

In this study it was performed an accurate ***PCR data analysis*** on the pre-and post-treatment, of 30 subjects. The sites examined were subjected to SRP and then correspondingly treated with Aladent + led 630nm, and not treated with Aladent. From the processing of the data obtained and the convincing clinical results the support therapy for non-surgical periodontal maneuvers given by photodynamic therapy with Aladent, and 630nm red light radiation favor the processes of loss of inflammation of the periodontal tissues even in deeper pockets.

ACIDO 5-DELTA-AMINOLEVULINICO UNA NUOVA FRONTIERA NELLA TERAPIA FOTODINAMICA

5-DELTA-AMINOLEVULINIC ACID. A NEW FRONTIER IN PHOTODYNAMIC THERAPY

L'eliminazione totale dei batteri dopo la terapia parodontale diventa un fattore chiave per garantire la stabilità del risultato ed evitare ricolonizzazioni dei siti trattati. Il metodo non invasivo qui presentato, che agisce attraverso l'attivazione di un fotosensibilizzante, inserito nelle tasche parodontali, con una luce led artificiale 630nm, potrebbe essere una terapia di supporto alle manovre parodontali non chirurgiche favorendo i processi di perdita dell'infiammazione dei tessuti parodontali anche nelle tasche più profonde

Claudio Pasquale¹

Ezio Gheno^{1,2}

Priscila Ladeira Casado²

Stefano Benedicenti¹

¹ Centro di Laser Terapia, Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate, Università degli Studi di Genova

² Department of Implant Dentistry – Universidade Federal Fluminense, Brazil

Corrispondenza: benedicenti@unige.it

La parodontite è la risposta infiammatoria dei tessuti di supporto del dente all'infezione batterica cronica¹. L'obiettivo principale della terapia parodontale è quello di eliminare meccanicamente i depositi duri sopra e sotto gengivali, assieme all'organizzazione della placca batterica in biofilm². Queste procedure, che costituiscono la terapia causale iniziale, mostrano un successo considerevole e una stabilità del risultato a lungo termine³, ma altri studi evidenziano che la sola terapia non chirurgica non è in grado di rimuovere completamente i fattori irritanti locali in aree con difficile accesso, come le forcazioni dei molari e le anomalie anatomiche radicolari, soprattutto nelle tasche parodontali con profondità superiore a 6mm^{4,5}.

Alcune famiglie di batteri, come *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, sono in grado di distruggere rapidamente le cellule epiteliali dell'ospite e di invadere i tessuti del parodonto profondo^{5,6,7}.

Ne consegue che l'eliminazione totale dei batteri dopo la terapia causale diventa un fattore chiave per garantire la stabilità del risultato ed evitare ricolonizzazioni dei siti trattati.

Al fine di raggiungere questo obiettivo sono stati proposti diversi agenti antimicrobici e antisettici locali^{8,9} da inserire direttamente nella tasca parodontale dopo la terapia meccanica; allo stesso modo anche una terapia sistemica antibiotica può essere utilizzata a supporto del trattamento parodontale^{10,11}.

Tuttavia, l'utilizzo di agenti antimicrobici ha due importanti limitazioni. La prima è legata all'incapacità di ogni prodotto di mantenere una concentrazione stabile nel tempo all'interno del sito trattato a causa della rapida proliferazione di batteri Gram positivi e negativi e della loro organizzazione in matrice polimerica (biofilm), oltre che per la diluizione conseguente all'azione della saliva e del sangue¹².

La seconda limitazione è legata alla farmacoresistenza degli agenti patogeni parodontali¹³. Per queste ragioni la comunità scientifica sta cercando possibili alternative per bypassare questi limiti oggettivi.

L'utilizzo di fonti luminose, come i laser o i led, nella terapia fotodinamica è stato ampiamente documentato come possibile ausilio alla terapia non chirurgica e alcuni studi documentano un miglior

PAROLE CHIAVE

terapia fotodinamica, malattia parodontale, Aladent

KEY WORDS

photodynamic therapy, periodontal disease, Aladent

effetto omeostatico e una significativa riduzione della carica batterica^{14,15,27}.

