



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
PARA O TRATAMENTO DA PERI-IMPLANTITE:
ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO UMA NOVA
OPÇÃO DE FONTE DE LUZ**

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

Por:

Daniel Franko Andreolli Infante

Viseu, 2022



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
PARA O TRATAMENTO DA PERI-IMPLANTITE:
ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO UMA NOVA
OPÇÃO DE FONTE DE LUZ**

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

Por:

Daniel Franko Andreolli Infante

Orientadora: Professora Doutora Anna Carolina Volpi Mello- Moura
Co-orientadora: Doutora Ana Peixoto

Viseu, 2022

**“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva
provar o contrário.”**

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Quero dedicar este modelo de trabalho à minha família, a cada um deles, eles fizeram-me chegar até aqui, a sua ajuda emocional e a sua presença em todos os momentos fizeram-me atingir o meu objetivo, aquele que procuro há anos e que aqui chega ao fim. Aos meus amigos e a todas as pessoas que estiveram presentes quando precisei, só tenho palavras de agradecimento para todos e dizer-lhes que aqui começo outra etapa com muito mais vontade.

AGRADECIMENTOS

Neste longo caminho que eu tive que passar e que me ensinou tantas coisas tanto académicas como pessoais, foram apresentadas muitas pessoas que me ajudaram a chegar até aqui.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Anna Moura e à minha co-orientadora Professora Doutora Ana Peixoto pela disponibilidade e pelo constante seguimento que tiveram para mim desde o primeiro momento deste projeto.

Aos meus pais, por terem estado comigo de forma incondicional, por me apoiarem desde o primeiro dia e me darem toda a paciência que precisava.

Aos meus irmãos, por me aconselharem sempre nos momentos mais necessários.

A meu grande amigo e binômio Santiago Torres por todo o tempo dedicado, por seus conselhos e pelo apoio para mim em todo momento.

Gostaria também de agradecer ao Straumann por nos ter deixado os seus implantes dentários como material necessário para o nosso trabalho prático.

E por último, quero agradecer à Universidade Católica Portuguesa, a todos e a cada um daqueles professores e professoras que nos foram encontrando ao longo deste percurso tão longo, por nos terem ensinado da melhor maneira possível, mesmo existindo uma pandemia durante tanto tempo, pelo interesse e a vontade de que recebêssemos todos os conceitos e a prática necessária para poder sair para o mundo do trabalho.

A todos os meus maiores agradecimentos

RESUMO

Introdução

Os implantes dentários representam atualmente uma das alternativas mais seguras para a substituição dos dentes em falta, quando existe o correto diagnóstico e indicação clínica. Entretanto são descritas algumas complicações relacionadas com a colocação de implantes, como por exemplo a doença peri-implantar, que é a alteração patológica inflamatória dos tecidos que rodeiam um implante. Dentro do conceito de doença peri-implantar, a peri-implantite, se reflete um quadro clínico no qual, juntamente com a reação inflamatória da mucosa peri-implantar, há uma perda de suporte ósseo para o implante, que é clínica e radiograficamente evidente. Portanto, o objetivo deste projeto de investigação foi determinar a eficácia da PDT (terapia fotodinâmica) como uma solução sustentável para o tratamento da peri-implantite através da utilização porfirinas como fotossensibilizadores e fotopolimerizador como fonte de luz.

Métodos

Foi realizado um estudo *in vitro* para avaliar o efeito antimicrobiano, da PDT, utilizando o sal dissódico da ProtoporfirinalX (Proto IX) como um fotossensibilizador, e de uma fonte de luz denominada fotopolimerizador.

Resultados

O protocolo proposto que indica a realização da PDT usando ProtoIX e fotopolimerizador mostrou ser eficaz na fotoinativação de *Cândida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Apesar das taxas de inativação tenham sido mais baixas que a PDT convencional, os resultados desse estudo mostraram que também é possível inativar estes dois microrganismos periodontopatogénicos.

Conclusões

Conclui-se que existe uma abordagem terapêutica eficaz para tratar a peri-implantite a partir da PDT utilizando porfirinas comerciais, já aprovadas para uso clínico, como fotossensibilizador, e fonte de luz azul proveniente de um aparelho de fotopolimerizador. Como a luz azul é um equipamento disponível em todas as práticas dentárias, o desenvolvimento deste protocolo pode ser facilmente implementado de uma forma mais viável nas clínicas dentárias, sem a necessidade de investir em novos dispositivos tecnológicos.

Palavras Chaves

Porfirinas, peri-implantite, terapia fotodinâmica antimicrobiana, fotopolimerizador.

ABSTRACT

Introduction

Dental implants are currently one of the safest alternatives for the replacement of missing teeth, when there is a correct diagnosis and clinical indication. However, some complications related to implant placement are described. Peri-implant disease is the inflammatory pathological alteration of the tissues surrounding a loaded implant and is frequent in oral and facial Implantology. Within the concept of peri-implant disease, two entities are described: mucositis and peri-implantitis. The peri-implantitis reflects a clinical picture in which, along with the inflammatory reaction of the peri-implant mucosa, there is a loss of bone support for the implant, which is clinically and radiologically evident. Therefore, the objective of this research project is to determine the effectiveness of Photodynamic therapy (PDT) (as a sustainable solution for the treatment of peri-implantitis through the use of porphyrins as photosensitizers and light-curing as light source).

Methods

An *in vitro* study was carried out to evaluate the antimicrobial effect, to evaluate the effects of PDT using the disodium salt of Protoporphyrin IX (Proto IX) as a photosensitizer and the dental curing light as light source.

Results

The adapted protocol of the PDT using ProtoIX and the dental curing light showed to be effective in the photoinactivation of *C. albicans* and *E. faecalis*. Despite lower inactivation rates, PDT studies on implants showed that it is also possible to inactivate these two periodontopathogenic microorganisms.

Conclusions

In this work we demonstrated that there is an effective therapeutic approach to treat periimplantitis from PDT using commercial porphyrins already approved for clinical use as a photosensitizer and blue light source from a dental curing light. This blue light from a photopolymerizer is available in all dental clinics, the development of this protocol can be easily implemented in all dental clinics, without the need to invest in new technological devices.

