JOÃO EDUARDO MIRANDA FRANCO

**Avaliação da terapia fotodinâmica nos tecidos periimplantares
durante a osseointegração**

São Paulo

2010

JOÃO EDUARDO MIRANDA FRANCO

**Avaliação da terapia fotodinâmica nos tecidos periimplantares
durante a osseointegração**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientadora: Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos

São Paulo

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Franco JEM. Avaliação da terapia fotodinâmica nos tecidos periimplantares durante a osseointegração. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Milton e Carmen**, que sempre me mostraram a importância da educação para atingir todos os objetivos na vida, principalmente minha mãe que não deixava passar nenhuma tarefa mal feita.

A minha esposa **Andréa Iguma**, que esteve comigo em todas as fases difíceis e tensas pela qual passei, superando o fantasma da pós- graduação, um verdadeiro teste para relação, por colocar a prova o companheirismo a paciência e principalmente o amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos**, que sempre me apoiou em todas as dificuldades do Mestrado, acreditando no projeto desde seu início até sua finalização, passando pela elaboração, aprovação pela FAPESP e execução.

A **Profa. Dra. Silvana Cai**, que abriu as portas do seu laboratório e dos seus conhecimentos sobre microbiologia permitindo a execução deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Sendik**, a quem sempre me espelhei como profissional, durante o convívio na graduação e monitoria, etapa onde descobri minha paixão pela prótese e por ensinar.

Ao **Prof. Dr. Hamilton Navarro**, com quem aprendi as dificuldades de uma pesquisa clínica, sempre me apoiando e me incentivando.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Magnífico Reitor Prof. Dr. João Grandino Rodas. À Faculdade de Odontologia, representada pelo seu diretor, Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

A Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá, responsável pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, com área de concentração em Prótese Dentária, pela dedicação e incentivo a pesquisa.

A FAPESP pelo auxílio pesquisa (processo 2009/51317-9), fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os docentes do Departamento de Prótese, Atlas Edson Moleros Nakamae, Carlos Gil, Maria Luiza Moreira Arantes Frigerio, Matsuyoshi Mori, Pedro Tortamano Neto, Regina Tamaki, Bruno Costa, Newton Sesma, Roberto Chaib Stegun, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi A. de Lima, quem muito me ajudou durante a elaboração do projeto de Mestrado.

As minhas auxiliares de cirurgia, Carina, Jaqueline, Talita que disponibilizaram seus poucos horários vagos dentro da faculdade para me auxiliar na clínica, ajuda imprescindível para a pesquisa acontecer.

Ao técnico de laboratório do ICB, meu chara, João, que foi fundamental nas fases de preparação laboratorial.

As Professoras e Professores do LELO em especial a Juliana Marotti, com quem pude trabalhar junto durante a pós-graduação, por compartilharem os conhecimentos do laser, uma tecnologia com inúmeras aplicações.

Aos colegas da Pós-Graduação do Departamento de Prótese: Karin, Mônica, Álvaro, Cláudio, Danilo, Márcio, Flavia, Érico, Marcelo, Alessandra, Glaís, Isabele, Mara, Thiago, que tornaram a pós-graduação mais leve e divertida.

A todos os funcionários do Departamento de Prótese, as secretárias, Val, Coraci, Sandra e Regina, que ficavam malucas com os telefonemas dos pacientes em busca de horário cada vez que eu mandava e-mails sobre a pesquisa. Aos técnicos do laboratório, Zeza, Marcos, Cristina, Luís.

Aos funcionários da Biblioteca da FOUSP, com quem tive grande contato em todos esses anos na minha busca pelo conhecimento.

Aos pacientes voluntários que sempre colaboraram com a pesquisa.

MUITO OBRIGADO E ATÉ A PRÓXIMA!

*"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais
vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda.*

Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna."

(Baltasar Gracián)

RESUMO

Franco JEM. Avaliação da terapia fotodinâmica nos tecidos periimplantares durante a osseointegração [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

A colonização por microrganismos no sulco periimplantar ocorre muito precocemente, logo após a cirurgia de instalação dos implantes. Portanto, faz-se necessário um ótimo controle de higienização, que muitas vezes não ocorre durante as primeiras semanas, devido ao receio por parte do paciente em traumatizar a área cirúrgica. A terapia fotodinâmica ou PDT (Photodynamic Therapy) torna-se como uma alternativa de solucionar ou minimizar este problema, já que danifica ou “destrói” as células bacterianas, sem provocar formação de cepas resistentes ao procedimento. Com este intuito, o projeto foi proposto a fim de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica na microbiota do sulco periimplantar. Após triagem (critérios de inclusão: normorreativos, com espaço intercalar superior, sem histórico de doença periodontal grave), 14 pacientes foram selecionados e reabilitados com implantes Standard Plus (Straumann® Dental Implant System), divididos em dois grupos, um grupo controle (GC) e um grupo submetido à terapia fotodinâmica (GPDT), cujo protocolo foi: irradiação contínua de $120\text{J}/\text{cm}^2$ de densidade de energia, numa potência de 40mW, associada ao corante azul de metileno a 0,005%. As aplicações foram realizadas no dia da instalação do implante, após 15, 30 e 45 dias. As coletas microbiológicas foram efetuadas no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana, nos dois grupos, utilizando cones de papel estéril. No GPDT, outras duas coletas foram realizadas após aplicação da terapia no dia da cirurgia e após 45 dias. Todo material coletado passou por diluições seriadas, semeado em meios de cultura e incubados em anaeróbiose para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônias totais (UFCt) e pigmentadas de preto (UFCp). Os testes estatísticos aplicados foram os de Wilcoxon e Mann–Whitney. O número de UFCt e UFCp do pós-cirúrgico imediato para 6ª semana apresentou aumento, estatisticamente significativo, nos dois grupos. No comparativo entre grupos não houve diferença, estatisticamente significativa, entre a diferença do número de UFCt e UFCp do pós-cirúrgico imediato para 6ª semana. Quanto à eficiência da PDT, os resultados

mostraram que houve uma redução, estatisticamente significativa, tanto para as UFCt como UFCp nos dois momentos aplicados. Tendo como referência a mediana, a redução foi aproximadamente de 80% e 50% para as UFCt no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana, respectivamente. Para as UFCp, os valores foram de 100% e 90%. Conclusão: A terapia fotodinâmica é eficiente para redução das UFCt e UFCp, presentes no sulco periimplantar, durante a osseointegração. No entanto, essa terapia não impede a recolonização, nem o crescimento bacteriano ao longo do tempo.

Palavras-chave: Implante Dentário. Microbiologia. Descontaminação. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

Franco JEM. Evaluation of photodynamic therapy in the peri-implant issues during the osseointegration [Dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The colonization by microorganisms in the peri-implant sulcus happens very early, right after the surgery to implant placement is finished. Therefore, a great hygienization control is required, such control does not occur in the first weeks due to the patient's fear in traumatizing the surgical area. The photodynamic therapy (PDT) becomes an alternative to solve or to minimize such problem, since it damages or "destroys" the bacterial cells, without causing the formation of strains, resistant to the procedure. This project was proposed in order to evaluate the photodynamic therapy in the microbiota of the peri-implant sulcus. After the selection of patients (criteria: normoreactive patients, presenting intercalate superior space, with no history or signs of advanced aggressive periodontitis), 14 patients were selected and rehabilitated via Standard Plus implants (Straumann® Dental Implant System), divided into two groups, a control group (GC) and a group subjected to the photodynamic therapy (GPDT), whose protocol was: continuous irradiation of $120\text{J}/\text{cm}^2$ of energy density, in 40mW of potency, associated to the Methylene blue dye at 0,005%. The applications were made in the implant placement day, after 15, 30 and 45 days. The microbiological collections were made in the immediate postoperative and in the 6th week, in both groups, by means of sterile paper points. In the GPDT, two other collections were made, one after the therapy application in the surgery day and one after 45 days. All the material collected passed through serial dilutions, plated in culture media and incubated in anaerobiosis to later counting of the total numbers of total colony-forming units (CFUt) and the numbers of black pigmented colony-forming units (CFUp). The statistical tests applied were the Wilcoxon and Mann-Whitney. The numbers of C FUt and CFUp in the immediate postoperative and in the 6th week, showed significant increase statistically in both groups. Comparing both groups, there was no statistically significant difference between the difference of the number of C FUt and CFUp in the immediate

postoperative and in the 6th week. Regarding the PDT efficiency, the results showed a reduction, statistically significant, for CFUt and CFUp, in both application moments. Considering the median as a reference, the reduction was about 80% and 50% of CFUt in the immediate postoperative and in the 6th week, respectively. To CFUp, the values were 100% and 90%. Conclusion: the photodynamic therapy is efficient to CFUt and CFUp reduction, existent in the peri-implant sulcus, during the osseointegration. However, this therapy does not prevent the recolonization, neither the bacterial increasing over time.

Keywords: Dental Implantation. Microbiology. Decontamination. Laser Therapy, Low-Level. Photochemotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

CO ₂	dióxido de carbono
Cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
µm	micrometro
µM	micromolar
µg	micrograma
mL	mililitro
mm	milímetro
mW	mili Watt
nm	nanômetro
mg	miligrama(s)
ATP	Trifosfato de adenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
g	grama
g/mol	grama por mol
h	hora
Hz	<i>hertz</i>
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
pH	potencial hidrogeniônico
PDT	Photodynamic Therapy (terapia fotodinâmica)
s	segundo
UFC	Unidades formadoras de colônias
W	Watt

LISTA DE SÍMBOLOS

CO ₂	dióxido de carbono
λ	comprimento de onda
AsGaAl	arseneto de gálio e alumínio
Ca	cálcio
InGaAlP	<i>fosfeto de índio-gálio-alumínio</i>
Nd:YAG	granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Colonização periimplantar	19
2.2 Laser	24
2.3 Azul de metileno	28
2.4 Terapia Fotodinâmica	30
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Sujeitos da Pesquisa	43
4.2 Instalações dos Implantes	45
4.3 Terapia Fotodinâmica (PDT)	46
4.4 Análise microbiológica	49
5 RESULTADOS	52
5.1 Análise da eficiência da PDT no pós-cirúrgico imediato e na 6 ^o semana	54
5.2 Análise do crescimento bacteriano do pós-cirúrgico imediato para 6 ^o semana, dos grupos C e PDT, e comparação entre eles	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	77
APÊNDICES	83

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da reabilitação oral com implantes osseointegrados é uma realidade incontestável nos dias atuais. A demanda por este tipo de tratamento ocasionou um crescimento do número de profissionais que se especializam nessa área.

O profissional deve estar atento às características funcionais, biológicas e estéticas, principalmente na região anterior da maxila. Para tanto, é necessário observar uma série de requisitos, tais como: o correto posicionamento tridimensional do implante; a presença de volume ósseo adequado; o tipo de material e o perfil emergente do intermediário protético; a preservação da mucosa pré-existente e o perfil emergente do provisório (Rebollal et al., 2006).

A papila pode influenciar na estética, na fonética e na impactação lateral de alimentos. Por outro lado, pode ser influenciada pela distância do ponto de contato em relação à crista óssea, pela profundidade de sondagem, presença de tecido fibroso ou edemaciado, posição do dente, histórico cirúrgico, restaurações proximais e grau de inflamação (Novaes et al., 2006). Portanto, é fundamental a harmonia entre o dente reabilitado e os tecidos moles, pois qualquer fator que altere negativamente o volume e a forma do tecido ósseo, bem como a cor, a forma e a saúde da mucosa periimplantar, poderá resultar em fracasso do tratamento proposto.

A busca por tratamento mais rápido e confortável para os pacientes levou à criação do protocolo de implantes não submersos, o que evita, desta forma, uma segunda intervenção cirúrgica (reabertura dos implantes), acelerando a instalação do provisório. Nessa técnica, o processo de osseointegração e a cicatrização periimplantar ocorrem ao mesmo tempo. A penetração dos implantes não submersos através da mucosa oral, situada em ambiente oral com microbiota diversificada e outros possíveis contaminantes, cria um problema muito delicado. Portanto, as condições dos tecidos moles são fundamentais durante o período de cicatrização do implante e da manutenção a longo prazo (Weber et al., 1996; Weber; Cochran, 2002).

Imediatamente após a cirurgia de instalação do implante não submerso, forma-se um coágulo que ocupa o espaço entre a mucosa e o implante e entre a

mucosa e o processo alveolar, infiltrado por numerosos granulócitos e neutrófilos. Um selamento da mucosa inicial é estabelecido durante essa fase pelo agrupamento de leucócitos em uma densa rede de fibrina (Hermann et al., 1997; Berglundh et al., 2007). A maturação tecidual só ocorre após algumas semanas de cicatrização (Berglundh et al., 1994; Lang et al., 1994; Ericsson et al., 1995; Hermann et al., 1997; Weber; Cochran, 2002; Abrahamsson et al., 1999; Moon et al., 1999; Berglundh et al., 2007).

Os tecidos periimplantares funcionam como uma barreira isolando o meio externo (oral) do interno (contato implante/osso) (Lang et al., 1994; Weber et al., 1996; Weber; Cochran, 2002; Moon et al., 1999; Berglundh et al., 2007). Em outras palavras, a formação de uma barreira de tecido mole em implantes é o resultado de um processo de maturação dentro do tecido epitelial e de proliferação durante a cicatrização de feridas (Novaes et al., 2006; Berglundh et al., 2007).

O tecido periimplantar apresenta algumas diferenças em relação ao periodontal, dentre elas destacam-se a ausência do cemento e fibras de colágeno que correm paralelas ao longo eixo dos implantes, ao contrário do periodonto que são perpendiculares. O tecido periimplantar apresenta menor densidade de fibroblastos, baixa quantidade de células de defesa e de tecido vascular. Essas características propiciam menor eficiência em prevenir uma proliferação apical da microbiota subgengival, em situações de acúmulo de placa. Assim, com o aumento do tempo de exposição à placa, a lesão torna-se maior e atinge mais facilmente a estrutura óssea (Berglundh et al., 1994; Ericsson et al., 1995; Von Pressentin, 1997; Moon et al., 1999).

Alguns autores (De Boever; De Boever, 2006; Furst et al., 2007) mostraram que a colonização por microrganismos no sulco periimplantar ocorre muito precocemente, logo após a cirurgia de instalação dos implantes não submersos. Estes microrganismos estão envolvidos tanto nas falhas precoces (Esposito et al., 1999; O'Mahony et al., 2000; Cury et al., 2003; Tolstunov, 2006) (infecção) como nas tardias (periimplantite) (De Lorenzo et al., 1997; Esposito et al., 1999; O'Mahony et al., 2000; Cury et al., 2003; Tolstunov, 2006).

Essa colonização inicial segue um modelo, com a adesão de colônias primárias, formando a película adquirida. Em seguida, os colonizadores secundários fixam-se através da adesão interbacteriana (Furst et al., 2007) que, juntos, criam um biofilme. Esse, por sua vez, promove uma proteção para as bactérias contra agentes

antimicrobianos, dificultando sua remoção com a higienização oral (Furst et al., 2007).

Sabe-se que existem diferenças nos grupos bacterianos que colonizam os sulcos periimplantares, em condições de saúde ou de doença. O sulco periimplantar sadio apresenta principalmente cocos e bacilos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e imóveis (De Lorenzo et al., 1997; Botero et al., 2005; de Leitaó et al., 2005; Covani et al., 2006; Shibli et al., 2007). Todavia, o quadro é mais desfavorável para pacientes parcialmente edentados, nos quais, mesmo em condição clinicamente saudável, os tecidos periimplantares podem apresentar bactérias periodonto patogênicas (Leonhardt et al., 1999). Dentre elas, citam-se: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* (anaeróbios estritos), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (anaeróbio facultativo) (De Lorenzo et al., 1997). Isso ocorre porque os dentes funcionam como um reservatório de bactérias que, por sua vez, colonizam o sulco periimplantar, exigindo um ótimo controle de higienização (De Lorenzo et al., 1997; Von Pressentin, 1997; Esposito et al., 1999; Leonhardt et al., 1999; Botero et al., 2005; de Leitaó et al., 2005; Covani et al., 2006; De Boever; De Boever, 2006).