Ochsner definì la terapia fotodinamica (PDT) come “una reazione mediata dall’ossigeno che si libera grazie all’azione della luce entro una specifica lunghezza d’onda su un agente fotosensibilizzante, che inserito nella tasca parodontale e dopo l’attivazione, genera molecole citotossiche e ossigeno libero”¹⁶. Questo trattamento potrebbe ridurre gli effetti di sovradosaggio di farmaci e soprattutto eliminare il fenomeno della resistenza batterica^{17,18}. Le sorgenti di luce impiegate nella PDT sono generalmente laser diodici o lampade a led focalizzate con una lunghezza d’onda che copre un range tra i 430 e gli 810 nm¹⁹.

Ripercorrendo questo schema, l’acido 5-delta-aminolevulinico (ALA) è noto per essere un valido agente fotosensibilizzante con una spiccata attività antifungina sulla *Candida*²⁶ e per questa ragione è già utilizzato in diversi campi della medicina²². Sostanzialmente l’ALA è un precursore endogeno delle porfirine, che può stimolare la sintesi endogena della protoporfirina 9 (PpIX) all’interno dei mitocondri. PpIX è un elemento fondamentale della costituzione

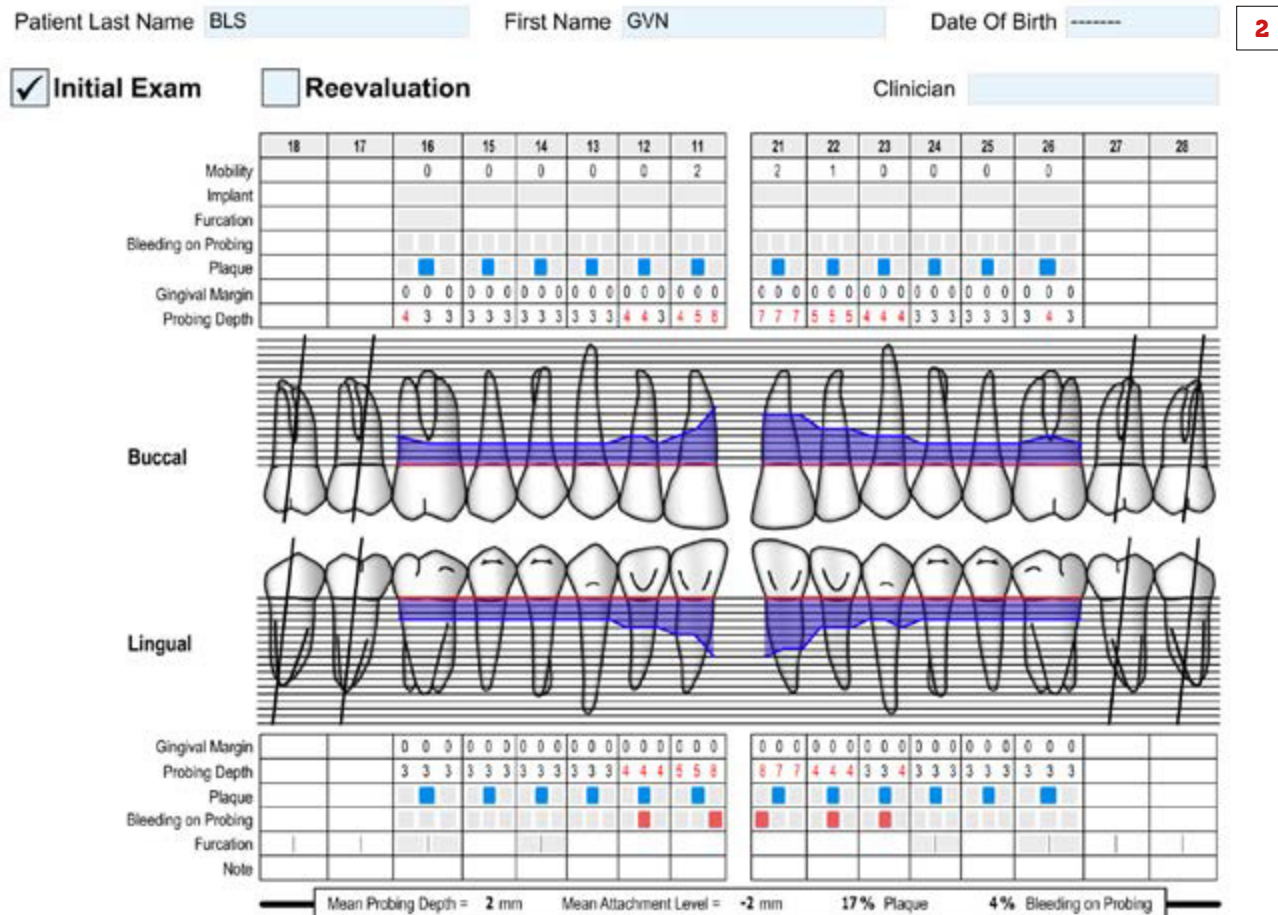


1

del gruppo eme e funziona come un cromoforo che può essere metabolicamente trasformato e accumulato^{23,24}. Ne consegue che la PpIX può avere una spiccata azione fotosensibilizzante, liberando, dopo l’attivazione, specie reattive dell’ossigeno con alto potere ossidante^{25,26}.

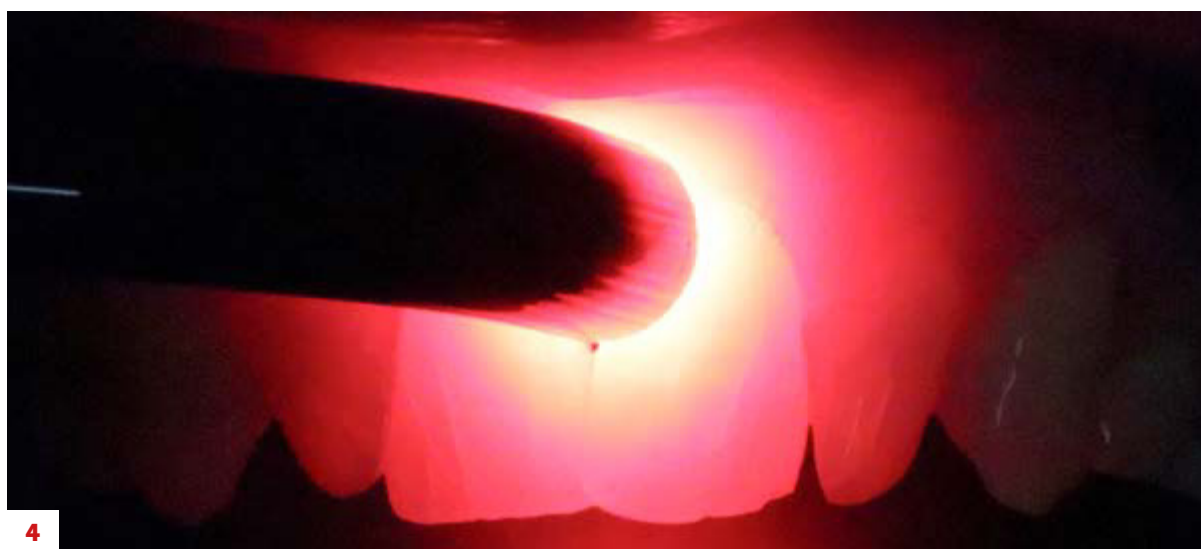
Lo scopo di questo studio è verificare l’efficacia l’acido 5-delta-aminolevulinico (Aladent, Alpha Strumenti Srl) dopo la terapia parodontale non chirurgica.