Keywords

Porphyrins, periimplantitis, antimicrobial photodynamic therapy, dental curing light.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução.....	1
1.1 Objetivo Geral.....	5
1.2 Objetivos específicos.....	5
2. Materiais e métodos.....	6
2.1 Cultura dos microorganismos.....	6
2.2 Fotossensibilizadores.....	6
2.3 Fonte de luz.....	7
2.4 Implantes dentários.....	7
2.5 Ensaios <i>in vitro</i>	7
2.6 Ensaios em implantes.....	8
3. Resultados.....	10
4. Discussão.....	16
5. Conclusões.....	18
6. Bibliografía.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- *C.albicans*: Ensaios *in vitro* (10 μ M) Irradiação 0min/10min/20min

Figura 2- *C.albicans*: Ensaios *in vitro* (20 μ M) Irradiação 0min/10min/20min

Figura 3- *E.faecalis*: Ensaios *in vitro* (20 μ M) Irradiação 0min /10min /20min

Figura 4- *E.faecalis*: Ensaios *in vitro* (20 μ M) Irradiação 0min/ 5min/10min

Figura 5- *C.albicans*: Implantes (20 μ M) Irradiação 0min/20min

Figura 6- *E.faecalis* : Implantes (20 μ M) Irradiação 0min/10min

ABREVIATURAS

UCP- Universidade Católica Portuguesa

PDT- Photodynamic therapy

Proto IX – Protoporfirina IX

BHI – Brain Heart Infusion

SDB – Sabouraud Dextrose Broth

PBS – Phosphate-buffered saline

UFC – Unidades formadoras de colonias

Ct – Grupo control

Ct Esc – Grupo control escuro

1. INTRODUÇÃO

Os implantes dentários representam atualmente uma das alternativas mais fiáveis para a substituição dos dentes em falta, quando existe o correto diagnóstico e indicação clínica¹. A taxa de sucesso a curto e longo prazo é muito elevada³. Um pré-requisito importante para garantir a correta interface osso-implante é uma estabilização primária adequada do implante durante a primeira cura. Entretanto são descritas algumas complicações relacionadas com a colocação de implantes². Foi demonstrada uma relação causa-efeito entre a acumulação de placa bacteriana e o desenvolvimento de alterações inflamatórias nos tecidos moles em redor do implante⁴, levando à perda óssea alveolar progressiva, o que pode dar origem a doença peri-implantar.

A doença peri-implantar é a alteração patológica inflamatória dos tecidos que rodeiam um implante carregado, sendo frequente na implantologia oral e facial. Dentro do conceito de doença peri-implantar, são descritas duas entidades: mucosite e peri-implantite. Em primeiro lugar, a mucosite é clinicamente caracterizada pelo aparecimento de alterações inflamatórias limitadas à mucosa peri-implantar que, com um tratamento adequado, é um processo reversível. A seguir, peri-implantite: reflete um quadro clínico no qual, juntamente com a reação inflamatória da mucosa peri-implantar, há uma perda de suporte ósseo para o implante, que é clínica e radiologicamente evidente⁵. A frequência de ocorrência de peri-implantites está na ordem dos 5-8%, com resultados semelhantes, até 16%, em outros estudos mais recentes de acompanhamento a longo prazo⁶.

Os sinais e sintomas que podem ocorrer na peri-implantite são: vermelhidão da mucosa peri-implantar, supuração purulenta (por vezes), hemorragia na sondagem, aumento da profundidade da bolsa peri-implantar, dor na percussão ou ao cerrar os dentes, perda radiológica da altura óssea peri-implantar, mobilidade progressiva do implante (em casos avançados)⁵. Portanto, as evidências mostram que a perda progressiva de osso alveolar aoredor dos implantes sem a presença de sinais inflamatórios clínicos nos tecidos moles é um acontecimento que não é comum⁷.

A etiologia da peri-implantite é condicionada pela condição do tecido peri-implantar, desenho do implante, desadequação dos componentes do implante, morfologia externa do implante ou sobrecarga mecânica⁵. A presença de microorganismos associados ao tecido peri-implantar pode levar a tratamentos antimicrobianos mais resistentes, onde os antibióticos podem não conseguir combater as bactérias aderentes às superfícies dos implantes dentários de titânio⁸. No que diz respeito à superfície rugosa do implante, foi relatado que a limpeza pode ser muito difícil de realizar porque as bactérias estão protegidas em micro-regularidades ou entalhes na superfície. Contudo, há poucas provas disponíveis de que a terapia antibiótica utilizada como adjuvante possa resolver lesões peri-implantites⁸.

No tratamento da peri-implantite, os dentistas optam actualmente pelo desbridamento mecânico e tratamento cirúrgico, mas não existe nenhum procedimento de tratamento verificado que seja considerado a melhor opção nesta indicação, embora se procurem continuamente métodos avançados de descontaminação de superfícies para eliminar o crescimento microbiano¹. Dentro dos tratamentos cirúrgicos muitos esforços estão a ser feitos para determinar um protocolo cirúrgico para alcançar uma resolução completa da doença e sinais clínicos de saúde. Em geral, os tipos de tratamento cirúrgico que foram propostos podem ser divididos em: tratamentos reseptivos e tratamentos regenerativos¹.

A escolha do tratamento dependerá do tipo de morfologia da lesão criada, tanto a perda óssea horizontal (distância entre o ombro do implante e o osso) como a perda ósseavertical (avaliação da largura e profundidade do defeito). Normalmente, a lesão óssea é caracterizada como circunferencial em torno do implante, sendo os defeitos mais superficiais e profundos mais favoráveis à regeneração óssea¹. Existem também tratamentos não cirúrgicos, porém são poucos os estudos bem concebidos e realizados sobre tratamentos não cirúrgicos para a peri-implantite, mas a conclusão é semelhante em todos eles: o tratamento mecânico não cirúrgico não é eficaz no tratamento da peri-implantite. A co-administração da clorexidina tem apenas efeitos clínicos e

microbiológicos muito limitados.

A administração de antimicrobianos locais e sistêmicos também não acrescenta benefícios significativos, embora reduza a profundidade de sondagem e a hemorragia na sondagem, não resolve a patologia. O desenvolvimento mais recente é a utilização de técnicas laser e terapias antimicrobianas fotodinâmicas¹.

Nos últimos anos, a terapia antimicrobiana fotodinâmica (PDT) e a eficácia das técnicas laser com base nos seus efeitos fototermais foram descritas por alguns autores^{9,10,11,12,13}. Estudos em periodontologia mostraram que o laser de diodo pode reduzir significativamente o período em bactérias fotopatogénicas¹⁴ como por exemplo as: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*⁸. As técnicas fotodinâmicas antimicrobianas no campo da implantologia são muito úteis na medida em que aceleram o processo de cicatrização da lesão, promovendo a revascularização nessa área, obtendo um efeito anti-inflamatório, hemostático e analgésico^{11,8}. A PDT consiste na administração de um corante não tóxico dentro de bolsas periodontais peri-implantares, seguido de iluminação à luz visível, que, na presença de oxigénio, leva à formação de espécies reativas de oxigénio que causam a morte das células microbianas. Os adjuvantes antimicrobianos para a PDT têm sido eficazes na redução da resposta inflamatória peri-implantar em indivíduos que utilizam cigarros electrónicos¹⁵.