Contudo, na maioria dos casos, durante o processo inicial de osseointegração, a higienização não é realizada adequadamente por receio do paciente em traumatizar a área cirúrgica (Furst et al., 2007). Assim, são favorecidos a colonização e o crescimento microbiano (Furst et al., 2007), especialmente de Gram-negativos, devido ao aumento do exsudato gengival, à presença de sangue e a uma menor tensão de oxigênio no ambiente (De Lorenzo et al., 1997). Portanto, o controle de placa é fundamental na manutenção e estabelecimento da barreira tecidual dos implantes (Ericsson et al., 1995).

Visando minimizar a contaminação, são realizados controles pré e pós-operatórios, por meio do uso profilático de antimicrobiano (antibiótico de amplo espectro) (De Lorenzo et al., 1997) e enxaguatórios bucais. Porém, a utilização de desinfetantes antibacterianos e de antibióticos sistêmicos, que podem aumentar a resistência bacteriana (Pfitzner et al., 2004), conseguem a remoção completa das bactérias da região periimplantar (Furst et al., 2007).

Clorexidina, comumente utilizada nos enxaguatórios bucais sob a fórmula de gluconato de clorexidina, é uma solução anti-séptica que combate, principalmente,

bactérias Gram-positivas, sendo pouco eficaz contra Gram-negativas (Thomas et al., 2000). Além disso, o uso contínuo ou em concentrações mais elevadas pode levar a um aumento da resistência bacteriana, devido à adaptação fisiológica da parede celular (Thomas et al., 2000). De acordo com Furst et al (2007), a clorexidina antes da cirurgia e durante a 1ª semana pós cirurgia, para instalação de implantes não submersos, é ineficiente na prevenção do estabelecimento de uma microbiota potencialmente patogênica ao redor dos dentes e dos implantes.

A utilização do laser para a descontaminação está crescendo entre os profissionais. O laser de baixa potência tem efeito de biomodulação, anti-inflamatório e analgesia (Marotti et al., 2008). Quando associado a um fotossensibilizador, ativa o mesmo, que passa a absorver os fótons, convertendo-se em um estado excitado. É possível que a energia transferida para as moléculas vizinhas resulte na formação de moléculas reativas, como o oxigênio singlete, os íons superóxidos, as hidroxilas e outros radicais livres, que podem danificar ou matar as células bacterianas (Zanin et al., 2002; Marotti et al., 2008), além de neutralizar os fatores de virulência presentes após a morte bacteriana (Bhatti et al., 1997). Esse processo é conhecido como terapia fotodinâmica ou PDT (Photodynamic Therapy).

A ação PDT depende de inúmeros fatores, como: fotossensibilizador; densidade de energia; tempo de exposição; densidade do biofilme bacteriano; comprimento de onda; capacidade de absorção de luz pelo microrganismo fotossensibilizado; estado fisiológico da bactéria; pH do meio; quantidade de água e condutibilidade térmica (Bhatti et al., 1997; Usacheva et al., 2001; Pfitzner et al., 2004; Wilson et al., 1992; Hayek et al., 2005; Yamada Júnior et al., 2004). Sendo importante o desenvolvimento de protocolos para cada uso.

A terapia apresenta como vantagens ser um método não invasivo; que não apresenta evidência de promover resistência bacteriana; de baixo custo quando comparado ao laser de alta potência; sem efeitos colaterais, além de agir seletivamente na área de aplicação (Bhatti et al., 1997; Usacheva et al., 2001; Pfitzner et al., 2004; Wilson et al., 1992; Hayek et al., 2005; Yamada Júnior et al., 2004).

O presente projeto objetiva avaliar, clinicamente, a ação da PDT sobre a microbiota da área periimplantar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Colonização periimplantar

A exposição dos implantes à cavidade oral leva, inicialmente, a formação de uma película adquirida. Essa película promove a interface entre a superfície do implante e os microorganismos primários, que por sua vez criam um arcabouço para a colonização de microorganismos secundários.

Alguns trabalhos buscaram avaliar esse processo na sua fase inicial, dentre eles:

Barboza et al. (2002) fizeram um estudo cujo objetivo foi avaliar os níveis da crista óssea adjacente aos implantes dentários submersos e não submersos durante a fase inicial de cicatrização. Além disso, avaliou-se a microbiota em torno de implantes não submersos. Dez pacientes receberam implantes bilaterais na mandíbula, um submerso e outro não. Radiografias periapicais padronizadas foram realizadas no dia da cirurgia e após quatro meses. Culturas bacterianas foram obtidas a partir dos sítios dos implantes expostos à cavidade bucal. Todos os pacientes apresentaram perda óssea maior em torno dos implantes não submersos. *Prevotella sp.*, *Streptococcus beta-hemoliticus* e *Fusobacterium sp.* foram os microrganismos identificados na maioria dos sítios. A exposição dos cicatrizadores cria focos para o acúmulo de placa que podem promover a perda óssea periimplantar. Assim sendo, a fase inicial da cicatrização pode ser crítica para o sucesso do implante.

Quirynen et al. (2005) tentaram explicar a dinâmica de recolonização e, em especial, o papel do ambiente supragengival nesse processo. Participaram 16 pacientes parcialmente desdentados, que haviam sido reabilitados com implantes. Durante a reabertura e a instalação dos cicatrizadores, os pacientes foram orientados quanto aos cuidados de higiene oral e bochecho com 0,2% de digluconato de clorexidina, duas vezes por dia. Uma, duas e quatro semanas após a instalação do pilar, amostras de placa subgengival foram coletadas das bolsas rasas e médias ao redor dos implantes (teste) e dos dentes vizinhos (microbiota imperturbável como referência). Os testes revelaram uma microbiota complexa,

incluindo várias espécies patogênicas, nas bolsas dos implantes após uma semana, com um aumento mínimo da quantidade na quarta semana. A análise desses dados mostrou que, mesmo com o ambiente supragengival como a única fonte de bactérias, uma microbiota subgengival complexa pode desenvolver-se em uma semana.

Em uma pesquisa (De Boever; De Boever, 2006), foi avaliada a colonização periimplantar de 68 implantes não submersos, durante um período de seis meses, em 22 pacientes parcialmente edentados, tratados previamente para doença periodontal agressiva. Verificou-se a presença ou não de cinco patógenos (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythensis* (Tf) e *Treponema denticola* (Td)) ao redor de cada implante após 10 dias, um, três e seis meses de pós-cirúrgico. Passados 10 dias, quatro pacientes foram positivos ($>10^3$ ufc) para Aa; 16 para Pg; um para Pi; sete para Tf e oito para Td. Decorridos seis meses, dois pacientes foram positivos para Aa; 23 para Pg; dois para Pi; 27 para Tf e 25 para Td. O número de implantes positivos para periodontopatógenos aumentou de 36 para 66. E dentro desse mesmo período, essa microbiota ao redor dos implantes manteve-se praticamente inalterada e não prejudicou a osseointegração clínica e radiográfica, não levando à periimplantite, mucosite ou início de destruição óssea.

Quirynen et al. (2006) analisaram a dinâmica de colonização subgengival do sulco periimplantar, de 42 pacientes parcialmente desdentados. Por indivíduo, foram coletadas de bolsas rasas e médias ao redor dos implantes; quatro amostras de placa subgengival (teste) e dos dentes dentro do mesmo quadrante (controle), nos prazos de uma, duas, quatro, 13, 26 e 78 semanas após a instalação do cicatrizador. Utilizou-se, então, o teste de reação de cadeia da polimerase, que revelou uma complexa microbiota (incluindo várias espécies patogênicas) nos sulcos periimplante, dentro de duas semanas após a instalação do cicatrizador. Após sete dias, a frequência de detecção para a maioria das espécies, incluindo as bactérias associadas com periodontite, já era praticamente idêntica em amostras do sulco periimplantar (5% e 20% da microbiota pertencente ao complexo vermelho e laranja), quando comparadas com as amostras dos dentes de referência. Na 13ª semana, o número de bactérias teve pequenas alterações nas proporções relativas de bactérias associadas com periodontite (8% e 33% da microbiota pertencente aos complexos vermelho e laranja, respectivamente). Em duas semanas com as técnicas

culturais, pequenas diferenças entre os dentes e implantes foram encontradas. A partir de três meses, essas diferenças desapareceram. Este estudo indica que a colonização inicial de bolsas periimplantar, com bactérias associadas com periodontite, ocorre dentro de duas semanas.

Devides e Franco (2006) mostraram a colonização do sulco periimplantar em pacientes edêntulos, por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Para isso, por meio da reação em cadeia da polimerase, os autores avaliaram a presença desses patógenos no arco mandibular de 15 indivíduos desdentados totais, antes da colocação de implantes e após quatro e seis meses da colocação de próteses fixa implanto suportada. Antes da instalação dos implantes, *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 13,3% dos indivíduos; *P. intermedia* foi detectada em 46,7% dos indivíduos, e não houve detecção de *P. gingivalis*. Após quatro e seis meses de colocação do implante, *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 60% e 73,3%, respectivamente; *P. intermedia* em 46,7% e 53,3%, respectivamente, e *P. gingivalis* em 46,7% e 53,3%, respectivamente. Portanto, os autores concluíram que quanto maior o tempo dos implantes na cavidade oral, maior a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* no sulco periimplantar desses pacientes, sem qualquer evidência clínica ou radiográfica indicando doença, no período estudado.

Em 2007, Heuer et al. buscaram determinar quantitativamente a formação do biofilme bacteriano sobre cicatrizadores. Participaram 10 pacientes que receberam um total de 14 implantes. Após período de osseointegração, foram realizadas as reaberturas e instalação de cicatrizadores. Decorridas duas semanas, os cicatrizadores foram trocados, e os novos ficaram por mais duas semanas quando, então, foram realizadas coletas microbiológicas do sulco periimplantar e os cicatrizadores foram removidos para análise microbiológica. Os resultados mostraram que a formação de biofilme ocorreu em $17,5 \pm 18,3\%$ das superfícies supragengival e somente em $0,8 \pm 1,0\%$ de superfícies subgengivais, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Quanto às coletas, a análise qualitativa revelou que, das bactérias periodontopatogênicas testadas (*Haemophilus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*), nenhuma estava presente nas amostras dos fluidos periimplantares.

Furst et al. (2007) acompanharam a colonização periimplantar no pós-cirúrgico imediato de implantes, e após uma, duas, quatro, oito e 12 semanas de

pós-cirúrgico. Eles compararam esta microbiota subgengival com a dos dentes adjacentes aos implantes. Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de uma colonização após 30 minutos, no sulco periimplantar, com aumento gradativo até a 12ª semana de pós-cirúrgico. Ao comparar os sítios dos dentes com os dos implantes após 30 minutos, um número significativamente maior de bactérias foi verificado nos primeiros (27/40 espécies). Em 12 semanas de pós-cirúrgico, aumentou para 35/40 espécies ao redor dos dentes, contra 29/40 ao redor dos implantes. Com essas informações, chegou-se à conclusão de que a colonização bacteriana já está presente no sulco periimplantar 30 minutos após a colocação do implante, e os padrões iniciais de colonização diferem entre o implante e as superfícies dentárias.

Os trabalhos acima mostraram que, além da contaminação crescente no sulco periimplantar, ao longo do tempo, existe uma contaminação inerente ao ato cirúrgico de instalação dos implantes. Alguns cuidados durante esse procedimento cirúrgico podem ser realizados, de maneira a minimizar essa contaminação.

Young et al. (2001) realizaram um estudo que avaliou a contaminação do osso coletado durante a cirurgia para instalação de implantes. Para tanto, os autores utilizaram dois protocolos de coleta, um rigoroso, no qual a coleta óssea e de fluidos bucais eram efetuadas por pontas aspiradoras diferentes; e outro não rigoroso, em que a aspiração era efetuada por uma única ponta coletora. Em análise microbiológica, foi verificada nas amostras do osso a presença de vinte e oito espécies bacterianas, dentre elas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Eubacterium sp*, *Prevotella intermedia*, *Propionibacterium propionicum* e *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, em ambos os protocolos. Uma menor população bacteriana, estatisticamente significante, foi encontrada com a utilização do protocolo rigoroso.

De Leitão et al. (2005) avaliaram a presença de DNA, através da reação em cadeia da polimerase, de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, em amostras do sulco periimplantar de 19 pacientes, parcialmente desdentados, com implantes instalados há mais de um ano. Desses pacientes, dez apresentavam história de doença periodontal e nove não. A presença desses patógenos foi observada em sete amostras, das quais quatro eram de pacientes sem histórico. Os autores concluíram que, mesmo quando sinais

inflamatórios significantes estão ausentes, a detecção qualitativa pode indicar risco de periimplantite, requerendo maior rigor no controle pós-operatório.

Botero et al. (2005) pesquisaram as diferenças bacterianas da microbiota subgengival de implantes saudáveis e com lesões periimplantar, com pelo menos um ano de função, a partir instalação da prótese. Esses foram comparados com dentes naturais adjacentes e distantes dos implantes. De 11 pacientes, amostras microbianas foram coletadas de 16 implantes com sinais de bolsa periimplantar, 12 dentes vizinhos e 11 dentes não-limítrofes para os implantes, e 15 implantes estáveis em oito pacientes (controle). Houve diferença estatística entre a microbiota subgengival em lesões periimplante e implantes estáveis para bastonetes entéricos Gram-negativos ($p < 0,05$). A presença de *P. gingivalis* (1,42%) foi detectado em lesões periimplantar, mas não em implantes estáveis. Duas correlações significativas foram encontradas: uma entre a microbiota subgengival de implantes e dentes vizinhos referente a bastonetes entéricos Gram-negativos ($p = 0,023$), e outra entre implantes e dentes não-vizinhos para *P. gingivalis* ($p = 0,042$). A detecção de frequência de bastonetes entéricos Gram-negativos (75%) e *P. intermedia/nigrescens* (25%) foi maior nas lesões periimplante ($p < 0,05$). Concluiu-se que a microbiota subgengival de lesões periimplante apresentou níveis elevados de bactérias periodontopatogênicas e bactérias superinfectantes em relação aos implantes saudáveis. Porém, o papel dessas bactérias na patogênese das lesões ainda precisa ser melhor investigado.

Renvert et al. (2007) avaliaram a microbiota de implantes clinicamente saudáveis e com diagnóstico de mucosite e periimplantite. Para tanto, eles coletaram dados clínicos e microbiológicos de 213 indivíduos (idade média: 65,7 $\pm$ 14), com 976 implantes em função (média: 10,8 anos, Desvio padrão de $\pm$ 1,5). Quarenta espécies bacterianas foram identificadas pelo método de hibridização de DNA-DNA. Implante com mucosite foi diagnosticado em 59% dos pacientes e periimplantite, em 14,9% dos casos. Na microbiota periimplantar, as análises demonstraram a prevalência de *Neisseria mucosa*, *Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum*, *F. nucleatum sp. polymorphum* e *Capnocytophaga sputigena*. Implantes com bolsa periimplantar foram correlacionados com *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum sp. vincentii*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Micromonas micros*. Em níveis mais elevados, *E. corrodens* foi encontrada em implantes com mucosite quando comparada com os implantes saudáveis ($p < 0,05$). Independentemente da situação

dos implantes, os pacientes que apresentavam dentes tinham níveis mais elevados de *P. gingivalis* ($p<0,05$) e *Leptotrichia buccalis* ($p<0,05$). Os pesquisadores concluíram que poucas bactérias diferem entre os pacientes dentados ou não.

2.2 Laser

O laser é um dispositivo que produz radiação eletromagnética monocromática (único comprimento de onda), coerente (possui relações de fase bem definidas) e colimada (propaga-se como um feixe), características estas que a distinguem da luz comum (Nowis et al., 2005; Jori et al., 2006).