1. Fotografia iniziale del paziente. Tasca parodontale 1.1 MVL 8mm; 2.1 MVL 7mm
2. Sondaggio parodontale del paziente TO



2

3. Applicazione del gel ALA (Aladent) ed isolamento con diga chimica fotopolimerizzabile
4. Foto-attivazione del gel ALA con lampada led 630nm per 10 minuti



MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 30 soggetti che presentavano almeno una tasca parodontale di 6 mm di profondità di sondaggio sia su elementi anteriori che posteriori. Sono stati esclusi dallo studio tutti i soggetti con patologie sistemiche scompensate, donne in gravidanza e durante l'allattamento e tutti i soggetti partecipanti sono stati informati della non invasività del trattamento, potendo comunque abbandonare lo studio in qualsiasi momento. I trattamenti sono stati svolti in 3 centri dell'Italia Settentrionale condotti da esperti in parodontologia. Dopo una seduta di igiene professionale (definita T0) è stata selezionata una tasca parodontale di almeno 6 mm per ciascun soggetto che è stato quindi inserito in un sistema di follow-up a 5 giorni dopo la procedura (definito T1). Le tasche sono state adeguatamente trattate con scaling o root-planing e durante l'intervallo T0-T1 i

soggetti sono stati istruiti a mantenere una scrupolosa igiene orale con spazzolino e filo interdentale, ma sospendendo l'utilizzo di ogni collutorio e medicamento disinfettante per uso orale di ogni genere.

I pazienti inclusi in questa sperimentazione sono stati suddivisi in tre gruppi in maniera totalmente casuale:

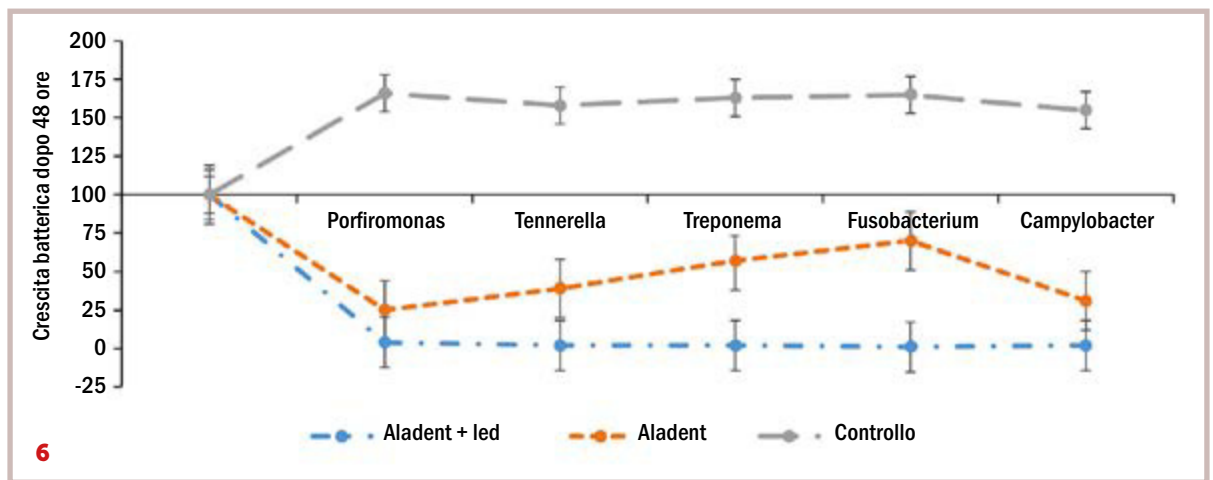
- 10 pazienti Gruppo Test 1: gel ALA + irradiazione con dispositivo led a 630nm per 10 minuti;
- 10 pazienti Gruppo Test 2: gel ALA senza alcuna irradiazione;
- 10 pazienti Gruppo Controllo: solo terapia causale meccanica e manuale.