Os princípios de ação da PDT são, como já foi referido, interações entre uma fonte de luz visível e um fotossensibilizador (como o azul de metileno e o azul de toluidina) na presença de oxigénio. Isto resulta na geração de radicais livres de oxigénio que danificam as células microbianas com o objetivo de acelerar o processo de cura. Foi também relatado que a PDT pode destruir bactérias associadas à doença peri-implantar como a *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*¹⁷. Dado que o tratamento da peri-implantite pode requerer intervenção cirúrgica e que não existem diretrizes de tratamento universalmente reconhecidas para a gestão dessa doença, o que continua a ser um desafio para o clínico, a prevenção e o tratamento com o uso da PDT ganhou uma importância crescente.

Foram já relatados diversos estudos que mostram a eficiência da PDT na inativação de periodontopatogêneos que estão na origem da peri-implantite, mostrando resultados mais promissores do que o uso de apenas laser^{23,24,25}. No entanto, nestes estudos os fotossensibilizadores usados foram os sais de fenotiazíneo, tais como o azul de metileno, o azul de toluidina, etc. Apesar de fotossensibilizadores do tipo porfirina terem já demonstrado maiores taxas de inativação bacteriana do que os sais de fenotiazíneo²⁶ o interesse por essa classe de compostos para o tratamento da peri-implantite é baixo. As porfirinas são compostos orgânicos com comprovada capacidade fotossensibilizante demonstrada em PDT²⁷ e estão presentes na Natureza; um dos macrociclos de porfirina mais conhecidos é o heme, o pigmento dos glóbulos vermelhos, um cofator da proteína hemoglobina²⁸. Os poucos artigos científicos encontrados no uso da PDT para o tratamento de infecções na cavidade oral usando porfirinas são estudos *in vitro*²⁹. Além disso, o uso de sais de fenotiazíneo como fotossensibilizadores requer fontes de luz específicas com emissão de luz entre 600-800nm, comprimento de onda máximo de absorção desses compostos. Estas fontes de luz específicas não estão disponíveis em todas as clínicas dentárias e precisariam ser adquiridas para a implementação da PDT com os sais de fenotiazíneo. Por outro lado, as porfirinas apresentam forte absorção de luz na faixa de comprimento de onda de emissão da luz do fotopolimerizador (entre 400 e 500 nm). Esta fonte de luz está presente em todas as clínicas dentárias e é amplamente utilizada para a polimerização de materiais restauradores. Esta abordagem terapêutica usando porfirinas como fotossensibilizadores e o fotopolimerizador como fonte de luz no tratamento da peri-implantite tem sido pouco explorada, apesar do seu grande potencial e de fácil aplicação em clínicas. Existem apenas cinco estudos usando o fotopolimerizador para ativar fotossensibilizadores e apenas um usou porfirinas³⁰.

Portanto, o objetivo deste projeto de investigação é determinar a eficácia da PDT como uma solução sustentável para o tratamento da peri-implantite através da utilização de porfirinas como fotossensibilizadores e fotopolimerizador como fonte de luz, equipamento disponível em todos os consultórios de medicina

dentária. Dessa forma. Poderá se propor um protocolo de PDT sustentável e prático que possa ser facilmente implementado em todas as clínicas dentárias, sem que seja necessário investimento em novos dispositivos tecnológicos. Além disso, com base no trabalho e na literatura dos últimos 10 anos, pretende-se também contribuir para o desenvolvimento de terapias alternativas ao tratamento convencional e farmacológico, bem como servir como uma contribuição científica significativa para o assunto e ser uma referência para a investigação futura relacionada com a investigação.

1.1. Objectivo Geral

Determinar a eficiência da PDT como solução sustentável para o tratamento da peri-implantite usando porfirinas como fotossensibilizadores e o fotopolimerizador como fonte de luz, amplamente usado na medicina dentária.

1.1.2 Objectivo específico

- Avaliar a eficiência fotodinâmica do sal dissódico da Protoporfirina IX (Proto IX) e o fotopolimerizador como fonte de luz na inativação de periodontopatogénicos;
- Avaliar a eficiência deste protocolo na inativação de periodontopatogénicos em implantes dentários;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta secção apresenta informações sobre os materiais utilizados nesta investigação, bem como uma descrição dos métodos a utilizar. Os métodos incluem o cultivo e manutenção das espécies microbianas, o procedimento para realizar a PDT, e os métodos para avaliar os efeitos da PDT utilizando o sal dissódico da Protoporfirina IX (Proto IX) como um fotossensibilizador e uma fonte de luz denominada fotopolimerizador.

2.1 Cultura dos microrganismos

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

2.2 Fotossensibilizador

O sal dissódico da Protoporfirina IX, que é um composto orgânico, precursor do grupo heme, foi utilizado como fotossensibilizador. A molécula protoporfirina IX contém o núcleo de porfina, um tetrapirrol macrocíclico que mostra um marcado carácter aromático. A molécula é essencialmente planar, exceto para as ligações N-H, que são dobradas para fora do plano dos anéis, em direcções opostas¹³.

2.3 Fonte de Luz

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

2.4 Implantes dentários

Para os estudos da fotoinativação de microrganismos periodontopatogênicos em implantes dentários, foram usados implantes TitamaxHE Smart (Neodent®) de titânio gentilmente cedidos pela empresa Straumann (Suíça).

2.5 Ensaios *in-vitro* da eficiência fotodinâmica da Proto IX na inativação do *E. faecalis* e a *C. albicans* usando o fotopolimerizador como fonte de luz

Cada cultura microbiana crescida durante a noite e na fase estacionária, foi diluída em solução tampão (*Phosphate-buffered saline* (PBS)) e a sua turbidez ajustada a 0,5 Macfarland (concentração final de 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL)). Estas culturas foram distribuídas igualmente por 4 gobelés estéreis (10 mL) e foram incubadas com 10 e 20 μ M de ProtoIX. De forma a avaliar a toxicidade do fotossensibilizador no escuro, foi realizado um controle em que a suspensão microbiana foi incubada com ProtoIX na maior concentração, mas foi mantida no escuro (Ct Esc). Foi avaliada a influência da luz na sobrevivência dos microrganismos através de um controle constituído apenas pela suspensão microbiana (Ct) e foi irradiada nas mesmas condições das amostras. As amostras e os controles foram incubados no escuro de forma a promover a ligação do fotossensibilizador as células microbianas durante 15 min. Após este período as amostras e o Ct foram irradiados com luz azul (proveniente de um fotopolimerizador) durante

vários intervalos de tempo, que foram ajustados ao longo das experiências. O Ct Esc foi mantido no escuro durante toda a experiência. Entre os intervalos de irradiação foram retiradas alíquotas de 100 µL das amostras e do controle, diluídas em série em PBS e plaqueadas em placas de Petri contendo meio agarizado adequado para cada microrganismo. As placas foram incubadas a 37°C durante 18-24h. As UFC foram contadas nas diluições adequadas e a concentração das células foi expressa como Log UFC/mL. Foram realizados pelo menos 2 ensaios independentes.