Para que um laser funcione é necessário excitar um número mínimo de átomos de determinado material para um nível de energia superior, de modo a se obter uma inversão de população. Quando isso ocorre, a emissão espontânea de fótons é amplificada pelos átomos vizinhos, que vão emitir fótons estimulados pelos primeiros, levando a um efeito cascata, além de uma realimentação, ou seja, sempre manter fótons emitidos estimuladamente, interagindo com os átomos. Todo esse processo é obtido com uma cavidade óptica, uma região do espaço em que se confina luz por algum tempo, com o uso de espelhos altamente refletivos e convenientemente alinhados (Brugnera Jr et al., 1991; Gutknecht; Eduardo, 2004).

A interação do laser com os tecidos depende de vários fatores, como: comprimento de onda do laser; potência do laser; tipo de tecido e a sua capacidade de absorção; frequência de pulsos por segundo; duração do pulso; quantidade de energia aplicada; distância focal e tempo de exposição.

Os lasers utilizados na clínica diária têm comprimento de onda entre o vermelho e infravermelho próximo, portanto, na faixa não-ionizante do espectro eletromagnético, impossibilitando-os de provocar mutações celulares e, conseqüentemente, o desenvolvimento de neoplasias (Gutknecht; Eduardo, 2004).

A radiação laser pode ser refletida, transmitida, espalhada ou absorvida por um sistema biológico. Essas interações da luz com o tecido podem acontecer concomitantemente, sendo que a proporção que cada uma delas ocorrerá irá depender do tecido alvo, sua composição, modo de irradiação e das características e parâmetros da luz incidente. Assim, para que os ângulos de incidência e o de

reflexão sejam iguais a zero, é necessário que a irradiação seja perpendicular ao tecido alvo, a fim de que a absorção da luz pelo tecido seja a máxima possível (Gutknecht; Eduardo, 2004).

Em Odontologia, os lasers são utilizados em diversas especialidades como terapia complementar ao tratamento convencional. De uma forma geral, os lasers em Odontologia são divididos em lasers de alta e baixa potência. A escolha do tipo de laser irá depender, essencialmente, da patologia apresentada e do modo de absorção desejado. Logo, não existe o laser ideal mas, sim, o mais indicado para cada situação clínica (Gutknecht; Eduardo, 2004; Marotti et al., 2007).

Um dos pioneiros na pesquisa com laser de baixa intensidade nas áreas biomédicas foi o Professor Endre Mester et al. (1966), que publicaram o primeiro trabalho científico referente aos efeitos não térmicos da luz laser sobre a pele de ratos, demonstrando que células em cultura e no tecido podem ser estimuladas por uma certa dose de luz laser. Esta radiação eletromagnética não ionizante pode interagir com o corpo em níveis molecular, celular, tecidual e orgânico, atuando na biomodulação, analgesia e modulação do processo inflamatório por meio de efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotomecânicos nas células do tecido irradiado (Karu, 1989; Gutknecht; Eduardo, 2004). Quando a luz interage com as células ou tecido, se administrada na dose correta, pode estimular certas funções celulares. Esse efeito é particularmente evidente se a célula tem a sua função debilitada por desordem funcional ou injúria ao tecido (Karu, 1989; Tuner; Hode, 1998).

Os lasers de baixa potência utilizados em Odontologia disponíveis no mercado estão na faixa do vermelho (630 a 700nm) ou do infravermelho (700 a 904nm) do espectro eletromagnético, que são os comprimentos de onda mais utilizados. A escolha desse comprimento (vermelho ou infravermelho) irá depender da estrutura celular que se deseja atingir. O laser vermelho é o mais indicado no tratamento de lesões superficiais (pele e mucosa), devido à sua menor profundidade de penetração no tecido, ao contrário do laser infravermelho utilizado em nervos, ossos e músculos (Karu, 1989; Gutknecht; Eduardo, 2004; Nowis et al., 2005).

A literatura tenta explicar, hipoteticamente, a indução dos efeitos celulares promovidos pelos lasers na faixa do vermelho e do infravermelho (Karu, 1989; Labbe et al., 1990; Breitbart et al., 1996; Lubart et al., 1997; Grossman et al., 1998; Schindl et al., 2000). Basicamente, dois tipos de reações ocorrem em fotobiologia: reações primárias induzidas pela luz, que atuam sobre os tecidos absorvedores e adjacentes,

e reações secundárias que ocorrem na ausência de luz, também chamadas de efeitos indiretos, que atuam de formas local, regional e geral (Schindl et al., 2000).

As reações primárias podem ocorrer: pela absorção da luz pelas enzimas mitocondriais, resultando em aquecimento local, gerado pelo aumento de vibração molecular (Olson et al., 1981); por absorção da luz por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva a alterações na transferência de elétrons, para seus pares reduzidos, localizados na mitocôndria (Karu, 1989; Labbe et al., 1990); por porfirinas endógenas que foto-induzem oxigênios singletos (Grossman et al., 1998); ou ainda por ativação direta dos canais de Ca^{2+} da membrana celular, por meio de modificações fotofísicas, induzindo a entrada de Ca^{2+} intracelular e proliferação celular (Breitbart et al., 1996; Lubart et al., 1997). Essas situações acontecem simultaneamente no tecido irradiado, de forma que contribui para os efeitos biológicos posteriormente observados (Schindl et al., 2000).

As reações secundárias (sem a presença de luz) sinalizam transdução e amplificação. As alterações do pH intracelular, relacionadas com a ativação das ATPases e seguidas por alterações nos níveis de cálcio intracelular, parecem ser um caminho comum para a transdução do sinal e amplificação de todas as fotoreações primárias citadas (Friedmann et al., 1991).

Alguns dos mecanismos secundários relatados na literatura são: aumento de metabolismo celular; proliferação e síntese de colágeno; síntese protéica; aumento no potencial de ação de células nervosas; estímulo da formação de DNA e RNA no núcleo celular; efeitos sobre o sistema imunológico pela ativação de linfócitos; formação de capilares estimulada pela liberação de fatores de crescimento e aumento na atividade de leucócitos (Anders et al., 1993; Marques et al., 2004; Hawkins; Abrahamse, 2006).

Clinicamente, a laserterapia é utilizada no tratamento de parestesia, paralisia, nevralgia, afta, mucosite, herpes labial, queilite angular, hipersensibilidade dentinária, alveolite, pericoronarite, gengivite e periodontite, xerostomia, disfunção temporomandibular, edema, pós-operatório de tecido mole, bioestimulação óssea, entre outros.

É consenso na literatura o benefício que os lasers de baixa potência promovem aos tecidos. No entanto, os parâmetros ideais de irradiação para cada patologia ainda estão sendo definidos (Meneguzzo, 2007).

Diversos estudos relatam os benefícios dos lasers de baixa potência em Implantodontia: aceleração da reparação óssea; formação de um osso mais vascularizado e de melhor qualidade; aumento da taxa de osseointegração; maior adesão celular à superfície do implante e proliferação de fibroblastos; redução do edema e da dor no pós-operatório; aceleração do processo de reparação do tecido mole (quando aplicado sobre as suturas); e melhora do quadro de parestesias (Dörtbudak et al., 2002; Khadra et al., 2005; Jakse et al., 2007; Kim et al., 2007; Lopes et al., 2007).

Dörtbudak et al. (2002) analisaram os efeitos do laser vermelho de baixa potência em osteócitos e na reabsorção óssea, após instalação de implantes em macacos. A região foi irradiada unilateralmente com laser com comprimento de onda de 690nm, 100mW de potência e 6J de energia. Passados cinco dias, o osso foi retirado em bloco e analisado histomorfologicamente. No grupo irradiado, a porcentagem de osteócitos viáveis foi de 41,7%, enquanto que no grupo controle foi de apenas 34,4% ($p < 0,027$). A diferença da área reabsorvida, entretanto, não teve diferença estatística significativa entre os grupos.

Nussbaum et al. (2002), realizaram um estudo para avaliar o efeito do comprimento de onda sobre o crescimento de microorganismos. Os autores utilizaram emissores com 630, 660 e 810nm de comprimento de onda sobre a cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O laser de He-Ne, com comprimento de onda de 630 e 660nm, atuou com densidade de energia variando de um, dois, cinco, 10, 20 e 50J/cm². O laser com 810nm de comprimento de onda atuou com densidade de energia de um, dois, cinco, 10, 20, 30, 40 e 50J/cm². Os resultados obtidos permitiram que os autores observassem uma mudança significativa no crescimento bacteriano, no caso de densidades de energia variando de um a 20J/cm²; e o comprimento de onda de 630nm parece ser o mais comumente associado à inibição do crescimento bacteriano, o que favorece a cicatrização de feridas.

Jakse et al. (2007) estudaram, em carneiros, a influência da terapia com laser de baixa potência na regeneração óssea e osseointegração de implantes dentais, após levantamento do seio maxilar. Doze animais foram submetidos à elevação bilateral do seio maxilar com enxerto da crista ilíaca. Os animais foram submetidos à eutanásia 16 semanas após o segundo estágio cirúrgico. As regiões dos implantes foram irradiadas três vezes por semana unilateralmente, após o levantamento do

seio e durante o segundo estágio cirúrgico com laser vermelho de baixa potência (680nm, 75mW, 3-4J/cm²). Concluiu-se que a regeneração óssea na região do seio, dentro dos parâmetros desse estudo, não teve benefício pela irradiação; entretanto, a laserterapia, provavelmente, influenciou positivamente no processo de osseointegração dos implantes inseridos.

2.3 Azul de metileno

Uma das linhas de pesquisas fundamentais para a evolução da terapia fotodinâmica é o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. Buscam-se melhorias na ação, menor custo, melhor conhecimento sobre os mecanismos de ação e da relação entre a estrutura e a atividade (Deda et al., 2009; Pavani et al., 2009), o que favorecerá uma maior popularização da PDT.

Para que um composto venha a atuar como um bom fotossensibilizante é importante que este apresente as seguintes características: banda de absorção e eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio; baixa citotoxicidade no escuro; facilidade de obtenção em escala industrial, com boa reprodutividade e custos reduzidos; permeabilidade em tecidos e seletividade (Deda et al., 2009; Pavani et al., 2009).

O azul de metileno (AM) é um composto aromático heterocíclico, do grupo dos corantes fenotiazínicos, sólido verde escuro, com fórmula molecular C₁₆H₁₈CIN₃S e massa molar 319,85 g/mol. Pode ser utilizado em alta concentração (1%) sem causar toxicidade em humanos (Wainwright, 1998; Meisel; Kocher, 2005; Miyamoto et al., 2007). Os corantes fenotiazínicos atuam de forma eficiente em bactérias, sendo mais efetivos contra as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas (Usacheva et al., 2001; Teichert et al., 2002; Gad et al., 2004).

Como corante bacteriológico e indicador, apresenta inúmeras aplicações nos mais variados campos das ciências biomédicas, biológica e química. Efetivo na PDT, devido ao seu comprimento de onda de absorção máxima igual a 660nm (vermelho visível), possui boa penetração no tecido alvo, com mínima toxicidade e ação microbiana (Usacheva et al., 2001; Teichert et al., 2002).

O AM, por ser um fotossensibilizador catiônico, promove uma ligação eletrostática na superfície externa da célula, o que causa um dano inicial à sua parede e induz uma maior atividade fotodinâmica contra as bactérias (Wainwright, 1998; Gad et al., 2004; Meisel; Kocher, 2005; Jori et al., 2006; Miyamoto et al., 2007; Prates et al., 2007). É facilmente lavável, não mancha os tecidos orais nem componentes protéticos (Usacheva et al., 2003).

Sua ação fotodinâmica ocorre por meio da geração, principalmente, do oxigênio singlete, uma espécie excitada altamente reativa capaz de oxidar moléculas orgânicas com alta densidade eletrônica, como por exemplo, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Sua formação em meio biológico está associada a processos fisiológicos e patológicos. Como exemplo pode-se citar o seu envolvimento nos mecanismos de defesa contra microrganismos (Wainwright, 1998; Miyamoto et al., 2007).

Devido à ressonância com os lasers de emissão na região vermelha do espectro eletromagnético, o AM é um dos principais fotossensibilizadores utilizados para PDT, com ótimos resultados na redução bacteriana.

Wilson et al. (1993) avaliaram a ação da terapia fotodinâmica em bactérias patogênicas com variação do fotossensibilizador e dos microorganismos. Um dos fotossensibilizadores foi o AM com concentração de 25µg/mL. Na ausência de luz e nesta concentração, não houve redução estatisticamente significativa em nenhuma das bactérias testadas (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*). Porém após a irradiação, com laser de He-Ne, verificou-se diferença significativa na redução dos microrganismos.

Usacheva et al. (2001) estudaram a eficiência do azul de metileno e do azul de toluidina sobre diversas bactérias com e sem irradiação laser. Variou-se a concentração do corante de 1 a 200µM e as irradiações utilizadas foram 630nm e 664nm. O azul de metileno teve maior efetividade, como fotossensibilizador, do que o azul de toluidina para os comprimentos de onda utilizados. Em altas concentrações, por um longo período de tempo sem luz (200 a 230µM por 1 hora), foi observado efeito bactericida contra Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores afirmam que, por serem corantes hidrofílicos, podem passar através dos canais de proteína (que são preenchidos por água), presentes na membrana externa das bactérias. Portanto, quanto maior essa habilidade de o fotossensibilizador difundir-se através da membrana, maior será o grau de destruição bacteriana; e quanto maior a

concentração e a permanência do fotossensibilizador, maior seu efeito bactericida sem a aplicação da luz (Usacheva et al., 2001).

Chan e Lai (2003) avaliaram, *in vitro*, o efeito do azul de metileno a 0,01% na PDT com dois tipos de laser (He-Ne e AsGaAl, 100 mW) em diferentes bactérias. O laser de He-Ne foi utilizado no comprimento de onda de 632nm, por 30s, com fluência de 3,2J/cm². Já o laser de AsGaAl atuou por 30 e 60s no vermelho (665nm, 10,6 e 20,2J/cm², respectivamente), e 60s no infravermelho (830nm, 20,2J/cm²). Os autores analisaram também a ação somente do laser ou somente do corante sobre as bactérias e o aumento de temperatura durante a irradiação. Os resultados obtidos foram: a PDT com laser de He-Ne promoveu redução das bactérias de 55 a 81%; o laser AsGaAl no infravermelho apresentou redução de apenas 40 a 55%; o mesmo laser no vermelho reduziu de 71 a 88% em 30s, e 99 a 100% no tempo de 60s. Deste último protocolo *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *S. sanguis* tiveram redução de 99 a 100%, enquanto que *A. actinomycetemcomitans* e *F.nucleatum*, de 95 e 96%, respectivamente. Os autores concluíram que somente o corante ou a luz não teve nenhum efeito bactericida, e o corante não converteu a energia da irradiação em calor, comprovando a baixa toxicidade e confiabilidade da técnica.

2.4 Terapia Fotodinâmica

O termo “ação fotodinâmica” surgiu pela primeira vez em 1900, quando Von Tappeiner & Raab constataram, acidentalmente, a morte dos microrganismos que estavam sendo cultivados em um meio de cultura contendo acridina diluída, e foram expostos à luz intensa de raios durante uma tempestade. Posteriormente (1907), eles descreveram o tratamento de tumores de pele, uma combinação de eosina aplicada topicamente com exposição à luz branca. Postularam que algum produto da fluorescência, e não somente a luz, seria o responsável pela elevada toxicidade (Raab, 1900; Tedesco, 2007).

Nos últimos anos, a comunidade científica mundial tem dado atenção especial à mais nova forma de ação do LILT (Low Intensity Laser Therapy), a terapia fotodinâmica (PDT). Inicialmente utilizada na área Médica para tratamento

oncológico, tem sido empregada na Odontologia com grandes perspectivas no controle antimicrobiano.

A PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*, é definida como uma reação fotoquímica, oxigênio-dependente na qual a ativação de um corante, conhecido como fotossensibilizador, por uma luz visível e de comprimento de onda apropriado, leva à geração de espécies de oxigênio reativo, principalmente oxigênio singlete ou radicais livres, que são tóxicos aos microorganismos (Ochsner, 1997; Wainwright, 1998; Maisch, 2007).