Al controllo T1 è stato misurato l'indice di placca (*Plaque Index Score Silness & Loe*), eseguito sondaggio parodontale e rilevate fotografie endorali. Di seguito eseguita la PCR nella tasca selezionata, utilizzando 5 coni di carta sterili lasciati in sito per 40 secondi e poi riposti in una provetta sterile per



5

- Suddivisione dei 3 gruppi di studio e relative fasi di lavoro
- Effetto del trattamento con gel ALA coadiuvato da irraggiamento con led ad emissione luminosa 630nm (Aladent+LED) o non coadiuvato (Aladent). Controllo= solo terapia causale meccanica e manuale. I valori sono espressi come concentrazione di batteri rilevati mediante analisi quantitativa con real-time-PCR a partire dal valore assoluto iniziale 100, dato alla concentrazione batterica prima del trattamento



poi affidarli al laboratorio incaricato di eseguire i test. Successivamente abbiamo proceduto all'inserimento del gel ALA (Aladent gel termosensibile) nella tasca tramite l'apposito ago di plastica e la stessa sigillata con una goccia di diga chimica fotopolimerizzabile per impedire al prodotto di fuoriuscire dal sito parodontale (Figure 1, 2, 3). Il gel è rimasto in situ per 1 ora, in modo da consentire la metabolizzazione da parte delle cellule dell'epitelio sulcolare e dei batteri presenti nella tasca e favorirne la successiva produzione

endogena di PpIX. Una volta raggiunta la massima presenza di PpIX, nei pazienti del gruppo Test 1, abbiamo proceduto con l'irradiazione del sito a 360° con lampada a led 630nm per un tempo complessivo di 10 minuti, mentre per i pazienti del gruppo Test 2 non si è proceduto con l'irradiazione luminosa (Figura 4). Nei pazienti del gruppo Controllo invece non è stata eseguita nessuna terapia di supporto alla terapia causale meccanica e manuale. Al termine del trattamento è stato effettuato un secondo test PCR

a 48 ore in tutti e 3 i gruppi per valutare l'effetto battericida del prodotto e la relativa ricolonizzazione nelle 48 ore (Figura 5).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Una volta ottenuti tutti i risultati dal laboratorio microbiologico, sono stati elaborati i dati dei test PCR in modo da riuscire a paragonare i gruppi Test 1 e Test 2 al gruppo di Controllo. I dati, espressi in percentuale relativi all'effetto battericida e al controllo della crescita batterica nelle immediate 48 ore successive, sono significativamente più bassi nei

gruppi Test 1 e Test 2 rispetto al gruppo controllo dove è stata eseguita solamente terapia causale meccanica e manuale (Figura 6). Nel gruppo Controllo si osserva infatti una crescita della carica batterica di media, all'incirca pari al 40% tra le diverse specie batteriche prese in esame, mentre è evidente la diminuzione nei gruppi Test 1 e Test 2, soprattutto delle famiglie batteriche più aggressive facenti parte del "gruppo rosso" di Socransky¹². Evidente anche la differenza tra i soli gruppi Test 1 e Test 2. Nel gruppo Test 1 dove è stata eseguita terapia fotodinamica con led 630nm si evince una maggiore diminuzione della carica batterica