2.6 Ensaios da eficiência fotodinâmica da Proto IX na inativação do *E. faecalis* e a *C.albicans* usando o fotopolimerizador como fonte de luz em implantes dentários

Para avaliar a inativação da PDT em modelos *ex vivo*, os implantes dentários foram inicialmente preparados e desinfetados e apenas sujeitos a contaminação com *E.faecalis* e *C.albicans*.

Para a desinfecção, os implantes foram colocados numa placa de Petri esterilizada, pulverizados com etanol e incubados por 15 min para reduzir o número de bactérias residentes. Após isso, a superfície dos implantes foi lavada com PBS esterilizado (10 min) para remover o excesso de etanol. Por fim, os implantes foram colocados sobre radiação ultravioleta (UV-C: 280-100 nm), com as placas abertas por 30 min.

Após a desinfecção, os implantes foram artificialmente contaminados com o respectivo microrganismo. Para isso, 200 µL de cada suspensão de *E.faecalis* ou *C.albicans*, previamente ajustadas a uma concentração de 10⁸ UFC/mL, foi pulverizada por cada implante. Após secagem, 2 grupos de implantes (cada um constituído por 2 elementos) foram pulverizados com 100 µL de uma solução de fotossensibilizador a concentração que se mostrar mais eficaz (10 µM/20 µM), nos ensaios *in vitro*. Um grupo foi irradiado e outro foi usado como o controle escuro (Ct). Um grupo foi apenas pulverizado com as suspensões microbianas, que foi usado como controle (Ct).

As amostras e os controles foram incubados no escuro, de forma a promover a ligação do fotossensibilizador às células microbianas durante 15 min. Após este período as amostras e o Ct foram irradiadas com luz azul (proveniente de um fotopolimerizador) durante vários intervalos de tempo(5min,10min,20min), que foram ajustados ao longo das experiências. O Ct Esc foi mantido no escuro, durante todo o ensaio.

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

3.RESULTADOS

3.1 Ensaio *in-vitro* da eficiência fotodinâmica da Proto IX na inativação do *E. faecalis* e a *C.albicans* usando o fotopolimerizador como fonte de luz

Os resultados obtidos no ensaio *in vitro* da fotoinativação de *C.albicans* utilizando Proto IX a uma concentração de 10 μ M e irradiadas com um fotopolimerizador são mostrados na Figura 1. Após 10 min de irradiação não se observou diminuição significativa na sobrevivência do fungo, no entanto, após 20 minutos de irradiação, foi obtido uma diminuição de 1,23 log UFC mL (ANOVA, $p < 0,0001$) na sobrevivência de *C. albicans*. Para todos os controles, claro e escuro, a concentração de fungos manteve-se constante durante todo o ensaio, o que mostra que *C.albicans* quando irradiado com o fotopolimerizador e sem a adição de PS (Grupo control: Ct), não são afetados, mas também a inexistência de efeitos tóxicos do sal dissódico de Proto IX (Proto IX), quando não é submetido a irradiação (controle escuro: Ct Esc).(PS:Grupo irradiado com fotossensibilizador).

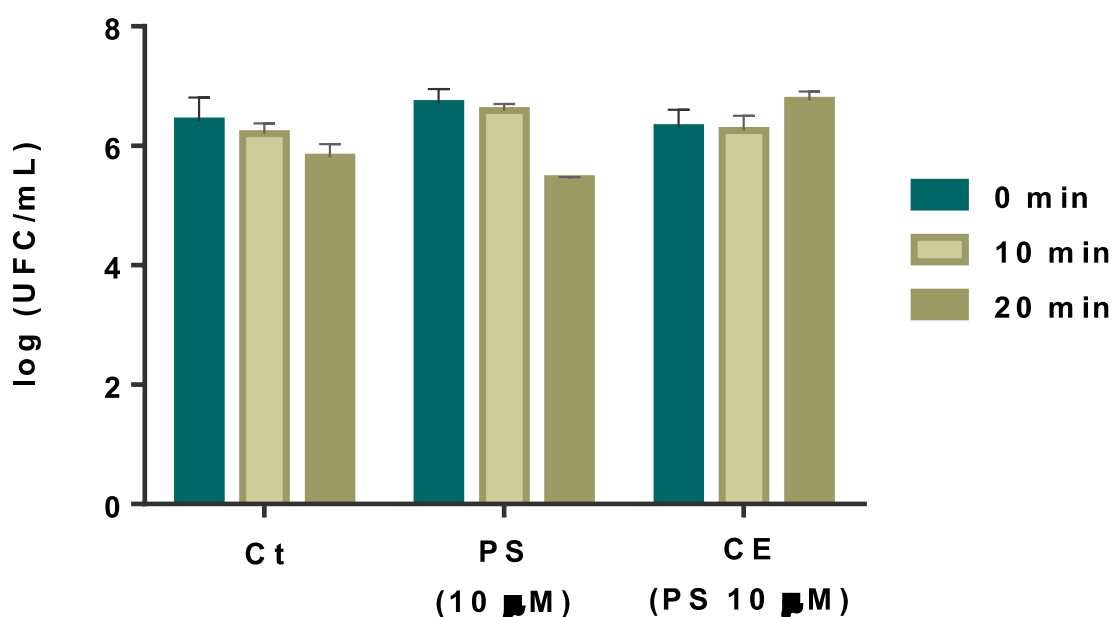


Figura 1. Fotoinativação *in vitro* do fungo *C.albicans*, incubado com Proto IX a 10 µm e irradiado com o fotopolimerizador por 10 minutos e por 20 minutos.

Para aumentar a eficiência fotodinâmica a concentração de ProtoIX foi aumentada para 20 µM (Figura 2). Os resultados mostram uma diminuição de cerca de 2 log CFU mL (ANOVA, $p < 0,0001$) na concentração do fungo foi observada após 10 min de irradiação, e uma diminuição de cerca de 4 log CFU mL (ANOVA, $p < 0,001$) na concentração de fungos após 20 minutos.