Sua ação deve-se à transferência da energia do feixe de luz laser para o corante, endógeno ou exógeno, que deve estar impregnado em alguma estrutura do microorganismo alvo. A energia absorvida pelo corante produzirá substâncias altamente reativas que causarão sua morte. As reações tipo I ou II que ocorrem são de oxido-redução e peroxidação (superóxidos), levando a degradação de proteínas, inibição de replicação e aumento de permeabilidade em membranas e paredes celulares. Além da ação imediata, essa técnica não promove injúria aos tecidos circunvizinhos, nem aumento de temperatura (Soukos et al., 1996; Wainwright, 1998; Prates et al., 2007).

Na reação do tipo I, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizador excitado a um substrato oxidável. A transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio gera um radical no substrato semi-oxidado e corante semi-reduzido. A subsequente reação de ambos com o hidrogênio leva à formação de um substrato oxidado, à volta do fotossensibilizador ao estado fundamental e à produção de espécies reativas de oxigênio (Martin; Logsdon, 1987). Na reação do tipo II, o estado tripleto do fotossensibilizador passa sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental. A molécula resultante é o oxigênio singlete, um poderoso agente oxidante e altamente tóxico para as células. Sendo assim, os fotossensibilizadores, sob iluminação com comprimento de onda apropriado, são excitados para promover a produção de espécies reativas de oxigênio. As subseqüentes reações dessas espécies no meio biológico resultam em inativação das células-alvo por meio de reações de óxido redução com lipídeos da membrana celular, ácidos nucleicos e proteínas. A iluminação precisa da área alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que somente na área irradiada ocorre o efeito fotodinâmico (Wainwright, 1998).

Essa técnica apresenta diversas vantagens no tratamento de infecções causadas por microrganismos patogênicos, tais como amplo espectro de ação; ausência de efeito colateral; baixo potencial mutagênico; ser uma terapia específica à célula alvo; início de sua atividade somente quando exposta à luz; e o não favorecimento da seleção de cepas resistentes (Jori, 2006; Maisch, 2007), muito comum com o uso indiscriminado de antibióticos (van Winkelhoff et al., 1996).

A PDT pode ser influenciada, entre outros fatores, pelo pH do meio; conteúdo de água; presença de exsudato; sangue; concentração e tempo de permanência do agente fotossensibilizador; comprimento de onda do laser; energia utilizada e tempo de exposição à luz laser (Wilson, 1994; de Almeida et al., 2006).

Sua eficiência sobre bactérias orais começou a ser investigada mais profundamente a partir da década de 90, quando Dobson e Wilson (1992) demonstraram redução bacteriana utilizando o laser de He-Ne (Hélio-Neônio), 632,8nm e 7,3mW de potência, associado aos fotossensibilizadores azul de toluidina (AT), azul de metileno (AM), ftalocianina e hematoporfirina. Foram testadas *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, obtidas de biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica. As amostras foram expostas à luz, na presença e ausência dos corantes, com concentração de 50mg/mL. Os autores concluíram que a combinação laser e corante alcançou uma significativa redução bacteriana.

Conforme os resultados obtidos, diversos autores buscaram determinar os melhores protocolos para PDT e identificar os fatores que influenciam essa terapia, através de pesquisas *in vitro*.

Haas et al. (1997), avaliaram se diferentes superfícies dos implantes poderiam influenciar a aderência do biofilme bacteriano. Em um estudo, *in vitro*, testaram a terapia fotodinâmica sobre discos de titânio com superfície polida ou revestida por hidroxiapatita. Estes discos, previamente contaminados com *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, foram divididos em quatro grupos experimentais. O grupo 1 recebeu azul de toluidina na concentração de 100µg/mL e, após um minuto, foi irradiado com o laser diodo com 905nm de comprimento de onda operando no modo pulsado, com potência de 7,3mW por 60s. O grupo 2 não recebeu nenhum tipo de tratamento. O grupo 3 recebeu irrigação somente com soro fisiológico por um minuto e subsequente aplicação do laser com os mesmos parâmetros do grupo 1. O grupo

4 foi irrigado somente com azul de toluidina. Culturas negativas foram observadas apenas com a combinação do laser ao corante. Nas superfícies tratadas apenas com azul de toluidina e laser isoladamente, não ocorreu diminuição da quantidade de bactérias. Já no caso de associação do corante com o laser, a terapia fotodinâmica promove a morte bacteriana e pode ser utilizada no tratamento da periimplantite independentemente da superfície do implante.

O trabalho realizado em 2001 (Usacheva et al.) teve como objetivo avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina O na fotossensibilização letal de microorganismos patogênicos. Os corantes foram utilizados nas concentrações: 10, 20, 30 40, 50, 100, 150, 200µM em diferentes bactérias, *in vitro*, como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginos*. Os protocolos dos lasers foram: Argônio com comprimento de onda de 630nm e o laser diodo de comprimento de onda de 664nm variando de 10 e 60J/cm² e a intensidade de 50 a 100mW/cm². Os resultados obtidos pelos autores indicaram que todos os microorganismos foram eliminados em algum grau quando expostos aos dois lasers na presença dos corantes. No entanto, a fotossensibilização dependeu do corante utilizado, sua concentração, fluência, tempo de contato e intensidade da luz, bem como da espécie bacteriana envolvida.

Matevski et al. (2003) realizaram um estudo, *in vitro*, para avaliar se alguns fatores externos, como a presença do fluido gengival, sangue, saliva, dentre outros, podem ter influência nos resultados da terapia fotodinâmica. A fotossensibilização letal foi analisada em culturas de bactérias periodontopatogênicas como as *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*, *P. intermédia*, *A. actinomycetemcomitans* associadas ao sangue ou ao soro fisiológico simulando o fluido gengival, tendo como fonte de luz o laser de He-Ne 635nm e lâmpada de xenônio com filtro vermelho. A droga fotossensibilizadora testada foi o azul de toluidina O, nas concentrações de 12,5µmg/ml e 50µmg/ml. Os autores puderam observar redução na concentração dessas bactérias, quando a terapia fotodinâmica foi realizada com as duas fontes de luz, com exceção apenas para o *B. forsythus*, que apresentou um aumento ao ser exposto à terapia fotodinâmica com a luz de xenônio. Os autores concluíram que apesar da ação bactericida ser significativa, a PDT tem sua ação afetada negativamente pela presença de sangue e fluido gengival, pois estes podem refletir

ou absorver a luz, além de promover um “efeito protetor” para as bactérias, impedindo a penetração do corante e do laser até a célula alvo.

Pfitzner et al. (2004) determinaram, *in vitro*, a eficácia dos fotossensibilizadores clorina e6, BLC101O e BLC1014, na concentração de 10 μ M, tendo como fonte de luz o laser de diodo de 662nm, com potência máxima de 4W. As amostras foram irradiadas com duas diferentes densidades de energia: 5,3J/cm² e 20,1J/cm². Seus estudos mostraram que os fotossensibilizadores clorina e6 e BLC101O são eficientes na redução de microorganismos periodontopatogênicos.

Gad et al. (2004) analisaram o efeito de corantes catiônicos, dentre eles o azul de metileno, ativados pelo laser com 665nm de comprimento de onda e 40J/cm² de densidade de energia, depositada em *Staphylococcus epidermoides* e *aureus*, com alterações na cápsula e na produção de exotoxinas. Concluiu-se que a PDT é eficaz sobre as cepas testadas.

Diante do número de trabalhos, *in vitro*, que mostram o efeito letal da terapia fotodinâmica sobre bactérias periodontopatogênicas, abriu-se caminho para estudos com animais e em humanos, com destaque para trabalhos realizados a fim de combater a doença periodontal e periimplantar.

Para avaliar o efeito dessa terapia no tratamento da doença periodontal em humanos, Yilmaz et al. (2002) selecionaram um grupo de 10 pacientes, que apresentavam quatro dentes unirradiculados com perda óssea de 4mm na superfície mesial, sendo um por quadrante. Os pacientes foram divididos em quatro grupos experimentais: raspagem e alisamento radicular associado ao laser e azul de metileno 0,05%; apenas a aplicação do laser; apenas raspagem e alisamento radicular; e somente técnicas de higiene oral. O laser utilizado foi o Arseneto de Gálio com 685nm de comprimento de onda, na frequência de 5Hz com potência de 30mW e densidade de energia de 1,6J/cm², aplicado logo após a raspagem e alisamento radicular e nos dias dois, quatro, nove e 11. Os autores observaram redução significativa no índice de placa e no índice gengival em todos os grupos. Ao avaliar o sangramento à sondagem e profundidade de sondagem, verificou-se redução significativa apenas nos grupos tratados com raspagem e alisamento radicular associado ou não ao laser. Assim, essa nova opção terapêutica (laser mais corante) pode ser vantajosa no tratamento da doença periodontal inflamatória.

Em 2006, Shibli et al. avaliaram clínica e histomorfometricamente os resultados da terapia fotodinâmica, coadjuvante da regeneração óssea guiada, no

tratamento de periimplantites em cinco cães. Foram necessários 40 implantes dentais com quatro diferentes superfícies: 10 de titânio puro; 10 de titânio tratadas com plasma; 10 tratadas com ácido; e 10 jateados com óxido. Feita a indução de periimplantites por ligaduras e decorridos três meses, os animais foram submetidos ao tratamento cirúrgico, no qual metade da boca foi tratada por debridamento mecânico e regeneração óssea guiada (lado controle), enquanto que a outra parte (lado teste) recebeu o mesmo tratamento do controle associada a PDT. O laser utilizado foi diodo AsGaAl, com comprimento de onda de 830nm, potência de 50mW e tempo 80s ($4\text{J}/\text{cm}^2$), tendo o azul de toluidina como agente fotosensibilizador ($100\mu\text{g}/\text{ml}$). Os animais foram sacrificados cinco meses após os tratamentos. O grupo controle apresentou uma exposição precoce das membranas em todas as superfícies, já no grupo teste foi observada uma maior altura óssea. A conclusão foi que a terapia fotodinâmica associada à regeneração óssea guiada permitiu uma melhor re-osseointegração nas áreas adjacentes aos defeitos periimplantares.

Em 2007, de Almeida et al. avaliaram histológica e radiograficamente o efeito da terapia fotodinâmica na progressão da doença periodontal induzida em ratos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=30). Grupo I: nenhum tipo de tratamento realizado, somente a presença da ligadura; Grupo II: tratamento com aplicação tópica de azul de metileno ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) dois dias após adaptação da ligadura; Grupo III: tratamento com laser em baixa intensidade dois dias após adaptação da ligadura; e Grupo IV: tratamento com PDT dois dias após adaptação da ligadura. Os resultados radiográficos indicaram uma preservação significativa de tecido ósseo nos animais tratados pela terapia fotodinâmica no 7º e 15º dias. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica reduziu a destruição periodontal.

De Oliveira et al. (2007) estudaram o efeito da PDT em pacientes com periodontite agressiva. Em cada paciente, metade da cavidade bucal foi tratada pela raspagem com instrumentos manuais e a outra com a terapia fotodinâmica, utilizando um laser com comprimento de onda de 690nm associado ao fotosensibilizador fenotiazina. Os padrões analisados foram: o índice de placa; índice gengival; sangramento à sondagem; profundidade de sondagem; recessão gengival; e o nível de inserção clínica relativa. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica e a raspagem convencional apresentam resultados clínicos similares, para o tratamento não cirúrgico da periodontite agressiva.

Andersen et al. (2007), com objetivo de avaliar o efeito da fotodesinfecção como método coadjuvante ao tratamento da doença periodontal convencional, selecionaram 33 pacientes com quadro de periodontite crônica. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o tratamento: G1- apenas com a fotodesinfecção; G2- apenas com raspagem e alisamento radicular; G3- com raspagem e alisamento radicular e posterior tratamento com a fotodesinfecção. O protocolo foi o azul de metileno a 0,05%, na forma de gel, e o laser diodo com 670nm e potência de 150mW. O tempo de exposição por sítio foi de 60s e densidade de energia com variação entre 10-20J/cm². Os autores puderam observar que a terapia que apresentou a melhor redução na profundidade da bolsa e ganho de inserção após seis e 12 semanas foi a fotodesinfecção associada à raspagem e alisamento radicular.

Yamada Jr (2007) avaliou a atividade antibacteriana da PDT sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Vinte ratos machos foram tratados previamente por cinco dias com antibiótico sistêmico. Após esse período, foi realizada a indução da doença periodontal e a divisão em dois grupos de tratamento: Grupo RM: remoção da placa com escova; Grupo RM + PDT: mesmo tratamento do Grupo RM associado a PDT. Para a realização da PDT, foi utilizado o azul de metileno na concentração de 0,01% e, passados cinco minutos, as bolsas foram irradiadas com laser de baixa intensidade (P=100mW; t=60s e E=5,4J). Foi obtida uma redução microbiana de 93,5% no Grupo RM+PDT e de 87,7% no Grupo RM. Como conclusão, o autor sugeriu que a PDT pudesse ser uma alternativa promissora como método coadjuvante ao tratamento periodontal.

Em um estudo, *in vivo*, os autores (Braun et al., 2008) avaliaram o efeito da PDT associada a raspagem e alisamento radicular. Vinte pacientes com periodontite crônica não tratados foram incluídos em estudo boca dividida. Todos os dentes receberam tratamento periodontal com raspagem e alisamento radicular; em seguida, dois quadrantes (grupo teste) receberam a PDT. Foram avaliados os parâmetros clínicos: taxa de fluxo do fluido sulcular; sangramento à sondagem; nível de inserção relativo; profundidade de sondagem e recessão gengival. Para os autores, o tratamento convencional (raspagem e alisamento) pode ser melhorado com a adição da PDT.

Em um estudo (Dortbudak et al., 2001) com 15 pacientes diagnosticados com periimplantite, foi demonstrado redução bacteriana (*P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A.*

actinomycetemcomitans) em implantes IMZ, utilizando laser de diodo (690nm) associado ao azul de orto-toluidina. A redução obtida foi de 92%, em média, sendo 97% para *P. gingivalis*.

Em pesquisa com cães, Shibli et al. (2003) analisaram o tratamento da periimplantite associada à terapia fotodinâmica, seguida de regeneração óssea guiada. A periimplantite foi induzida por ligadura, durante dois meses e, após remoção da mesma, esperou-se o desenvolvimento da periimplantite crônica por 12 semanas. Os cães foram, então, tratados com debridamento mecânico e posterior fotossensibilização, tendo como corante o azul de toluidina O (100µg/mL) associado ao laser diodo de 685nm (200J/cm²), com posterior regeneração tecidual guiada. Concluiu-se que o tratamento da periimplantite, associando PDT e regeneração óssea guiada, obteve formação óssea significativa.

Hayek et al. (2005) compararam os efeitos da terapia fotodinâmica com a técnica convencional na redução microbiana de periimplantites induzidas por ligaduras em cães. Dezoito terceiros pré-molares de nove cães foram extraídos e implantes foram posicionados. Terminada a osseointegração, periimplantites foram induzidas através de ligaduras. Após quatro meses, as ligaduras foram removidas e a flora bacteriana normal foi estabelecida por outros quatro meses. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. No grupo convencional, as periimplantites foram tratadas com retalhos mucoperiostais, para realizar a raspagem das superfícies dos implantes, e a seguir as áreas foram irrigadas com clorexidina a 0,12%. No grupo da PDT, após o retalho mucoperiostal as áreas foram tratadas com PDT (Pasta-base de azul de metileno e laser de baixa potência AsGaAl – 660nm, 40mW, 7,2J). As amostras microbiológicas foram obtidas antes e imediatamente após os tratamentos. Os resultados deste estudo mostraram que a *Prevotella sp*, *Fusobacterium sp* e a *S. Beta-haemolyticus* foram reduzidas significativamente para ambos os grupos após o tratamento e nenhuma diferença pode ser observada entre os grupos. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica é um método não invasivo eficiente, para reduzir microrganismos, em peri-implantites.