7. Fotografia di controllo a 48 ore

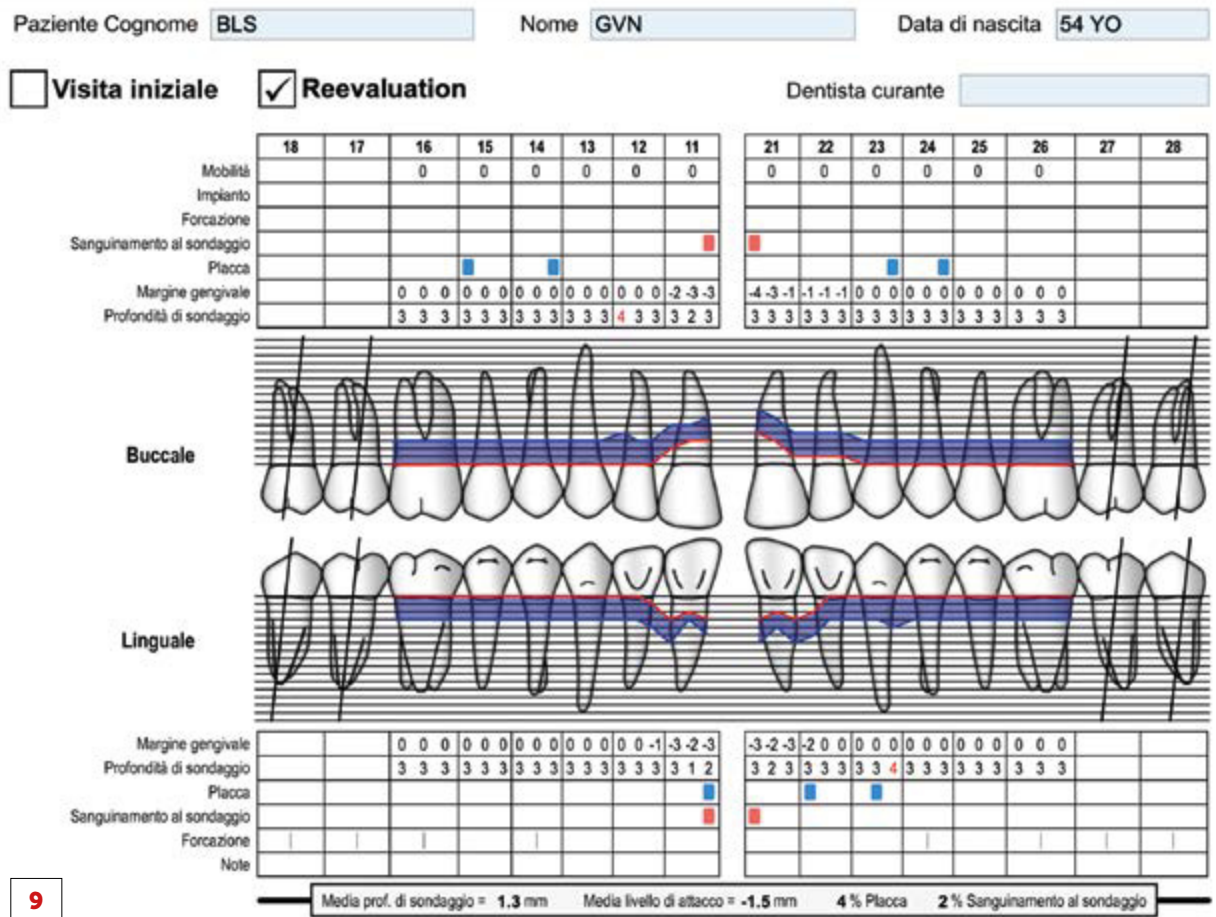
8. Follow-up 12 settimane



Tabella 1 - Analisi percentuale di diminuzione carica batterica gruppi Test 1 e Test 2

	Aggregatibacter actinomycem comitans*	Porfiromonas gingivalis*	Tennerella forsythia*	Treponema denticola*	Fusobacterium nucleatum*	Campylobacter rectus*
Gruppo Test 1 Aladent+led	0	96%±18%	98%±23%	98%±31%	99%±21%	98%±28%
Gruppo Test 2 Aladent	0	65%±22%	61%±15%	43%±19%	30%±15%	69%±21%
* batteri usati nello studio						

9. Sondaggio parodontale del paziente a 12 settimane



9

totale con un miglior controllo a 48 ore, determinata dalla perfetta sinergia tra cromoforo endogeno e fonte luminosa, capace di accelerare il processo ossidativo grazie alla liberazione delle specie reattive dell'ossigeno. Nei pazienti inseriti nel gruppo Test 2 si osserva comunque una buona diminuzione delle specie batteriche prese in esame, nonostante l'assenza di irradiazione con led 630nm; questo è sicuramente determinato dalla natura del prodotto (Aladent) che presenta un pH acido, capace così di determinare un effetto battericida primario²⁶ (Tabella 1, Figura 6).