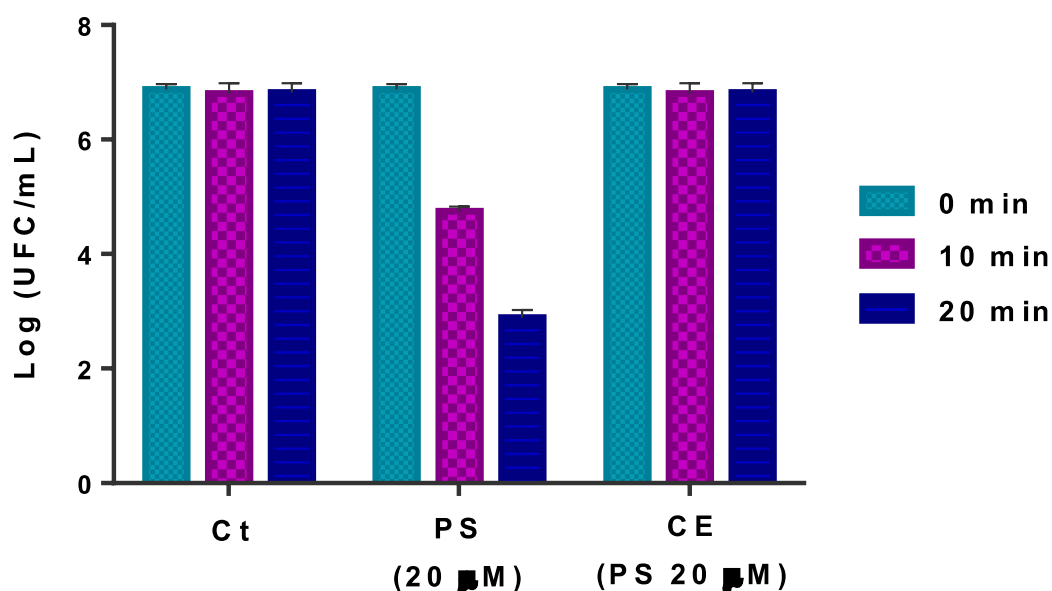


Figura 2. Fotoinativação *in vitro* de *C. albicans*, incubada com Proto IX a 20 µm e irradiada com o fotopolimerizador por 10 minutos e por 20 minutos.

A mesma abordagem foi utilizada para o estudo da fotoinativação de *E. faecalis* com ProtoIX a 20 µm utilizando um fotopolimerizador como fonte de luz. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 3 e mostram uma diminuição de 6,94 log UFC mL⁻¹ (ANOVA, $p < 0,0001$) na concentração da bactéria após 10 min de irradiação. Após 20 min de irradiação o limite de detecção da metodologia

(ANOVA, $p < 0,0001$) não foi possível contar as unidades formadoras de colônias. Este fato nos permite determinar que *E. faecalis* é mais adequado inativado do que *C. albicans* quando o ProtoIX é usado como PS e o fotopolimerizador como fonte de luz.

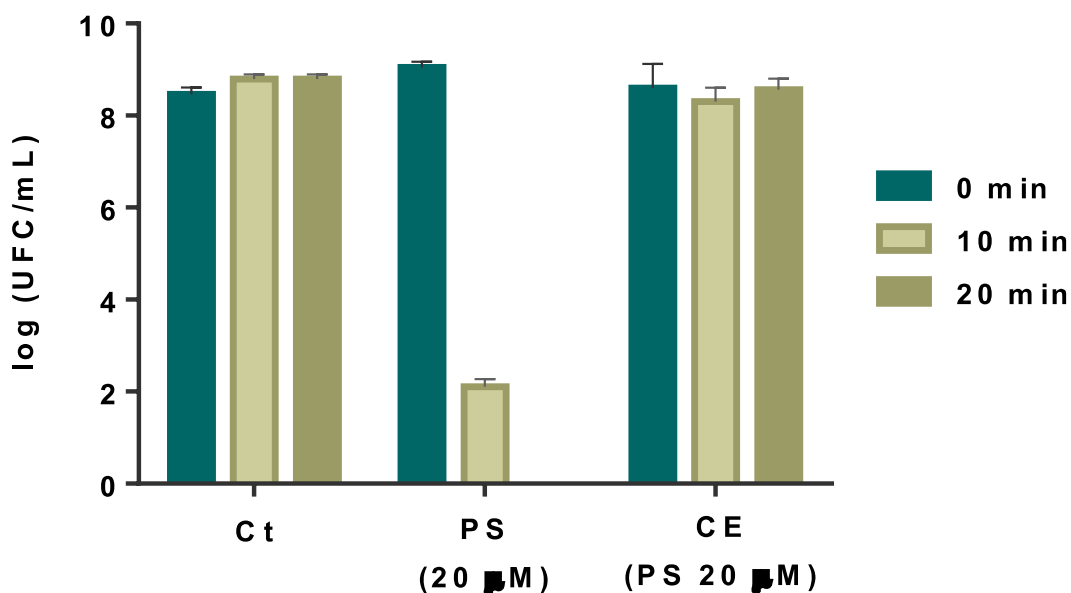


Figura 3. Fotoinativação *in vitro* de *E. faecalis* incubada com Proto IX a 20 μm e irradiada com o fotopolimerizador por 10 minutos e por 20 minutos. * Nenhuma UFC foi detetada.

Para inferir se as taxas de inativação semelhantes foram alcançadas com tempos de inativação menores, foi realizado outro ensaio com tempos de irradiação menores: 5 e 10 min. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4 e mostram uma diminuição de 4,36 log UFC mL⁻¹ (ANOVA, $p < 0,0001$) na concentração da bactéria após 5 min de irradiação e após 10 min de diminuição de 6,63 log CFU mL⁻¹ (ANOVA, $p < 0,0001$) no *E. faecalis* foi atingido.