Em busca de alternativas aos métodos convencionais para suprimir bactérias periodontopatogênicas, Sigusch et al. (2005) utilizaram a PDT com dois tipos de fotossensibilizadores (Cloro e6 e BLC 1010) em cães. Esses foram infectados com *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* em áreas subgengivais. Na seqüência, foram observados sinais clínicos de inflamação gengival, incluindo

aumento do edema e do sangramento após sondagem. Foi feito monitoramento microbiológico antes e depois do tratamento. A PDT foi conduzida com um laser de diodo (662nm e 0.5W de potência) e os fotossensibilizadores. O procedimento da PDT, com os dois tipos de fotossensibilizadores, causou uma significativa redução na inflamação, quando comparado ao controle feito somente com o laser. Além disso, a PDT associada ao Cloro e6 causou uma notável redução em *P. gingivalis*. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica foi efetiva na redução dos sinais clínicos, como edema e sangramento durante sondagem, de uma doença periodontal.

Outro campo que cada vez ganha mais espaço no estudo da PDT é a avaliação e contribuição dessa terapia para cicatrização tecidual, conjuntamente com o efeito bactericida.

Soukos et al. (1996) avaliaram os efeitos da PDT, *in vitro*, sobre queratócitos orais humanos, fibroblastos e *S. sanguis*. O objetivo era avaliar se a PDT atuaria sobre as bactérias causadoras da doença periodontal sem provocar danos aos tecidos adjacentes. Os resultados mostraram que o uso de baixas concentrações de corante, associado ao laser provocava a morte bacteriana sem reduzir a viabilidade celular.

Outro estudo (Espinosa, 1999) analisou o processo de reparação de feridas cutâneas associada à droga fotossensibilizadora. Nesse experimento, ratos foram tratados com laser de 635nm ou laser de 904nm, associados ou não ao azul de metileno (100µmg/ml), tendo como controle, feridas não tratadas. O autor observou que a reparação tecidual foi mais evoluída nos grupos tratados com laser ou pela terapia fotodinâmica. Os resultados foram mais evidentes, em ordem decrescente, no grupo tratado com azul de metileno e laser com 635nm, azul de metileno e laser com 904nm, laser de 635nm e laser de 904nm.

Lopes (2000) avaliou a ação do laser, do azul de metileno e da associação dos dois no processo de reparação alveolar em feridas de extração dental infectadas. Para isso, 48 ratos que, após exodontia do incisivo superior, tiveram seus alvéolos contaminados com secreção purulenta de ratos que apresentavam alveolite. Após três dias da evolução da alveolite, esses animais foram divididos em quatro grupos. Grupo I - grupo controle, no qual nenhum tipo de tratamento realizado; Grupo II – curetagem alveolar e posterior irrigação com azul de metileno na concentração de 100µg/mL; Grupo III – curetagem alveolar e posterior aplicação

do laser de Arseneto de Gálio e Alumínio com 635nm depositando na área $3,2\text{J}/\text{cm}^2$ de densidade energética por 240 segundos; Grupo IV- curetagem e aplicação da PDT no mesmo protocolo do laser utilizado no grupo III. Após sete, 15, 21 e 28 dias de tratamento, os ratos foram sacrificados e realizou-se a análise histológica. Concluiu-se que no grupo controle houve um atraso na cronologia de reparação alveolar; o agente fotossensibilizador não promoveu efeitos indesejáveis à reparação alveolar; já o uso do laser promoveu uma reparação mais acentuada e diferenciada que o grupo controle. Quando o autor realizou a PDT, o processo de reparação alveolar demonstrou-se mais evoluído e diferenciado do que com o azul de metileno ou com o laser isoladamente.

Kömerik et al. (2002) avaliaram o efeito do laser na mucosa de ratos na presença do azul de toluidina O, em diferentes concentrações, e sua capacidade a penetração no tecido. Foram utilizadas concentração de 25, 50 e $200\mu\text{g}/\text{mL}$ e o laser diodo com comprimento de onda de 633nm e potência de 100mW. A mucosa recebeu $25\mu\text{L}$ do corante e posterior aplicação do laser, e o lado oposto da mucosa foi tido como controle negativo. Os grupos experimentais foram compostos por diferentes combinações: $25\mu\text{g}/\text{mL}$ do corante e posterior exposição do laser por cinco minutos, totalizando uma densidade de energia de $110\text{J}/\text{cm}^2$; $50\mu\text{g}/\text{mL}$ do corante e posterior exposição do laser por oito minutos, totalizando uma densidade de energia de $170\text{J}/\text{cm}^2$; e $200\mu\text{g}/\text{mL}$ do corante e posterior exposição do laser por 16 minutos, totalizando uma densidade de energia de $340\text{J}/\text{cm}^2$. Os autores também avaliaram o efeito do laser e do corante de forma isolada. Histologicamente, nenhum grupo apresentou processo inflamatório, nem alterações nas fibras musculares, tecido conjuntivo, epitélio, vasos sanguíneos e necrose tecidual. Para os autores, os resultados obtidos asseguram o uso tópico do azul de toluidina O associado ao laser na cavidade oral, para o tratamento de infecções tópicas.

Kömerik et al. (2003) avaliaram a terapia fotodinâmica na cavidade oral de ratos. Após inoculação de $25\mu\text{L}$ de *P. gingivalis*, na região dos molares superiores, foi administrado topicamente azul de toluidina, nas concentrações de 0,01, 0,1 e $1\text{mg}/\text{mL}$, e laser diodo de 630nm, depositando na área energia de seis, 12, 24 e 48J nos tempos correspondentes de um, dois, quatro e oito minutos. Na análise histológica, nenhuma alteração foi encontrada nas estruturas do periodonto, mesmo nas concentrações mais altas, tanto do corante quanto do laser. Na análise morfométrica, observou-se redução significativa de perda óssea alveolar com o

protocolo de 0,1 e 1mg do corante associado ao laser com 48J de energia, em comparação ao grupo controle que não recebera nenhum tratamento. Nenhuma redução significativa de perda óssea alveolar foi constatada com o uso apenas do corante ou do laser. Os resultados radiográficos foram semelhantes aos da análise morfométrica, exceto quando utilizou-se 1mg/ml do corante na ausência do laser, o que resultou em significativa redução da perda óssea alveolar. Os autores concluíram em seus estudos que a terapia fotodinâmica, tendo como corante o azul de toluidina, promoveu fotossensibilização letal em um importante periodontopatógeno presente na bolsa periodontal, sem causar danos aos tecidos adjacentes, e que a perda óssea alveolar foi significativamente menor nos ratos tratados com a terapia.

Silva Neto (2004) testaram o uso do laser e de drogas fotossensibilizadoras na cicatrização de feridas em ratos. Com o uso do *punch*, foram realizadas as feridas cirúrgicas nos animais e, posteriormente, divididos em seis grupos: 1. Controle (não tratado); 2. Tratados à base de gel; 3. Tratados com droga fotossensibilizadora; 4. Tratados com laser (InGaAlP, 685nm; 2,5J/cm²; 35mW); 5. Tratados com laser em associação com droga fotossensibilizadora (PDT); e 6. Tratados com laser associado à droga fotossensibilizadora e à base de gel. Após o procedimento cirúrgico, as respectivas modalidades terapêuticas foram executadas diariamente, e os animais foram sacrificados no 8º dia. Realizada a análise histológica, os animais dos grupos 3, 4, 5 e 6 apresentaram um maior conteúdo de colágeno e uma melhora na epitelização. A remodelação do tecido conjuntivo foi mais evidente nos grupos 5 e 6. Os resultados indicaram um efeito sinérgico evidente entre o laser, a droga fotossensibilizadora e o gel de liberação da droga na cicatrização tecidual.

Lima et al. (2004) utilizaram o laser e a PDT na cicatrização de feridas cutâneas no dorso de ratos, provocadas por um *punch*. No grupo 1 (controle), as feridas foram executadas com o *punch* a frio; no grupo 2 (controle positivo), com o instrumento aquecido; no grupo 3 (LILT), da mesma maneira que a do grupo 2 e, a seguir, tratadas com laser diodo de AsGaAl (685nm, 50mW, 4,5J/cm²); e no grupo 4, as feridas foram executadas igualmente às dos grupos 2 e 3, seguidas de tratamento com azul de toluidina O (100µg/ml) e laser diodo de AsGaAl (685nm, 50mW, 4,5J/cm²). Os resultados evidenciaram um retardo na cicatrização no grupo 2, enquanto que nos grupos tratados com laser (3 e 4) o processo de cicatrização

mostrou-se diferenciado. Os autores concluíram que o laser e a PDT atuam como agente bioestimulador coadjuvante, balanceando os efeitos indesejáveis provocados pela queimadura.

Os autores (Luan et al., 2008) testaram o azul de toluidina (TB) quanto aos efeitos deletérios sobre os tecidos periodontais em ratos. Vinte e quatro ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: no primeiro (experimental), foi realizada a terapia fotodinâmica com 1mg/ml TB e irradiação com laser ($60\text{J}/\text{cm}^2$, 635nm, 337s); no segundo, irradiação do laser a $140\text{J}/\text{cm}^2$; o terceiro recebeu 2,5mg/ml de TB; e o quarto não teve tratamento (controle). Todos os animais foram sacrificados após 72 horas, e amostras de tecido periodontal foram submetidas ao exame histológico. Nenhuma alteração inflamatória ou necrose foram encontradas na gengiva, dentina, polpa dentária ou osso alveolar dos ratos em qualquer um dos grupos nesse estudo. Os resultados sugerem que a PDT, associada ao TB, é segura para o tratamento antimicrobiano sem efeitos prejudiciais para os tecidos adjacentes normais.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre a microbiota do sulco periimplantar de implantes não submersos, durante o período de osseointegração, a fim de reduzi-la e, assim, favorecer o sucesso da reabilitação oral por implantes osseointegrados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos da Pesquisa

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A), deu-se início a seleção dos sujeitos de pesquisa junto ao departamento de prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), por meio de uma anamnese (Apêndice A) com foco nas seguintes características: históricos dental e médico; saúde sistêmica e bucal; e uso de medicação regular ou durante a pesquisa.

Todos os pacientes selecionados foram informados sobre a terapia à qual seriam submetidos e assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice B).

Os critérios de inclusão e exclusão estão discriminados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos de pesquisa para o estudo

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Independente do gênero	Pacientes com histórico de doença periodontal prévia
Independente de Idade	Pacientes que fazem uso de medicação regular
Pacientes com índice de placa baixo (menor que 10% Índice O’Leary)	Pacientes com osteoporose
	Pacientes com gengivite ou periodontite
Presença de pelo menos 2mm de mucosa queratinizada.	Pacientes com dificuldade de executar higienização oral
	Pacientes que tomaram antibiótico nos últimos seis meses
Necessidade de instalação de 2 implantes no arco superior em espaços intercalares	Pacientes imunodeprimidos
	Pacientes diabéticos
	Pacientes fumantes
	Presença de hábitos parafuncionais

Participaram da pesquisa 14 pacientes (Tabela 4.2), sete homens e sete mulheres, com idade média de 45,5 anos. Todos foram submetidos à cirurgia para instalação de dois implantes de um estágio cirúrgico na FOUSP. O método utilizado foi o estudo de boca dividida, cuja área de tratamento foi escolhida randomicamente,

pelo site www.randomization.com (Apêndice C), em dois grupos: um grupo controle (GC) e um grupo submetido à terapia fotodinâmica (GPDT), conforme Tabela 4.3.

Tabela 4.2 - Sujeitos de pesquisa

Paciente	Sexo	Idade	Região das cirurgias	Implantes Instalados (diâmetro do implante x comprimento x diâmetro da plataforma em mm)
1	F	48	16 e 26	4,1x10x4,8 e 4,1x10x4,8
2	M	39	14 e 24	3,3x8x4,8 e 3,3x10x4,8
3	F	41	14 e 26	3,3x10x4,8 e 4,1x8x4,8
4	F	37	14 e 25	4,1x10x4,8 e 4,1x10x4,8
5	M	54	14 e 17	4,1x10x4,8 e 4,1x12x4,8
6	M	54	16 e 26	3,3x10x4,8 e 4,1x10x4,8
7	F	45	14 e 25	3,3x12x3,5 e 3,3x12x3,5
8	M	45	14 e 25	4,1x8x4,8 e 4,1x10x4,8
9	F	58	15 e 25	4,1x10x4,8 e 4,1x10x4,8
10	F	47	14 e 26	3,3x10x4,8 e 4,1x8x4,8
11	M	39	16 e 13	4,1x10x4,8 e 3,3x10x4,8
12	M	45	16 e 26	4,1x8x4,8 e 4,1x10x4,8
13	M	41	14 e 25	3,3x10x4,8 e 4,1x10x4,8
14	F	44	16 e 26	3,3x12x3,5 e 3,3x12x3,5

Tabela 4.3 - Grupos de pesquisa

Grupos de estudo	Procedimento
GC (n=14 implantes)	Uso de antibiótico pré e pós-cirurgia de instalação de implante, bochecho com clorexidine 0,12% no pós-cirúrgico (2x ao dia por 3 semana) e simulação da PDT
GPDT (n=14 implantes)	Uso de antibiótico pré e pós-cirurgia de instalação de implante, bochecho com clorexidine 0,12% no pós-cirúrgico (2x ao dia por 3 semana) e aplicação da PDT

Antes da cirurgia, todos os pacientes receberam tratamento profilático (orientação de higiene bucal e limpeza mecânica dos dentes) (Cortellini et al., 1994; Cortellini et al., 1996).

4.2 Instalações dos Implantes

Para seleção dos diâmetros e tamanhos dos implantes, todos os pacientes passaram por exame clínico, confecção de modelos de estudo montados em articulador e tomografia linear.

Foi administrado amoxicilina 500mg, de oito em oito horas, por sete dias, medicação iniciada um dia antes da cirurgia, e paracetamol 750mg, de oito em oito horas, durante cinco dias, iniciada depois da cirurgia. Todas as cirurgias de instalação dos implantes foram realizadas pelo mesmo cirurgião, sob anestesia local com cloridrato de bupivacaína 0,5% com adrenalina 1:200.000 (sal anestésico do grupo amida com vaso constritor). Uma assepsia extra-oral foi feita com uma solução de Clorexidine a 2.0% e intraoral de 0.12% como bochecho. Posteriormente, realizou-se uma incisão horizontal supracristal em envelope e descolamento do periósteo para expor o tecido ósseo.

Com o uso de um contra-ângulo para implantes 20:1, acoplado ao motor elétrico com rotação, irrigação e torque controlados digitalmente, iniciaram-se as perfurações com brocas helicoidais do kit cirúrgico (Straumann® Dental Implant System), de acordo com o protocolo do fabricante, sob abundante irrigação de solução estéril salina. Em seguida, o implante (Standard Plus da Straumann® Dental Implant System) foi instalado a uma distância de, pelo menos, 1,5mm de osso ao redor do implante e 1,5mm das raízes dos dentes vizinhos, com a linha rugosa/lisa do implante colocada ao nível da crista óssea (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Seqüência de instalação dos implantes. Observar o cuidado de inserir o implante até a linha rugosa/lisa colocada ao nível da crista óssea

Os tecidos foram reposicionados e suturados (Ethicon Divisão de Johnson & Johnson Seda-Silk 4.0 Seda preta trançada não absorvível) de modo que o parafuso de cobertura ficasse completamente exposto. A remoção das suturas foi feita depois de uma semana.

4.3 Terapia Fotodinâmica (PDT)

Com laser de baixa potência Twin Flex (MM Optics®, São Carlos, Brasil) (Figura 4.2) com área do spot de $0,04\text{cm}^2$ e comprimento de onda de 660nm , foram realizadas aplicações pontuais através de irradiação contínua de $120\text{J}/\text{cm}^2$ de densidade de energia, dividida em quatro pontos de $30\text{J}/\text{cm}^2$ por implante (dois na vestibular e dois na palatina), 30 segundos por ponto, numa potência de 40mW (Campos, Simoes et al. 2008), associado à solução de azul de metileno a $0,005\%$ (Chimiolux, Hypofarma, Ribeirão das Neves, Brasil) (Figura 4.3). Durante as

aplicações, tanto os profissionais, quanto os pacientes usaram óculos de proteção específicos (Figura 4.4).