CONCLUSIONI

Dalla elaborazione dei dati ottenuti e dai convincenti risultati clinici, sembrerebbe che la terapia di supporto alle manovre parodontali non chirurgiche data da terapia fotodinamica con acido 5-delta-aminolevulinico (Aladent) e irradiazione led 630nm possa favorire i processi di perdita dell'infiammazione dei tessuti parodontali anche nelle tasche più profonde. Grazie alla sua buona capacità battericida, il gel ALA si candida come un prodotto interessante per permettere di evitare in molti casi l'uso di antibiotici, senza favorire la resistenza batterica a queste molecole.

Inoltre, a differenza di molti validi prodotti chimici esogeni utilizzati per la terapia fotodinamica, permette la funzione di attivazione e liberazione delle specie reattive dell'ossigeno con potere citotossico, sfruttando solo la PpIX come componente totalmente endogeno.

Ringraziamenti

Si ringrazia la dott. ssa Beatrice Bianco per il contributo in questo lavoro, svolto durante la stesura della sua tesi di laurea.

Dichiarazione

Questo studio ha seguito la Dichiarazione di Helsinki sul protocollo medico e l'etica. Il Comitato Regionale di Revisione Etica del Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostica Integrata (Università di Genova) ha approvato lo studio (Unige-Disc-Prot./0010710). Un modulo di consenso informato con informazioni chiare sullo studio clinico, compresa la ricerca, procedura e scopo, nonché rischi e benefici, è stato letto e firmato da tutti i pazienti, che hanno volontariamente accettato di sottoporsi alla procedura e hanno dichiarato la propria disponibilità a tornare a intervalli regolari per la valutazione.

ABSTRACT

Il trattamento della malattia parodontale a cielo coperto ha da sempre avuto come obiettivo l'eliminazione dei residui di tartaro e placca sopra e sotto gengiva, riuscendo così a ridurre la carica batterica. Quindi l'eliminazione totale dei batteri dopo la terapia causale diventa un fattore chiave per garantire la stabilità del risultato ed evitare ricolonizzazioni dei siti trattati. Con il passare degli anni, al fine di raggiungere l'obiettivo, sono stati proposti numerosi validi prodotti chimici per fungere da supporto alle terapie canoniche, tuttavia alcuni di essi possono far manifestare alcuni effetti indesiderati come nell'uso massivo degli antibiotici. La terapia fotodinamica con acido delta-aminolevulinico (Aladent, Alpha Strumenti Srl) è un metodo non invasivo che agisce attraverso l'attivazione di questo fotosensibilizzante, inserito nelle tasche parodontali, con una luce led artificiale 630nm portando così a fenomeni fotobiologici e fotochimici il cui target è rappresentato dalla distruzione delle cellule che hanno assorbito e metabolizzato questo agente. In questo studio è stata eseguita una accurata analisi statistica relativa ai dati della conta batterica qualitativa e quantitativa (PCR) pre e post trattamento di 30 soggetti appartenenti a 3 gruppi distinti. In tutti e 3 i gruppi i siti presi in esame sono stati sottoposti a SRP e poi corrispettivamente trattati con Aladent+led 630nm, solo Aladent e non trattati con Aladent. Dalla elaborazione dei dati ottenuti e dai convincenti risultati clinici, sembrerebbe che la terapia di supporto alle manovre parodontali non chirurgiche data da terapia fotodinamica con acido delta-aminolevulinico e irradiazione led 630nm possa favorire i processi di perdita dell'infiammazione dei tessuti parodontali anche nelle tasche più profonde.