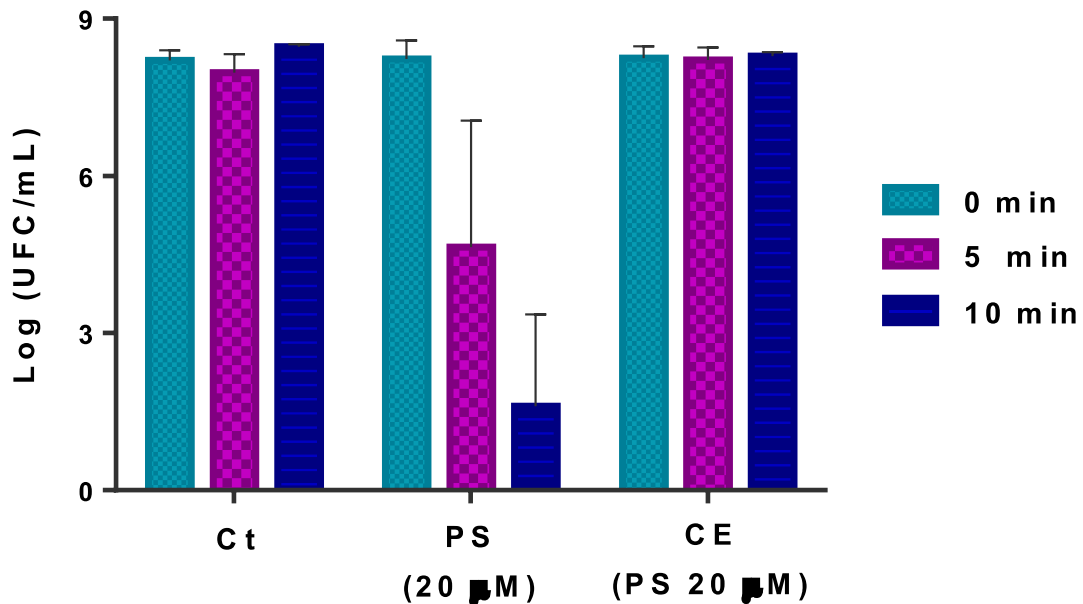


Figura 4. Fotoinativação *in vitro* de *E. faecalis*, Proto IX a 20 μm e irradiada com o fotopolimerizador por 5 minutos e por 10 minutos.

Estes resultados mostram que mesmo com tempos de irradiação mais curtos, aPDT usando ProtoIX como PS e curando a luz como fonte de luz é capaz de inativar eficientemente *E. faecalis*.

3.2 Fotoinativação de *C.albicans* e *E.faecalis* em implantes

Os resultados obtidos no ensaio em implantes da fotoinativação de *C. albicans* utilizando Proto IX a uma concentração de 20 μM e irradiadas com o fotopolimerizador são mostrados na Figura 5. O ensaio foi realizado nas mesmas condições que os ensaios *in vitro* começando com uma concentração de ProtoIX de 20 μM durante 20 minutos e diminuição significativa do número de microrganismos. Após 20 minutos de irradiação, obteve-se uma diminuição de 2,54 log CFU mL⁻¹ (ANOVA, $p < 0,0001$).

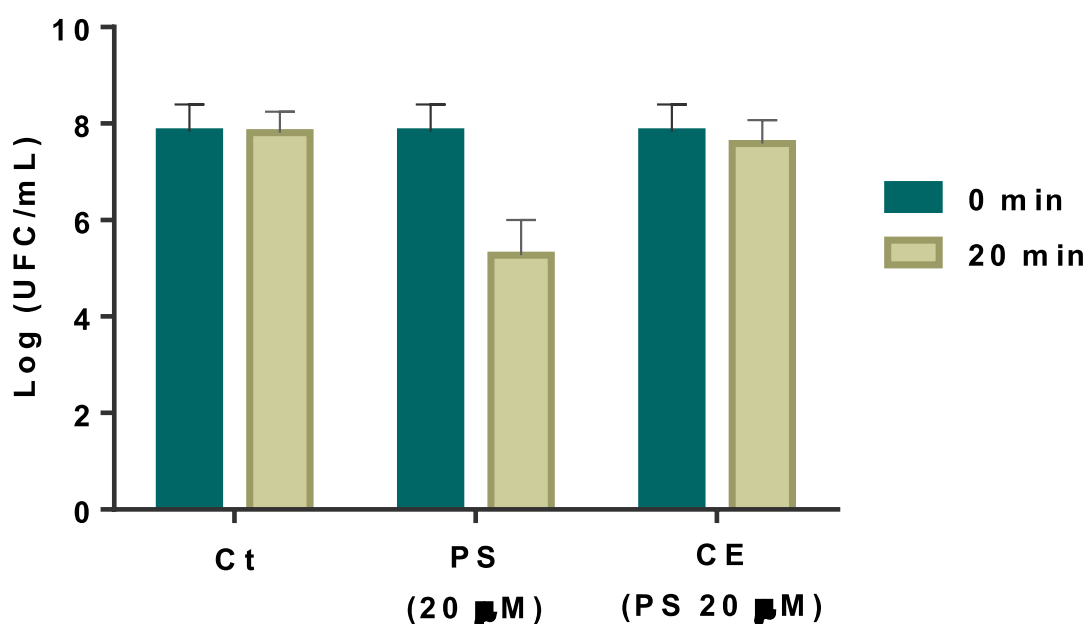


Figura 5. Fotoinativação em implantes do fungo *C. albicans*, incubado com Proto IX a 20 μM e irradiado com o fotopolimerizador por 20 minutos.

Subsequentemente, foi realizado um novo ensaio com *E. faecalis* com a mesma concentração de 20 μM de ProtoIX, mas com o tempo de irradiação reduzido para 10 minutos, e os resultados dos mesmos estão representados na

Figura 6. O ensaio foi realizado a partir de uma concentração de 20 μM durante 10 minutos e obteve-se uma diminuição significativa no número de microrganismos. Após 20 minutos de irradiação, foi obtida uma diminuição de 2,38 log UFC mL^{-1} (ANOVA, $p < 0,0001$).

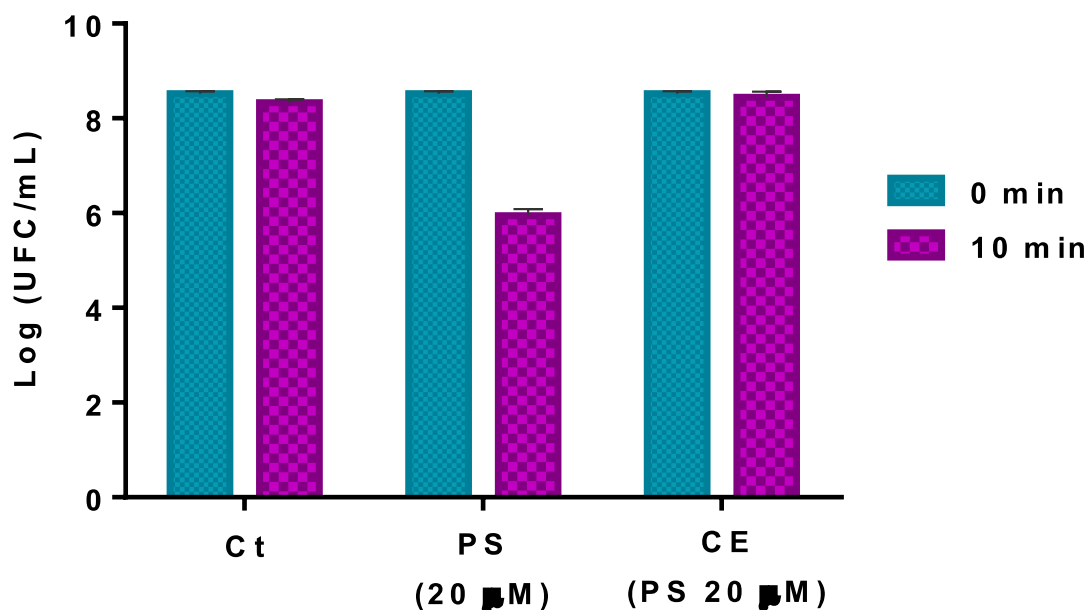


Figura 6. Fotoinativação em implantes de *E. faecalis*, Proto IX a 20 M e irradiada com o fotopolimerizador por 10 minutos.