Figura 4.2 - A- Aparelho de laser de baixa potência Twin Flex (MM Optics®, São Carlos, Brasil);
B- Destaque do protocolo utilizado

Figura 4.3 - Corante Chimiolux, solução de azul de metileno a 0,005%

Figura 4.4 - Óculos de proteção

No GPDT, foram realizadas aplicações da terapia fotodinâmica no dia da instalação do implante, logo após a primeira coleta microbiológica e, novamente, em 15, 30 e 45 dias.

Sob isolamento relativo, o sulco periimplantar foi irrigado com 1ml de solução de azul de metileno a 0,005% (Figura 4.5). Devido à remoção promovida pelo fluido sulcular, transcorridos dois minutos, uma nova aplicação de corante foi feita para

aumentar sua eficiência, por mais três minutos; totalizando cinco minutos para sua melhor absorção pelos microrganismos. Posicionou-se, então, o spot do laser, de diâmetro de 6mm e área de 0,04cm², em contato com a região mesio vestibular, onde o laser foi aplicado por 30 segundos. Passando o spot para região disto vestibular, o laser foi aplicado por mais 30 segundos. O procedimento foi repetido na região palatina, seguindo o mesmo protocolo da região vestibular (Figura 4.6 e 4.7). No GC, foram simuladas todas as etapas realizadas no GPDT, com intuito de promover um resultado placebo ao paciente, de forma que não foram aplicados nem o corante, nem o laser.

Figura 4.5 - Aplicação do corante no sulco periimplantar. A- pós-cirúrgico imediato e B- na 6ª semana de pós-operatório

Figura 4.6 - Aplicação do laser. A- Aplicação na região disto vestibular; B- Aplicação na região mesio vestibular; C- Aplicação na região disto palatina; D- Aplicação na região mesio palatina

Figura 4.7 - Vista vestibular dos pontos de aplicação do laser. Os mesmos dois pontos foram realizados por palatino.

4.4 Análise microbiológica

Após período de 30 minutos pós-cirúrgico, na clínica da FOUSP, foi feita uma coleta do sulco periimplantar dos dois grupos, em isolamento relativo, pela inserção de quatro cones de papel estéril (Cone de papel Cellpack 35, Dentsplay Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, Brasil), um por vestibular; um por lingual; um por mesial; e um por distal, por 20 segundos (Figura 4.8). Assim que removidos, os cones foram imediatamente transferidos para frascos, contendo 2mL de meio de transporte VMGA III (Viability Medium Goteborg Anaerobically), com pérolas de vidro de 5mm de diâmetro, para facilitar a mistura e homogeneização da amostra antes do cultivo (ANEXO B). Cada um dos tubos foi identificado com número do paciente, lado da coleta e momento da coleta (Figura 4.9).

Figura 4.8 - Coleta microbiológica. A- Coleta no pós-cirúrgico imediato; B- Coleta na 6ª semana de pós-cirúrgico

Figura 4.9 - Tubos de VMGA III identificado com etiqueta adesiva, com número do paciente, lado e momento da coleta, respectivamente

Uma nova coleta, com os mesmos procedimentos, foi realizada no GPDT, após aplicação da terapia.

Passadas seis semanas, período de osseointegração, repetiu-se o processo de coleta microbiológica seguindo os mesmos passos descritos acima, mas com o cuidado adicional de remover a placa supragengival com bolas de algodão estéreis (Mombelli, van Oosten et al. 1987), antes da inserção dos cones de papel estéril (Figura 4.8).

Todas as amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em um período máximo de seis horas a partir da coleta.

Os frascos de VMGA III, com os cones de papel, foram incubados a 37°C, por 30 minutos a fim de liquefazer a gelatina, e depois homogeneizadas em agitador de tubos por 30 segundos (Fisher Vortex Genie 2, Fisher Scientific, USA) (Figura 4.10).

Figura 4.10 - Homogeneização do VMGA III, em agitador de tubos por 30 segundos

Alíquotas de 100 ml de cada amostra foram diluídas a 1/100, 1/1.000, 1/10.000 e 1/100.000, em água peptonada (Anexo C) e, posteriormente, semeadas 250 µL de volumes das amostras sem diluição e de cada uma das diluições citadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio ágar Brucella, acrescido de 5% de sangue desfibrilado de carneiro, hemina e menadione (Anexo D).

Na sequência, as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose (Anaerobar, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, England) com gerador (AnaeroGemtm, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, England) e indicador de anaerobiose (Anaerobic Indicator, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, England), durante sete dias.

Após essa etapa, as placas foram analisadas em microscópio estereoscópico (Bausch & Lomb) para contagem das unidades formadoras de colônias totais (UFCt) e pigmentadas de preto (UFCp) (Figura 4.11). Todos os procedimentos realizados no laboratório de microbiologia ocorreram sob a supervisão da Profa. Dra. Silvana Cai.

Figura 4.11 - Método de contagem das UFC. A- Microscópio estereoscópico; B- Unidades formadoras de colônias totais (UFCt) e pigmentadas de preto (UFCp); C- UFC sem presença de UFCp; D- UFC vista em C após diluição facilitando a contagem

5 RESULTADOS

Foram contadas as UFC das três amostras de cada diluição e obtida a média aritmética para cada grupo. A partir dessas médias foi gerada a Tabela 5.1 que, por sua vez, serviu de base para os gráficos de bloxpot (Anexo E).

Antes da comparação intra e entre os grupos, os dados foram testados quanto à sua distribuição, com o teste de Kolmogorov-Smirnov que mostrou uma distribuição anormal, indicando a utilização de testes não paramétricos.

O teste de Wilcoxon, usado para comparar dois tratamentos quando os dados são obtidos por meio do esquema de pareamento, foi utilizado para análise dos dados intra grupos, ao longo do tempo e da avaliação da eficiência da PDT.

Para a comparação entre os grupos, o teste escolhido foi o de Mann–Whitney, para comparar dois grupos independentes.

Todas as análises foram realizadas com o *software* estatístico Minitab, versão 15.0. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p=0,05$).

Tabela 5.1 Quantidade de bactérias por mL, por grupo, momento da coleta, para UFCt e UFCp. N= número de amostras analisadas, Pig= pigmentadas de preto

Grupo	Momento da coleta	UFC		N	média	mínimo	mediana	máximo
GC	Pós-cirúrgico imediato	Total		14	4254,74	93,3	2265,0	14700
		Pig		10	53,32	0,0	20,0	173
	6ª semana	Total		14	265357,00	25300,0	179000,0	481000
		Pig		10	17513,00	0	1330,0	68000
GPDT	Pós-cirúrgico imediato	Total	pré- PDT	14	12358,40	293,0	3400,0	38700
			pós-PDT	14	2259,48	40	266,5	9470
		Pig	pré- PDT	10	675,62	0,0	46,6	400
			pós-PDT	10	29,30	0,0	0,0	133
	6ª semana	Total	pré- PDT	14	278621,00	28000,0	224500,0	719000
			pós-PDT	14	84173,60	6530,0	55950,0	275000
		Pig	pré- PDT	10	6946,30	0,0	66,5	5330
			pós-PDT	10	1493,00	0,0	0,0	4270

5.1 Análise da eficiência da PDT no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana

O gráfico 5.1 mostra a quantidade de UFCt dos GC e GPDT (antes e após a terapia), no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana.

Gráfico 5.1 - Gráfico de bloxpot da quantidade de UFCt/ml, dos GC e GPDT (antes e após a terapia). A= pós-cirúrgico imediato; B= 6ª semana

A terapia fotodinâmica promoveu uma redução estatisticamente significativa para os dois momentos aplicados, com nível de significância (p) igual a 0,001 e 0,003, respectivamente.

A quantidade de UFCp nos GC e GPDT (antes e após a terapia) no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana, é demonstrada no gráfico 5.2.

Gráfico 5.2 - Gráfico de bloxpot da quantidade de UFCp/ml, dos GC e GPDT (antes e após a terapia).
A= pós-cirúrgico imediato; B= 6ª semana

Houve uma redução estatisticamente significativa para os dois momentos aplicados, com $p=0,036$ para ambas situações.

Para melhor visualização da ação da PDT no pós-cirúrgico imediato, foram gerados outros dois gráficos (Gráficos 5.3 e 5.4) sem os bloxpot da 6ª semana.

Gráfico 5.3 - Gráfico de bloxpot da quantidade de UFCt/ml dos GC e GPDT, antes e após a aplicação da PDT, no pós-cirúrgico imediato

Gráfico 5.4 - Gráfico de bloxpot da quantidade de UFCp/ml, antes e após a aplicação da PDT, no pós-cirúrgico imediato

De forma percentual, o gráfico 5.5 apresenta a eficiência da PDT sobre as UFCt e UFCp no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana.

Gráfico 5.5 - Gráfico de bloxpot da redução percentual das UFCt/ml e UFCp/ml pela PDT, no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana

Tendo como referência a mediana, a redução foi aproximadamente de 80% e 50% para as UFCt no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana, respectivamente. Para as UFCp, os valores foram de 100% e 90%.

5.2 Análise do crescimento bacteriano do pós-cirúrgico imediato para 6ª semana, dos GC e GPDT, e comparação entre eles

O gráfico 5.6 mostra o aumento do número de UFCt do pós-cirúrgico imediato para 6ª semana dos GC e GPDT. As UFCp é representada pelo gráfico 5.7.

Gráfico 5.6 - Gráfico da quantidade de UFCt/ml no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana, para os dois grupos (GC e GPDT)

Gráfico 5.7 - Gráfico da quantidade de UFCp/ml no pós-cirúrgico imediato e na 6ª semana, para os dois grupos (GC e GPDT). O GPDT apresenta as médias antes e após a PDT

Houve aumento, estatisticamente significativo, da quantidade de UFCt e UFCp do pós-cirúrgico imediato para 6ª semana em ambos os grupos.

A diferença do número de UFCt do pós-cirúrgico imediato para 6ª semana, no comparativo entre grupos, foi estatisticamente semelhante, com $p=0,7652$.

Apesar do aumento do número de UFCp ser maior no GC em relação ao GPDT, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,2730$).

6 DISCUSSÃO

Para a seleção dos sujeitos de pesquisa, os critérios de inclusão e exclusão foram rigidamente seguidos, uma vez que cigarro, saúde geral sistêmica debilitada, o uso de medicação regular e a presença acentuada de microrganismos periodontopatogenicos são fatores que ainda apresentam controvérsias na literatura quanto a sua influência na doença periodontal (Rutar et al., 2001).

A exclusão de pacientes que não apresentavam mucosa queratinizada ao redor dos implantes foi instituída, devido ao seu menor teor de fibras de colágeno e da presença de fibras elásticas que favorecem a perda de adesão e maior recessão gengival do que a queratinizada, em situação de acúmulo similar de placa bacteriana (Warrer et al., 1995; Weber; Cochran, 2002). Portanto, a presença de mucosa queratinizada fornece um selamento tecidual frente ao desafio bacteriano.

Para o controle bacteriano pós-operatório, um dos métodos atualmente utilizados é o uso de solução de gluconato de clorexidina a 0,12%. Trata-se de uma solução anti-séptica com ação bactericida e bacteriostática que combate principalmente bactérias Gram-positivas, sendo pouco eficaz contra Gram-negativas (Thomas et al., 2000; Hayek et al., 2005) e contra o biofilme oral (Vitkov et al., 2005). Seu uso contínuo ou em concentrações mais elevadas pode promover aumento da resistência bacteriana (Thomas et al., 2000), uma preocupação constante com o uso regular de agentes antimicrobianos locais, além dos efeitos colaterais locais, como perda de paladar e manchamento dos dentes (Etemadzadeh et al., 1989; Collaert et al., 1992; Joyston-Bechal; Hernaman, 1993; Mendieta et al., 1994; Addy et al., 1995).

Estudos *in vitro* e em animais têm demonstrado o efeito tóxico da clorexidina impedindo o crescimento de fibroblastos sobre a superfície radicular (Alleyn et al., 1991), alterando acentuadamente a viabilidade, o crescimento e a síntese protéica das células do tecido gengival e do ligamento peridontal (Pucher; Daniel, 1992); e quando em contato direto com o tecido ósseo leva a uma necrose superficial, o que retarda a reparação da ferida (Bassetti; Kallenberger, 1980).

Atualmente, buscam-se meios de descontaminação alternativos e a PDT desponta como uma das terapias de grande destaque na literatura com resultados animadores (Dobson; Wilson, 1992; Wilson, 1994; Usacheva et al., 2001; Dortbudak

et al., 2001; Yilmaz et al., 2002; Shibli et al., 2003; Chan; Lai, 2003; Pfitzner et al., 2004; Gad et al., 2004; Hayek et al., 2005; Marotti et al., 2009; Sigusch et al., 2005; Shibli et al., 2006; Andersen et al., 2007; Braun et al., 2008). Porém, ainda não existe um consenso sobre os parâmetros utilizados, seja para o laser, como para o corante.

Nessa pesquisa, o protocolo proposto mostrou uma ótima ação para a redução bacteriana, tanto no pós-cirúrgico imediato quanto na 6ª semana, ao agir sobre as UFCt e UFCp.

A análise percentual mostra uma maior atuação da PDT sobre as UFCt no pós-cirúrgico imediato quando comparado com a 6ª semana. Provavelmente, isso se deve ao menor número de bactérias presentes na primeira aplicação, que favorece a ação do fotossensibilizador sobre os microorganismos, melhorando a eficiência da terapia. Outra possibilidade seria a presença de um biofilme mais estabelecido e organizado na 6ª semana, dificultando a penetração do corante. É possível que um tempo maior de contato do corante permitisse que mais bactérias fossem atingidas, principalmente as Gram-negativas, que são mais resistentes à passagem do corante graças à membrana externa.

Sobre o pós-cirúrgico imediato, muitos autores relatam que a presença de sangue e fluidos gengivais prejudica a atuação da PDT por oferecer “proteção” às bactérias contra a terapia (Komerik; Wilson, 2002; Matevski et al., 2003). Todavia, nesse estudo, a abundância de sangue no pós-cirúrgico imediato não impediu a descontaminação, que apresentou redução de aproximadamente 80 e 100%, para as UFCt e UFCp, respectivamente. Dessa forma, mais estudos se fazem necessários para averiguar a atuação da PDT sobre uma maior quantidade e/ou melhor organização das bactérias sob as mesmas condições.

Quanto às UFCp, essas apresentaram pequena diferença na eficiência da PDT nos dois momentos (pós-cirúrgico e 6ª semana), com medianas de aproximadamente 100% e 90%, respectivamente. A mesma proporção na redução foi encontrada por outros autores em estudos *in vitro* e *in vivo* (Dortbudak et al., 2001; Komerik et al., 2003; Chan; Lai, 2003; Yamada Jr, 2007). Isto ocorre pelo fato de as bactérias pigmentadas (ex: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, e *Actinomyces odontolyticus*) possuírem cromóforos endógenos, que dispensam a utilização de um agente fotossensibilizador adicional para que a PDT ocorra. Portanto, a simples irradiação com laser de

emissão vermelha destrói esses microorganismos (Konig et al., 2000; Nussbaum et al., 2002; Chan; Lai, 2003).

Já o aumento das bactérias do pós-cirúrgico imediato para a 6ª semana ocorre por conta da exposição dos implantes à cavidade oral, formando inicialmente uma película adquirida, a partir de biopolímeros salivares que recobrem sua superfície (Hannig, 1997). Essa película forma a interface entre a superfície do implante e os microorganismos iniciais, por exemplo, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*. Estes microrganismos criam as pré-condições para a adesão de periodontopatógenos como *Hamophilus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* ou *Tannerella forsythensis*, que podem induzir à periimplantite, com inflamação e destruição óssea (Quirynen et al., 2002). Supõe-se que gengiva em torno dos implantes têm o potencial natural para prevenir a formação de biofilme subgengival e para responder ao acúmulo de biofilme inicial (Apse et al., 1989; Berglundh et al., 1992; Bollen et al., 1997; Rasperini et al., 1998).

