surgical periodontal therapy: mechanical debridement, antimicrobial agents and other modalities. *J Int Acad Periodontol*, v. 17, n. 1 Suppl, p. 21-30, 2015.

7. **JASMINE, S. et al.** Antimicrobial and antibiofilm potential of injectable platelet rich fibrin-a second-generation platelet concentrate-against biofilm producing oral staphylococcus isolates. *Saudi J Biol Sci*, v. 27, n. 1, p. 41-6, 2020.
8. **JOSHI, C. P. et al.** Autologous Platelet Rich Fibrin as a potential antiperiopathogenic agent: An invitro study. *Int J Periodontol Implantol*, v. 1, n. 2, p. 50-4, 2016.
9. **KARDE, P. A. et al.** Comparative evaluation of platelet count and antimicrobial efficacy of injectable platelet-rich fibrin with other platelet concentrates: An. *J Indian Soc Periodontol*, v. 21, n. 2, p. 97-101, 2017.
10. **KINANE, D. F. et al.** Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*, v. 3, p. 17038, 2017.
11. **MIRON, R. J. et al.** Basics of Platelet-Rich Fibrin Therapy. *Dent Today*, v. 36, n. 4, p. 74-6, 2017.
12. **PHAM, T. A. V.; TRAN, T. T. P.** Antimicrobial effect against. *J Oral Biol Craniofac Res*, v. 13, n. 2, p. 332-6, 2023.
13. **RAFIEE, A. et al.** Antimicrobial Efficacy of a Novel Antibiotic-Eluting Injectable Platelet-Rich Fibrin Scaffold against a Dual-Species Biofilm in an Infected Immature Root Canal Model. *Biomed Res Int*, v. 2020, p. 6623830, 2020.
14. **SOARES, G. M. et al.** Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 5, p. 2791-8, 2015.
15. **SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, v. 28, p.12-55, 2002.
16. **SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.** Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, v. 38, p.135-87, 2005.
17. **SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; DZINK, J. L.** Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol*, v. 15, n. 7, p. 440-4, 1988.
18. **VELSKO, I. M.; SHADDOX, L. M.** Consistent and reproducible long-term in vitro growth of health and disease-associated oral subgingival biofilms. *BMC Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 70, 11 jul. 2018. DOI: 10.1186/s12866-018-1212-x.