Assim, quando comparamos com um teste anterior realizado com diferentes tempos de irradiação, é possível ter uma inativação muito semelhante desses microrganismos, mesmo irradiando durante metade do tempo no caso de *E. faecalis*. A diferença de números mostra que basicamente o mesmo nível de inativação microbiana é alcançado usando menos tempo.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica como uma solução ecosustentável no tratamento da peri-implantite utilizando as porfirinas como fotossensibilizadores e fotopolimerizador como fonte de luz. Segundo a bibliografia consultada a terapia fotodinâmica é um método eficiente na redução de microorganismos. Seu uso em Medicina Dentária está indicado, visto que a terapia fotodinâmica é mais eficiente em infecções localizadas, de pouca profundidade e microflora conhecida. Os estudos encontrados mostram uma variabilidade no uso desta terapia como auxiliar em tratamentos da cavidade oral³¹.

Também Jimenez e colaboradores referem que a bibliografia consultada se concentra em conhecer diferentes enfoques terapêuticos como os aeropolidores, clorhexidina, laser, terapia fotodinâmica, antibioticoterapia e probióticos, sozinhos ou combinados com a terapia mecânica manual ou ultrasónica, comparando sua eficácia na clínica e na desinfecção microbiológica, resultando em benefícios para a diminuição da infecção e da inflamação; no entanto, observou-se que nenhuma terapia utilizada é completamente superior à outra. Como resultado, o tratamento não cirúrgico com qualquer tipo de combinação de terapia realizada de forma adequada, geralmente proporcionam uma redução significativa das características clínicas entre eles o eritema, edema, sangramento e, em alguns casos, redução de bolsas periodontais e ganhos nos níveis de inserção clínica³².

A terapia fotodinâmica também é útil para pacientes com periodontite. Além disso, é possível utilizar tanto o tratamento convencional sozinho ou também com a terapia fotodinâmica, sobretudo quando é necessário intervir o nível de inserção clínica. No entanto, a terapia fotodinâmica é um tratamento inovador, pelo que são recomendados mais estudos clínicos³².

Também *Bowen e et.* referem que a terapia fotodinâmica é uma técnica simples, económica e pouco invasiva permitindo uma redução significativa da microbiota bacteriana e melhoria do resultado do tratamento da peri-implantite³².

A finalidade, e pelo que temos pesquisado e tratado, esta abordagem terapêutica usando um fotopolimerizador como fonte de luz é o seu baixo custo e sua facilidade de encontrar em qualquer clínica dentária, o que converte esta terapia em ecosustentável.

É importante deixar em aberto a possibilidade de futuros estudos sobre esta terapia, a possibilidade de utilizar outro tipo de fotossensibilizador com mais potencial e que promova taxas de inativação mais elevadas, ao que poderia contribuir para obter melhores resultados no estudos *in-vitro* como em implantes.

Tudo isto nos permite saber que a terapia fotodinâmica antimicrobiana em conjunto com o Proto IX e o fotopolimerizador pode ser usada como tratamento adjuvante com outras terapias já existentes na clínica.

6. CONCLUSÕES

O efeito da terapia fotodinâmica como uma solução eco-sustentável no tratamento da peri-implantite é promissor, mas para verificar a sua eficácia final, é necessário aprimorar o protocolo *in vitro* para depois propor ensaios clínicos.

Foi possível demonstrar que tanto a *C. albicans* e *E. faecalis* são susceptíveis aPDT em estudos *in-vitro* e também em implantes. O uso da terapia fotodinâmica pode permitir uma solução de tratamento adjuvante, evitando muitas vezes o procedimento cirúrgico em pacientes com esta patologia peri-implantárias.

3. BIBLIOGRAFIA

1. Casas A , Legido B , Aparicio C, Alandez J. Prevalencia, diagnóstico y tratamiento de la peri-implantitis, Gaceta Dental [Internet] 226,2011.58. Disponível em: <https://gacetadental.com/2011/09/prevalencia-diagnostico-y-tratamiento-de-la-peri-implantitis-25523/>
2. Zarb GA, Smitt A. The longitudinal Clinical Effectiveness of osseointegrated Implants: the Toronto study, part 3: problems and complications encountered. J Prosth Dent [Internet] 1990;64:185-94. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2202818/>
3. Otero Morilla S, Bascones Martinez A. Influência das diferentes superfícies de implantes na peri-implantite. Av Periodon Implantol [Internet] 2017; 29, (2): 59-66. Disponível em: <https://scielo.isciii.es/pdf/peri/v29n2/1699-6585-peri-29-2-59.pdf>
4. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological, complicações biológicas com implantes dentários: sua prevenção, diagnóstico e tratamento Clin Oral Impl Res [Internet] 2000; 11 146–155. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11168263/>
5. Sánchez M^aÁ, Gay-Escoda C. Periimplantitis. Med Oral. Patol Oral Cir Bucal 2004;9 63-74. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v9Suppli/medoralv9supplip69.pdf>
6. Ortiz-Vigón Carnicero A., Fabrizi S., Bascones Martínez A.. Tratamiento Cirúrgico Periimplantário. Avanços em Periodontia [Internet]. 2012 ; 24(1): 11-17. Disponível em: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852012000100002

7. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. J Periodontol. 2018;89:(267); 71-90. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926955/>
8. Bomberacci G, Guzzi G, Gualini F, Gualini S, Santoro F. Terapia fotodinâmica para tratar a peri-implantite. Implant Dent [Internet] 2013; 22:(6); 631-638. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24225780/>
9. Guo-Hao L, Suárez F, Wang H. Terapia a laser para o tratamento da mucosite peri-implante e peri-implantite: Uma melhor revisão de evidência da Academia Americana de Periodontologia. J Periodontol. [Internet] 2018;(89):766–782. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30133748/>
10. Chambrone L, Wang H, Romanos G. Terapia fotodinâmica antimicrobiana para o tratamento de periodontite e peri-implantite: Uma melhor revisão de evidência da Academia Americana de Periodontologia. J Periodontol. [Internet] 2018;(89):783–803. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30133749/>
11. Tovar E Aplicações de laser de diodo e laser Er Yag em implantologia. [Tese de pré- graduação]. Universidade de Guayaquil. Equador.2021.. Disponível em: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/reduq/56189>
12. Wawrzyk A y cols. A eficácia de um laser de diodo em implantes de titânio para a redução de microrganismos causadores de peri-implantite. MDPI. [Internet] 2021(14): 7215. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/23/7215>
13. Pommer B, Haas R, Mailath G, Fürhauser R, Watzek G, Busenlechner D, Müller-Kern M, Kloodt C. Tratamento de Peri-implantite: Comparação a Longo Prazo de Descontaminação Laser e Cirurgia de Implantoplastia. Impl Dent [Internet];25:(6): 646-449. DOI: [10.1097/ID.0000000000000461](https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000461)

14. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak B, Wernisch J, Sperr W. Tratamento de bolsas periodontais com um laser de diodo. *Laser e cirurgia medicina*. [Internet] 1998; 22: 302-311. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9671997/>
15. Al Rifaiy Mohammed Q, Qutub Osama A, Alasqah Mohammed N, Al-Sowygh Zeyad H, Mokeem Sameer A, Alrahlah Ali. Efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana adjuvante na redução da resposta inflamatória peri-implante em indivíduos que vaping cigarros eletrônicos: Um ensaio clínico controlado randomizado. *Fotodiagnóstico e Terapia Fotodinâmica* [Internet] 2018 <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.03.002>
16. Albaker AM, ArRejaie AS, Alrabiah M, Al-Aali KA, Mokeem S, Alasqah MN, Vohra F, Abduljabbar T, Efeito da terapia antimicrobiana fotodinâmica no desbridamento do retalho aberto no tratamento da peri-implantite: Ensaio controlado randomizado, *Fotodiagnóstico e Terapia Fotodinâmica* [Internet] 2010, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.003>
17. Alqahtani F, Alqhtani N, Alkhtani F, Divakar D, Al-Kheraif A, Javed F. Eficácia do desbridamento mecânico com e sem terapia fotodinâmica antimicrobiana adjuvante no tratamento da peri-implantite entre fumantes moderados e usuários de cachimbo-d'água. *Fotodiagnóstico e Terapia Fotodinâmica*. [Internet] 28 (2019) 153–158 DOI: [10.1016/j.pdpdt.2019.09.003](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.09.003)
18. Ortiz V, Marínez B.. Tratamento cirúrgico periimplantário. *Av Periodon Implantol*. [Internet] 2012; 24, 1:11-17. Disponível em: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852012000100002

19. Sen A. Efeito da inativação fotodinâmica na inibição de biofilmes formados por *Candida* spp. [Tesis de pregrado]. Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica e. Eletrônica. Tonantzintla, Puebla. Mexico. Disponível em: https://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1009/2154/1/Sen-Salinas_DA_Tesis.pdf
20. Kordbacheh Changi K, Finkelstein J, Papapanou PN. 2019. Prevalência de peri-implantite, taxa de incidência e fatores de risco: estudo de registros eletrônicos de saúde em uma escola de odontologia dos E.U.A. *Clin Oral Implants Res.* 30(4):306–314. Kumar PS. 2019. Systemic risk factors for the development of peri-implant diseases. *Implant Dent.* 28(2):115– 119. DOI: [10.1111/clr.13416](https://doi.org/10.1111/clr.13416) Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30768875/>
21. Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S. Acompanhamento de 14 anos do tratamento do implante. Parte I: perda do implante e associações a vários fatores. *J Clin Periodontol* 2006;33:283-9. DOI: [10.1111/j.1600-051X.2006.00907.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00907.x) Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16553637/>
22. HERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, C.; BAPTISTA, P. Metodología da investigação. 4ta ed. México: Editorial McGraw Hill; 2006.
23. Kormas, I.; Pedercini, C.; Pedercini, A.; Raptopoulos, M.; Alassy, H.; Wolff, L. F., Peri-Implant Diseases: Diagnosis, Clinical, Histological, Microbiological Characteristics and Treatment Strategies. A Narrative Review. *Antibiotics* **2020**, *9*, 835.
24. Saneja, R.; Bhattacharjee, B.; Bhatnagar, A.; Kumar, P.; Verma, A., Efficacy of different lasers of various wavelengths in treatment of peri-implantitis and peri-implant mucositis: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* **2020**, *20*, 353-362.

25. Świder, K.; Dominiak, M.; Grzech-Leśniak, K.; Matys, J., Effect of Different Laser Wavelengths on Periodontopathogens in Peri-Implantitis: A Review of In Vivo Studies. *Microorganisms* **2019**, *7*, 189.
26. do Prado-Silva, L.; Gomes, A. T. P. C.; Mesquita, M. Q.; Neri-Numa, I. A.; Pastore, G. M.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.; Almeida, A.; Braga, G. Ú. L.; Sant'Ana, A. S., Antimicrobial photodynamic treatment as an alternative approach for *Alicyclobacillus acidoterrestris* inactivation. *International Journal of Food Microbiology* **2020**, *333*, 108803.
27. Braz, M.; Salvador, D.; Gomes, A. T. P. C.; Mesquita, M. Q.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Almeida, A., Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on skin using a porphyrinic formulation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2020**, *30*, 101754.
28. Gomes, A. T. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2018**, *90*, 993- 1026.
29. Diogo, P.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Palma, P. J.; Baptista, I. P.; Goncalves, T.; Santos, J. M., An Insight into Advanced Approaches for Photosensitizer Optimization in Endodontics-A Critical Review. *Journal of Functional Biomaterials* **2019**, *10*.
30. Sigusch, B. W.; Dietsch, S.; Berg, A.; Voelpel, A.; Guellmar, A.; Rabe, U.; Schnabelrauch, M.; Steen, D.; Gitter, B.; Albrecht, V.; Watts, D. C.; Kranz, S., Antimicrobial photodynamic active biomaterials for periodontal regeneration. *Dental Materials* **2018**, *34*, 1542-1554.

31. Cid M Felipe, Jara J Javiera, Huerta C Loreto, Oliva M Patricio. Eficácia de Terapia Fotodinâmica como Complemento de Terapia Convencional Periodontal Versus Terapia Convencional no Tratamento de Pacientes Adultos com Periodontite Crônica: Uma Revisão Sistemática com Metaanálise. Int. J. Odontostomat. [Internet]. 2016 Ago [citado 2022 Jun 17] ; 10(2): 315-323. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2016000200020&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2016000200020>
32. Antolín AB, Garrido MA, Domingo BA, Fernández SD. Laser e terapia fotodinâmica no tratamento da peri-implantite. RCOE [Internet]. 2014 [citado em 18 de junho de 2022];19(4):325-33. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6195600>