Mecanismos protetores dessa barreira incluem componentes estruturais, como por exemplo, um epitélio queratinizado oral bem encerrado na crista da margem gengival, onde é contínuo com o epitélio sulcular não-queratinizado e fibras colágenas circulares (Berglundh et al., 1991).

Isso pode ser um dos fatores para a ausência de bactérias periodontopatogênicas nas amostras dos fluidos periimplantares do estudo de Heuer et al. (2007), que analisaram a formação do biofilme bacteriano sobre pilares protéticos com os tecidos periimplantares devidamente cicatrizados, assim como no estudo de Botero et al. (2005), no qual pesquisaram a microbiota subgengival ao redor de implantes saudáveis, com pelo menos um ano de função.

Diferentemente do encontrado no presente estudo, a coleta microbiológica constatou a presença de bactérias periodontopatogênicas, tanto no pós-cirúrgico imediato quanto na 6ª semana. Resultado corroborado pelos trabalhos de Quirynen et al. (2005); Quirynen et al. (2006); Furst et al. (2007) e Barboza et al. (2002), nos quais as coletas microbiológicas foram realizadas durante o processo de cicatrização tecidual. Isso sugere que a presença do coágulo sanguíneo e posteriormente a barreira tecidual periimplantar imatura não são suficientes para promover uma eficiente proteção contra a colonização de bactérias periodontopatogênicas. Berglundh et al. (2007), em um estudo com cães, mostraram

que essa barreira epitelial leva em torno de 6 a 8 semanas para estar devidamente formada, período maior que a osseointegração dos implantes. Por tanto a osseointegração acontece sem que a devida proteção esteja instalada.

Os resultados do nosso estudo mostraram que ocorre um aumento, estatisticamente significativo, do número de UFCt e UFCp nos dois grupos (GC e GPDT) do pós-cirúrgico imediato para a 6ª semana, mostrando que existe uma contaminação crescente do sulco periimplantar durante o processo de cicatrização, independentemente da eficiência da PDT como relatado acima. A contaminação crescente no sulco periimplantar também foi observada nos trabalhos de Quirynen et al. (2005); Quirynen et al. (2006) e Furst et al. (2007).

Outros pontos de extrema importância, relacionados à PDT, se deve ao fato de ser um procedimento seguro para o paciente, por atuar sobre as bactérias sem prejudicar ou reduzir a viabilidade celular do hospedeiro (Soukos et al., 1996; Komerik et al., 2002; Komerik et al., 2003; Luan et al., 2008); e a luz não absorvida pelas bactérias pode ser espalhada e absorvida por cromóforos do tecido periimplantar adjacente, promovendo efeito analgésico; modulação da inflamação, diminuindo os sinais inflamatórios e do sangramento a sondagem; aceleração do processo de reparação do tecido gengival e ósseo; e aumenta a vascularização (Espinosa, 1999; Lopes, 2000; Silva Neto, 2004; Lima et al., 2004; Sigusch et al., 2005; Berglundh et al., 1994; Shibli et al., 2006; Almeida et al., 2007; Oliveira et al. 2007; Andersen et al., 2007).

Portanto, faz-se necessário que pesquisas futuras busquem avaliar estas condições clinicamente, analisando a ação da PDT sobre os tecidos periimplantares, tanto os tecidos moles (gengiva e periósteo) quanto os tecidos duros (osso), em busca de melhores resultados e protocolos para reabilitação oral e manutenção da saúde.

7 CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica é eficiente para redução das UFCt e UFCp, presentes no sulco periimplantar, durante a osseointegração. No entanto, essa terapia não impede a recolonização, nem o crescimento bacteriano ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS¹

Abrahamsson I, Berglundh T, Moon IS, Lindhe J. Peri-implant tissues at submerged and non-submerged titanium implants. *J Clin Periodontol*. 1999 Sep;26(9):600-7.

Addy M, Moran J, Newcombe R, Warren P. The comparative tea staining potential of phenolic, chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses. *J Clin Periodontol*. 1995 Dec;22(12):923-8.

Alleyn CD, O'Neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, Van Dyke TE, McPherson JC. The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1991 Jul;62(7):434-8. 134.

Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med*. 1993;13(1):72-82.

Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent*. 2007;18(2):34-8.

Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res*. 1989 Mar;24(2):96-105.

Barboza EP, Caula AL, Carvalho WR. Crestal bone loss around submerged and exposed unloaded dental implants: a radiographic and microbiological descriptive study. *Implant Dent*. 2002;11(2):162-9.

Bassetti C, Kallenberger A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J Clin Periodontol*. 1980 Dec;7(6):443-56.

Berglundh T, Abrahamsson I, Welander M, Lang NP, Lindhe J. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Feb;18(1):1-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991 Apr-Jun;2(2):81-90.

Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Mar;3(1):1-8.

Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol.* 1994 Mar;21(3):189-93.

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol.* 1997 Jun;65(6):1026-31.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997 Jul;13(4):258-69.

Botero JE, Gonzalez AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol.* 2005 Sep;76(9):1490-5.

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct;35(10):877-84.

Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *J Photochem Photobiol B.* 1996 Jul;34(2-3):117-21.

Brugnera Jr A, Villa RG, Genovese WJ. *Laser na odontologia São Paulo: Pancast.* 1991;61 p.

Campos L, Simoes A, Nogueira Sa PH, De Paula Eduardo C. Improvement in Quality of Life of An Oncological Patient by Laser Phototherapy: A Case Report. *Photomed Laser Surg.* 2008 Sep 18.

Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003;18(1):51-5.

Cochran DL, Buser D, ten Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard JP, et al. The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Apr;13(2):144-53.

Collaert B, Edwardsson S, Attstrom R, Hase JC, Astrom M, Mover R. Rinsing with delmopinol 0.2% and chlorhexidine 0.2%: short-term effect on salivary microbiology, plaque, and gingivitis. *J Periodontol.* 1992 Jul;63(7):618-25.

Cortellini P, Paolo G, Prato P, Tonetti MS. Long-term stability of clinical attachment following guided tissue regeneration and conventional therapy. *J Clin Periodontol.* 1996 Feb;23(2):106-11.

Cortellini P, Pini-Prato G, Tonetti M. Periodontal regeneration of human infrabony defects (V). Effect of oral hygiene on long-term stability. *J Clin Periodontol.* 1994 Oct;21(9):606-10.

Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent.* 2006 Sep;15(3):298-304.

Cury PR, Sendyk WR, Sallum AW. Etiologia da falha de implantes osseointegrados. . *Rev bras odontol.* 2003 maio-jun.;60(3):192-5.

de Almeida JM, Garcia VG, Theodoro LH. Terapia fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. *Arq odontol.* 2006 jul.-set.;42(3):199-210.

de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):566-75.

De Boever AL, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Feb;17(1):8-17.

de Leita JA, De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ, Sendyk WR. Analysis of the presence of pathogens which predict the risk of disease at peri-implant sites through polymerase chain reaction (PCR). *Braz Oral Res.* 2005 Jan-Mar;19(1):52-7.

De Lorenzo JL, Simionato MRL, De Lorenzo A. Infecção: principal causa de insucessos em implantes dentários. Rev ABO nac. 1997 out.-nov.;5(5):321-4.

de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. J Periodontol. 2007 Jun;78(6):965-73.

Deda DK, Uchoa AF, Carita E, Baptista MS, Toma HE, Araki K. A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment. Int J Pharm. 2009 Jul 6;376(1-2):76-83.

Devides SL, Franco AT. Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006 Mar-Apr;21(2):262-9.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Arch Oral Biol. 1992 Nov;37(11):883-7.

Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. Clin Oral Implants Res. 2001 Apr;12(2):104-8.

Dortbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. Clin Oral Implants Res. 2002 Jun;13(3):288-92.

Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. J Clin Periodontol. 1995 Mar;22(3):255-61.

Espinosa CR. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com laser ou com solução fotossensibilizadora associada ao laser de bioestimulação: estudo histológico em ratos Dissertação - Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília. 1999:98p.

Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999 Jul-Aug;14(4):473-90.

Esposito M, Thomsen P, Ericson LE, Lekholm U. Histopathologic observations on early oral implant failures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Nov-Dec;14(6):798-810.

Etemadzadeh H, Meurman JH, Murtomaa H, Torkko H, Lappi L, Roos M. Effect on plaque growth and salivary micro-organisms of amine fluoride-stannous fluoride and chlorhexidine-containing mouthrinses. *J Clin Periodontol*. 1989 Mar;16(3):175-8.

Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1991 Oct;11(1):87-91.

Furst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug;18(4):501-8.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jun;48(6):2173-8.

Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*. 1998;22(4):212-8.

Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser : atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence. 2004;320 p.

Haas R, Dortbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Aug;8(4):249-54.

Hannig M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci*. 1997 Oct;105(5 Pt 1):422-33.

Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med*. 2006 Jan;38(1):74-83.

Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol*. 2005 Aug;76(8):1275-81.

Hermann JS, Cochran DL, Nummikoski PV, Buser D. Crestal bone changes around titanium implants. A radiographic evaluation of unloaded nonsubmerged and submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol*. 1997 Nov;68(11):1117-30.

Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M, et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil*. 2007 May;34(5):377-82.

Jakse N, Payer M, Tangl S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug;18(4):517-24.

Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006;25(1-2):505-19.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):468-81.

Joyston-Bechal S, Hernaman N. The effect of a mouthrinse containing chlorhexidine and fluoride on plaque and gingival bleeding. *J Clin Periodontol*. 1993 Jan;20(1):49-53.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989;56(5):691-704.

Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscope and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Apr;16(2):168-75.

Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, et al. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med*. 2007 Jun;39(5):441-50.

Komerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci.* 2002;17(2):86-92.

Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Mar;47(3):932-40.

Komerik N, Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol.* 2002;92(4):618-23.

Konig K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000 Nov;46(7):1297-303.

Labbe RF, Skogerboe KJ, Davis HA, Rettmer RL. Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers Surg Med.* 1990;10(2):201-7.

Lang NP, Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Histologic probe penetration in healthy and inflamed peri-implant tissues. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Dec;5(4):191-201. Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999 Oct;10(5):339-45.

Lima MA, Theodoro LH, Okamoto T, Milanezi LA, Garcia VG. A histologic assessment of the low level therapy associated with photosensitizing drug on impaired wound healing in rats. *Brazilian Dental Journal* 2004;15(113).

Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Da Silva NS, Salgado MA. Infrared laser photobiomodulation (lambda 830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):96-101.

Lopes JR. Reparação de feridas de extração dental, infectadas, tratadas com droga fotossensibilizadora associada ou não ao laser de baixa intensidade. Dissertação - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Câmpus de Araçatuba. 2000:98p.

Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG, Lin J, et al. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci.* 2008 Feb 1

Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M, Cohen N, Breitbart H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers Surg Med.* 1997;21(5):493-9.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007 Jun;22(2):83-91.

Marotti J, Aranha ACC, Eduardo CP. A utilização do laser no tratamento do herpes labial. *RPG.* 2007;14(4):314-20.

Marotti J, Pigozzo MN, Nakamae AEM, Tortamano Neto P, Laganá DC, de Campos TN. Terapia fotodinâmica no tratamento da periimplantite. *Revista Implant News.* 2008;5(4):401-5.

Marotti J, Tortamano-Neto P, Cai S, Ribeiro MS, Franco JEM, Campos TN. Descontaminação da superfície de implantes dentários por meio da terapia fotodinâmica. In: 26a Reunião Anual da SBPqO, 2009, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research (Proceedings of the 26th SBPqO Annual Meeting). São Paulo : SDO, 2009.v.23.p.179-179.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004;34(3):260-5.

Martin JP, Logsdon N. The role of oxygen radicals in dye-mediated photodynamic effects in *Escherichia coli* B. *J Biol Chem.* 1987 May 25;262(15):7213-9.

Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):428-35.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005 May 13;79(2):159-70.

Mendieta C, Vallcorba N, Binney A, Addy M. Comparison of 2 chlorhexidine mouthwashes on plaque regrowth in vivo and dietary staining in vitro. *J Clin Periodontol.* 1994 Apr;21(4):296-300.

Meneguzzo D. Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana. [Dissertação de Mestrado]. 2007;São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP.

Mester E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. Orv Hetilap. 1966;107:1012. apud Almeida-Lopes, L. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. Dissertação, Universidade Vale do Paraíba, São Paulo, 1999

Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Correa TC, Toma IN, et al. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. IUBMB Life. 2007 Apr-May;59(4-5):322-31.

Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Jr., Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. Oral Microbiol Immunol. 1987 Dec;2(4):145-51.

Moon IS, Berglundh T, Abrahamsson I, Linder E, Lindhe J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. J Clin Periodontol. 1999 Oct;26(10):658-63.

Novaes AB, Jr., Papalexiou V, Muglia V, Taba M, Jr. Influence of interimplant distance on gingival papilla formation and bone resorption: clinical-radiographic study in dogs. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006 Jan-Feb;21(1):45-51.

Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. Acta Biochim Pol. 2005;52(2):339-52.

Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. J Clin Laser Med Surg. 2002 Dec;20(6):325-33.

O'Mahony A, MacNeill SR, Cobb CM. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. Quintessence Int. 2000 Apr;31(4):249-56.

Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. J Photochem Photobiol B. 1997 May;39(1):1-18.

Olson JE, Schimmerling W, Tobias CA. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res.* 1981 Jan 12;204(2):436-40.

Pavani C, Uchoa AF, Oliveira CS, Iamamoto Y, Baptista MS. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci.* 2009 Feb;8(2):233-40.

Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004 Oct;75(10):1343-9.

Prates RA, Yamada AM, Jr., Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jan 3;86(1):70-6.

Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1992 Jun;63(6):526-32.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Feb;13(1):1-19.

Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res.* 2005 Apr;84(4):340-4.

Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Feb;17(1):25-37.

Raab O. On the effect of fluorescent substances on infusoria. *Z Biol.* 1900;39:524-6.

Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli P, Simion M. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clin Oral Implants Res.* 1998 Dec;9(6):357-64.

Rebollal J, Vidigal Jr GM, Cardoso ES. Fatores locais que determinam o fenótipo gengival ao redor de implantes dentários: revisão da literatura. *ImplantNews* 2006;3(2):155-60.

Renvert S, Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Aug;18(4):509-16.

Rutar A, Lang NP, Buser D, Burgin W, Mombelli A. Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Jun;12(3):189-95.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000 Sep;48(5):312-26.

Shibli JA, Martins MC, Nociti FH, Jr., Garcia VG, Marcantonio E, Jr. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol.* 2003 Mar;74(3):338-45.

Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH, Jr., Marcantonio E, Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun;17(3):273-81.

Shibli JA, Vitussi TR, Garcia RV, Zenobio EG, Ota-Tsuzuki C, Cassoni A, et al. Implant surface analysis and microbiologic evaluation of failed implants retrieved from smokers. *J Oral Implantol.* 2007;33(4):232-8.

Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol.* 2005 Jul;76(7):1100-5.

Silva Neto UT. Efeito da terapia fotodinâmica no processo de reparação de feridas cutâneas provocadas em ratos diabéticos: estudo morfométrico e histológico. Dissertação - Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília. 2004:115p.

Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996;18(3):253-9.

Tedesco AC. Processos Fotodinâmicos: "A Luz" de uma nova terapia aplicada à saúde humana. *Jornal Brasileiro de Laser.* 2007 Out;1(4):32-41.

Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb;93(2):155-60.

Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *J Hosp Infect.* 2000 Dec;46(4):297-303.

Tolstunov L. Dental implant success-failure analysis: a concept of implant vulnerability. *Implant Dent.* 2006 Dec;15(4):341-6.