Non-surgical periodontal treatment has always had the goal of eliminating residues of calculus and plaque above and below the gum, thus managing to reduce the bacterial load. Therefore, the total elimination of bacteria after causal therapy becomes a key factor in ensuring the stability of the result and avoiding recolonization of the treated sites. Over the years, in order to achieve the goal, a lot of valid chemical products have been proposed to support canonical therapies, however some of them can cause some unwanted effects such as in the massive use of antibiotics. Photodynamic therapy with delta-aminolevulinic acid (Aladent, Alpha Instruments Srl) is a non-invasive method that acts through the activation of this photosensitizer, inserted in the periodontal pockets, with an artificial led light 630nm thus leading to photobiological and photochemical phenomena whose target is represented by the destruction of the cells that have absorbed and metabolized this agent. In this study was performed an accurate statistical analysis on the pre- and post-treatment PCR data, of 30 subjects belonging to 3 distinct groups. In all 3 groups the sites examined were subjected to SRP and then correspondingly treated with Aladent + led 630nm, only Aladent and not treated with Aladent. From the processing of the data obtained and the convincing clinical results, it would seem that the support therapy for non-surgical periodontal maneuvers given by photodynamic therapy with aminodeltalevulinic acid and 630nm led irradiation may favor the processes of loss of inflammation of the periodontal tissues even in deeper pockets.

BIBLIOGRAFIA

1. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14: 12-32.
2. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2006; 42: 180-218.
3. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2001; 25: 77-88.
4. Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000* 2004; 36: 121-145.
5. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, et al. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* 2004; 36: 98-120.
6. Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1991; 59: 2719-2726.
7. Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, et al. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 201-207.
8. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000* 2002; 28: 72-90.
9. Slots J. The search for effective, safe and affordable periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2002; 28: 9-11.
10. Magnusson I, Low SB, McArthur WP, et al. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 628-637.
11. Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2002; 73: 1188-1196.
12. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28: 12-55.
13. Walker C. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000* 1996; 10: 79-80.
14. Aoki A, Ando Y, Watanabe H, et al. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an erbium:YAG laser. *J Periodontol*. 1994;65:1097-1106.
15. Folwaczny M, George G, Thiele L, et al. Root surface roughness following Er:YAG laser irradiation at different radiation energies and working tip angulations. *J Clin Periodontol*. 2002;29:598-603.
16. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *J Photochem Photobiol B*. 1997;39:1-18.
17. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious diseases? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-450.
18. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 2004;48:2173-2178.
19. De Angelis N, Hanna R, Signore A, et al. (Effectiveness of dual-wavelength (Diodes 980 Nm and 635 Nm) laser approach as a non-surgical modality in the management of periodontally diseased root surface: a pilot study, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2018; 32:6, 1575-1582.
20. Kamp H, Tietz HJ, Lutz M, et al. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*, *Mycoses* 2005;48 (2):101-107.
21. Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, et al. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol* 2012; 88 (3):512-522.
22. Serini SM, Cannizzaro MV, Dattola A, et al., The efficacy and tolerability of 5-aminolevulinic acid 5% thermosetting gel photodynamic therapy (PDT) in the treatment of mild-to-moderate acne vulgaris. A two-center, prospective assessor-blinded, proof-of-concept study. *J Cosmet Dermatol* 2019; 18 (1): 156-162.
23. Lopez RFV, Bentley MVLB, Delgado-Charro MB, et al. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. *Pharm Res* 2001;18:311.
24. Donnelly RF, McCarron PA, Lightowler JM, et al., Bioadhesive patch-based delivery of 5-aminolevulinic acid to the nail for photodynamic therapy of onychomycosis, *J Control Release* 2005; 103 (2): 381-392.
25. Moan J, Ma W, Juzeniene A, et al. Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. *Int. J. Cancer* 2003;103 (1):132-135.
26. Greco G, Di Piazza S, Chan J, et al. Newly formulated 5% 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy on *Candida albicans* Photodiagnosis. *Photodyn Ther* 2020 Mar;29:101575. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.10.010.
27. Radunović M, Petrini M, Vljajic 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 Apr;205:111826. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111826.