Tuner J, Hode L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Oct;16(5):245-8.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29(2):165-73.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2003 Oct 15;71(1-3):87-98.

van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000.* 1996 Feb;10:45-78.

Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, et al. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech.* 2005 Oct;68(2):85-9.

Von Pressentin MdM. Desenvolvimentos recentes sobre doença peri-implante: noções gerais para o clínico. *Rev bras odontol.* 1997 mar.-abr.;54(2):76-8.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jul;42(1):13-28.

Warrer K, Buser D, Lang NP, Karring T. Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 1995 Sep;6(3):131-8.

Weber HP, Buser D, Donath K, Fiorellini JP, Doppalapudi V, Paquette DW, et al. Comparison of healed tissues adjacent to submerged and non-submerged unloaded titanium dental implants. A histometric study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1996 Mar;7(1):11-9.

Weber HP, Cochran DL. The soft tissue response to osseointegrated dental implants. *J Prosthet Dent*. 1998 Jan;79(1):79-89.

Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J*. 1994 Apr;44(2):181-9.

Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol*. 1992 Aug;25(2):77-81.

Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993 Jun;8(3):182-7.

Yamada Júnior AM. Efeito da terapia fotodinâmica sobre periodontite induzida em ratos. Tese - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - São Paulo, SP. 2007:87p.

Yamada Júnior AM, Hayek RRA, Ribeiro MS. O emprego da terapia fotodinâmica (PDT) na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. *RGO (Porto Alegre)*. 2004 jul.-set.;52(3):207-10.

Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med*. 2002;30(1):60-6.

Young MP, Carter DH, Worthington H, Korachi M, Drucker DB. Microbial analysis of bone collected during implant surgery: a clinical and laboratory study. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Apr;12(2):95-103.

Zanin ICJ, Brugnera Junior A, Gonçalves RB. Aplicação da terapia fotodinâmica na descontaminação bacteriana. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2002 jun.;56(supl):7-11.

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 224012
Protocolo 195/08

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"EFICIÊNCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO AO CORANTE AZUL DE METILENO NA AÇÃO BACTERICIDA NO SULCO PERIIMPLANTAR DURANTE O PERÍODO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE UM ESTÁGIO CIRÚRGICO"**, de responsabilidade do Pesquisador João Eduardo Miranda Franco, sob orientação da Professora Doutora Tomie Nakakuki de Campos.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
FR-224012
Protocolo 195/08

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente alteração do título do projeto de: "Eficiência do laser de baixa potência associado ao corante azul de metileno na ação bactericida no sulco periimplantar durante o período de osseointegração de implantes de um estágio cirúrgico", para: "**Avaliação clínica dos tecidos periimplantares frente à terapia fotodinâmica**"; alteração do objetivo do processo para cicatrização dos tecidos; no item materiais e métodos: redução do número de participantes para 20; realização das instalações dos implantes; avaliação periimplantar, avaliação radiográfica e avaliação das coroas temporárias e definitivas ", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) João Eduardo Miranda Franco sob orientação do(a) Prof(a). Doutor(a). Tomie Nakakuki de Campos.

São Paulo, 29 de junho de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP

ANEXO B - Meio de transporte VMGA III (Viability Medium Göteborg Anaerobically)

Solução	Componentes	Procedimento
A	Tryptose (Difco, Laboratories, EUA)..... 0,5 g Thiotone (BBL, EUA)..... 0,5 g Água destilada 540 mL	Dissolver com agitação e aquecimento
B	Bacto agar 4% (Difco, Laboratories, EUA)..... 2g Água destilada..... 50 mL	Dissolver em fervura
C	Gelatina (Difco, Laboratories, EUA)..... 50 g Água destilada..... 300 mL	Dissolver com agitação e aquecimento até a homogeneização
D	Ácido tioglicólico (Difco, Laboratories, EUA)..0,5 mL	-----
E	Solução de sais de estoque..... 100 mL (posteriormente descrita)	-----
F	L-cisteína HCL (Merck, EUA)..... 0,5 g Água destilada..... 10 mL	Dissolver com suave aquecimento

As soluções de A – E são misturadas na ordem descrita (a temperatura não pode estar menor que 50°C). Depois a mistura é fervida livre de oxigênio sob fluxo de gás carbônico durante 3 minutos. Em seguida, troca-se este gás por nitrogênio. Quando o indicador azul-de-metileno altera sua coloração, deixando a solução mais clara, adiciona-se a solução de cisteína (F) e o pH é ajustado para 7,2. O meio é, então dispensado em frascos que contém pérolas de vidro, onde foi injetado o gás carbônico. Durante este procedimento coloca-se ainda gás nitrogênio dentro dos frascos, para se obter um ambiente livre de oxigênio. Logo após, são firmemente fechados, autoclavados a 115°C durante 20 minutos e armazenados a temperatura ambiente.

Solução de sais de estoque:

Solução	Componentes	Procedimento
1	Acetato de fenil mercúrio-cromo (Merck, EUA)0,005 g Água destilada..... 300 mL	Dissolver por aquecimento e incubar a 50°C durante uma noite
2	Glicerofosfato de sódio hidratado (Merck, EUA) 100 g Água destilada..... 200 mL	Dissolver aquecendo lentamente
3	Cloreto de cálcio hidratado..... 1,6 g Cloreto de potássio..... 4,2 g Cloreto de sódio..... 10,0 g Sulfato de magnésio hidratado..... 1,0 g Água destilada..... 300 mL	Dissolver sob agitação
4	Azul-de-metileno (Merck, EUA)..... 0,03 g	-----

As soluções 1, 2 e 3 são misturadas de modo que não haja precipitação de sais. A seguir, completa-se com água destilada até o volume de 1000mL e adiciona-se o azul-de-metileno. A solução de sais é, então, armazenada em frascos bem fechados, à temperatura ambiente até o momento de uso.

ANEXO C - Água peptonada

Água destilada.....	1000 mL
Tryptone (Difco, Laboratories, EUA).....	2,5 g
Thiotone E-peptone (BBL, EUA).....	2,5 g
Cloreto de sódio (Synth, Brasil).....	5,0 g

Aquecer até dissolver por completo. Ajustar o pH para 7,2. Dispensar em tubos e autoclavar a 121°C durante 25 minutos.

ANEXO D - Ágar Brucella sangue, hemina e menadione

Água destilada.....	950 mL
Ágar Brucella.....	43 g
Extrato de levedura.....	2 g
Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos. Após, resfriar o meio a 45°C, adicionar:	
Solução de hemina.....	1 mL
Solução de menadione.....	0,1 mL
Sangue de carneiro desfibrinado.....	50 mL

Solução de Hemina

Hemina.....	0,5 g
Solução de hidróxido de sódio 1 M.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL

Dissolver a hemina na solução de NaOH. Adicionar a água destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Solução de Menadione

Menadione.....	0,2 g
Etanol.....	2 mL
Água destilada estéril.....	18 mL

Pesar a menadione em papel alumínio estéril. Adicionar 2 mL de etanol em tubo estéril. Adicionar os 18 mL de água destilada.

Anexo E - Interpretação do gráfico de Boxplot

Boxplot é uma técnica que mostra graficamente algumas medidas resumo de um conjunto de dados, tais como: média, mediana, valor mínimo, valor máximo, bem como eventuais valores extremos chamados de *outliers*, e representados por um asterisco (*).

A média é indicada por um ponto preto; a mediana (2º quartil) é representada por uma linha horizontal que fica dentro da caixa retangular; os valores dentro da caixa, entre o 1º e o 3º quartil, representam 50% dos dados; os valores mínimo e máximo, na ausência de *outliers*, são aqueles que correspondem ao extremo inferior e superior respectivamente, das linhas verticais que saem das caixas.

Apêndice A - Ficha de Anamnese

Data ____/____/____

Dados Pessoais			
Nome:			
Endereço:		nº:	Complemento:
Bairro:		Estado:	CEP:
Tels: Res:	Com:		Cel:
Data de Nascimento:	/	/	Sexo: M F
Profissão:			

Histórico Médico			
Sofre de alguma doença?	Não	Sim	Qual:
É diabético?	Não	Sim	Tempo:
Demora para cicizar?	Não	Sim	
Toma algum medicamento?	Não	Sim	Qual:
Apresenta alguma alergia?	Não	Sim	Condição:
É fumante?	Não	Sim	Tempo e Quantidade por dia:
Gengiva sangra com facilidade?	Não	Sim	Condição:

Histórico Dental			
Como perdeu o dente que será substituído por implante?			
Cárie	Mobilidade	Trauma	Outros_____
Já realizou tratamento periodontal?			
Já teve orientação de higiene bucal:		não	sim
Condição:			
Quantas vezes escova por dia?		Tipo de escova- cerdas: macia média dura	
Realiza bochechos- não sim		Usa fio dental: não sim	
Qual Produto utiliza?		vezes/dia _____	

Histórico Protético			
Portador de prótese:		não	sim
Qual - superior_____ tempo____		/	inferior_____
tempo____			
Como higieniza a prótese?:			

Declaro que os itens acima foram explicados e que não tenho nenhuma dúvida sobre estes e assino minha concordância.

Exame Intra Bucal

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Índice Gengival																
Fibromucosa																

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
Índice Gengival																
Fibromucosa																

ÍNDICE GENGIVAL

0 sadia
1 inflamação leve
 suave mudança cor/textura
2 inflamação moderada
 hipertrofia
 sangramento na sondagem
3 infamação severa
 hipertrofia
 sangramento espontâneo
 ulceração

FIBROMUCOSA

0 firme, rosada
1 inflamação leve

2 inflamação moderada
 alteração de cor/textura
 pontos de sangramento
3 infamação severa
 alteração de cor/textura
 sangramento espontâneo

Presença de gengiva inserida?

não

sim

Localização do Implante

Inferior

Superior

Apêndice B - Consentimento Livre e Esclarecido

As informações contidas neste, foram fornecidas pelos Prof^a. Dr^a. Tomie Nakakuki de Campos e pelo Mestrando João Eduardo Miranda Franco, objetivando firmar acordo por escrito, mediante o qual, o paciente voluntário autoriza a participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1. Título da pesquisa

“Avaliação clínica dos tecidos periimplantares frente à terapia fotodinâmica.”

2. Objetivo Principal

Reduzir as bactérias em torno dos implantes, principalmente as bactérias anaeróbios estritos e facultativos, que são as mais agressivas, favorecendo desta maneira o processo de cicatrização dos tecidos em torno do implante e consequentemente o sucesso na reabilitação oral através de implantes osseointegrados.

3. Justificativa

Promover uma melhor condição de cicatrização, o que irá favorecer a qualidade do tratamento e consequentemente o sucesso na reabilitação oral.

4. Procedimento

Inicialmente deve-se responder a uma anamnese, para avaliação clínica, com enfoque quando: histórico dental e médico; saúde sistêmica e bucal; uso de medicação regular ou durante a pesquisa. Como critério de exclusão: pacientes com evidências clínicas de

gingivite (inflamação da gengiva) ou periodontite (índice gengival e de fibromucosa 2 ou 3 conforme ficha em anexo- exceto nas regiões vizinhas e de instalação do implante onde o critério de exclusão será o índice 3); pacientes que relataram histórico de doença periodontal mesmo que controlado; pacientes com uso regular de qualquer tipo de medição ou uso de medição durante a pesquisa.

Todos os pacientes selecionados receberão orientação de higiene bucal (escovação com dentífrico e uso de fio dental) e limpeza mecânica dos dentes. Estes procedimentos profiláticos serão repetidos a cada 3 meses.

Cirurgia para instalação dos 2 implantes: Os pacientes deverão tomar duas medicações preventivas, iniciadas 1 dia antes da cirurgia, que consiste em um antibiótico (amoxicilina 500mg de 8 em 8 horas durante 7 dias) e um antiinflamatório (paracetamol 750mg de 8 em 8 horas durante 5 dias). Os implantes utilizados serão o Standard Plus da Straumann® Dental Implant System, por ser um sistema de implantes bem documentado pela literatura especializada. A cirurgia será realizada na clínica do Departamento de Prótese da FOU SP com anestesia local.

Análise das bactérias: serão feitas 12 coletas de bactérias em torno dos implantes, 4 coletas no dia da cirurgia, 4 coletas após 45 dias e 4 coletas após 6 meses. Em todas estas ocasiões serão realizadas sempre uma coleta antes da aplicação do laser e uma após aplicação do laser. Para coletar as bactérias é utilizado 4 cones de papel estéril por um período de 20 segundos. Após este tempo os cones serão removidos e levados para análise no laboratório onde será contada a quantidade de bactérias presentes.

Aplicação do Laser: será feita sem apresentar qualquer desconforto para o paciente no dia da cirurgia e após 15, 30 e 45 dias pós cirurgico. Inicialmente a gengiva em torno dos implantes serão irrigadas continuamente com 3ml de solução de azul de metileno, um corante

que irá pintar somente as bactérias, e após 5 minutos o laser será aplicado por 2 minutos. O corante será removido com irrigação de soro fisiológico estéril.

Análise clínica das condições a gengiva em torno dos implantes: serão avaliadas condições como a quantidade de placa bacteriana, sangramento da gengiva e recuo da gengiva. Estas avaliações serão realizadas após 6 semanas, 6 meses e 1 ano pós cirurgico.

Exame radiográfico: serão realizadas radiografias periapicais após a instalação dos implantes, após 6 semanas, 6 meses e 1 ano para avaliação da condição óssea.

Confecção das coroas (dentes sobre os implantes): coroas temporárias serão confeccionadas em resina acrílica e instaladas após 60 dias pós-cirurgia. As coroas definitivas, confeccionadas em metalo-cerâmica, serão instaladas após adequação do contorno gengival obtido com as coroas temporárias.

5. Riscos e benefícios

A pesquisa apresenta como risco os pertinentes a uma cirurgia oral menor, que serão devidamente controlados seguindo as recomendações pós cirúrgicas explicadas pelo profissional responsável.

Como benefício o paciente terá a reabilitação oral de dois dentes perdidos, por implantes osseointegrados, além dos benefícios apresentado pela PDT, como a redução do número de bactérias, sem promover resistência bacteriana, e favorecer a analgesia e cicatrização devido a característica de bioestimulação apresentado pelo Laser de baixa potência.

6. Informações adicionais

O voluntário tem garantia de que receberá resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de dúvidas sobre os procedimentos, riscos, benefícios, etc., relacionados à

pesquisa. Os pesquisadores anteriormente citados assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que essas possam afetar a vontade do voluntário em continuar participando do trabalho. A não identificação do voluntário na publicação do trabalho será totalmente respeitada, caso ele assim o deseje.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 Cidade Universitária São Paulo ou pelo site <http://www.fo.usp.br/portal/cep/default.aspx?menu=296&tipo=FALECONOSCO>)

7. Obrigações

Cooperação e sinceridade para que os dados obtidos não comprometam os resultados da pesquisa, dentro da proposta de trabalho elaborada. Qualquer tratamento médico/odontológico ao qual o paciente realize ou venha a realizar deverá ser notificado ao pesquisador, para que esse último possa avaliar uma possível influência nos dados da pesquisa. Os resultados do estudo não são apenas de responsabilidade dos pesquisadores, mas de todos os envolvidos no trabalho.

8. Retirada do Consentimento

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento.

Apêndice C - Geração do plano de randomização, realizada no site: <http://www.randomization.com>. Antes da geração estipulou-se que o primeiro representaria o implante mais a direita do paciente e o segundo o outro implante

Paciente	Direita	Esquerda
01	Controle	Laser
02	Controle	Laser
03	Laser	Controle
04	Controle	Laser
05	Laser	Controle
06	Controle	Laser
07	Laser	Controle
08	Laser	Controle
09	Controle	Laser
10	Controle	Laser
11	Laser	Controle
12	Controle	Laser
13	Controle	Laser
14	Controle	Laser

Para realizar a reprodução basta reproduzir as informações abaixo no site acima mencionado.

20 subjects randomized into 1 block

To reproduce this plan, use the seed 20054