SAMIRA SALMERON

Efeitos do laser em baixa intensidade, da terapia fotodinâmica e do azul de toluidina O na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral - Periodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende

BAURU

2011

Salmeron, Samira

Sa35e Efeitos do laser em baixa intensidade, da terapia fotodinâmica e do azul de toluidina O na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos / Samira Salmeron. – Bauru, 2011.

186 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profª. Drª. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiables e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 06/04/2011

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolos nº: 121/2008 e 015/2008

Data: 30/10/2008 e 21/10/2008

DADOS CURRICULARES

Samira Salmeron

03 de Novembro de 1982

Nascimento: Piracicaba/SP.

Filiação

Antonio Salmeron.
Lidia Bonocher Salmeron.

2004 - 2007

Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

2005 - 2007

Iniciação Científica junto à disciplina de Cirurgia, sob orientação do Prof. Dr. Osny Ferreira Júnior – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

2008

Prática Profissionalizante junto à disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

2008

Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia – Instituto de Ensino Odontológico (IEO, Bauru/SP).

2010

Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Avançada em Implantodontia – Odontologia Prof. Edgard Moraes (OPEM, Bauru/SP).

2009 - 2011

Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral – Periodontia em nível de Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

ERRATA

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha querida família:

*Aos meus pais **Antonio** e **Lidia**, por colaborarem de forma tão especial na concretização desse sonho e por me educarem para ser uma pessoa cada vez melhor!*

*À minha irmã **Sintia**, por acreditar que tudo é possível, despertando sempre o que há de melhor em mim!*

*Ao meu querido **Arthur**, por tudo que vivemos e por todas as situações adversas e fundamentais pelas quais passamos e que fizeram parte da minha evolução pessoal!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rybo de Rezende, acima de tudo, uma amiga. Pessoa que admiro pelo caráter, pela capacidade profissional e por sua essência como um todo. Com a sua ajuda, cresci muito, sob todos os aspectos. Obrigada por sempre me apoiar, por sempre estar ao meu lado, por acreditar em mim e, acima de tudo, pelas lições passadas, pelas oportunidades recebidas e pela confiança em mim depositada!

Meus sinceros agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **DEUS**, pois sem *Ele* nada disso seria possível! Obrigada *Senhor* por mais uma vez me mostrar diferentes perspectivas e novos caminhos, fazendo com que eu realmente me encontrasse na profissão!

Aos meus **pais ANTONIO SALMERON e LIDIA BONOCHER SALMERON** pela incansável dedicação e paciência. Por tudo que me foi ensinado, pelos valores familiares de amor e união, pela compreensão e por não medirem esforços para que nós sejamos felizes. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão, apenas posso dizer que amo muito vocês!

À minha **irmã SINTIA SALMERON** por abranger, de todas as formas possíveis, o real sentimento fraternal. Pelo carinho, pela cumplicidade, por sua alegria contagiante. Agradeço à minha melhor amiga pelo apoio incondicional e pelos incontáveis momentos em que estive ao meu lado. Amo você, irmã!

Ao meu querido **ARTHUR ALVES FIOCCHI** por sempre acreditar em mim. Por fazer parte da minha vida de uma maneira tão especial. Por me ajudar a crescer pessoalmente e profissionalmente. Com você, aprendi muito. Agradeço os anos de convivência e espero que possamos ser cada vez mais felizes! Amo você!

Aos meus **avós maternos DOMINGOS BONOCHER (in memorian) e WILMA MARTINS BONOCHER (in memorian)** pelas maravilhosas lembranças deixadas. Por todos os momentos de felicidade e por tudo que me proporcionaram. Agradeço os ensinamentos deixados e guardo comigo todas as recordações que contribuíram para a construção do ser humano que me tornei!

Aos meus **avós paternos ANTONIO LOPES SALMERON (in memorian) e MERCEDES PARIZOTTO SALMERON** por ensinarem os valores que, mais tarde, me foram passados. Agradeço por estarem presentes, mesmo que em pensamento, e por me deixarem importantes lições de vida!

Aos meus **sogros AULUS SANTINI FIOCCHI e SÔNIA MARIA ALESSIO ALVES FIOCCHI** pela constante motivação e intensa torcida. Agradeço o amor e o carinho recebidos ao longo de todos esses anos!

À minha querida **família (tios, tias, primos e primas)** pela participação ativa e constante em absolutamente todos os momentos da minha vida. Obrigada por me apoiarem e por vibrarem a cada conquista!

Aos meus **amigos CAMILA ARANTES GARCIA, DÉBORAH CAETANO FERRAZ, MARCELO MAZOTI e VINÍCIUS VITALE RIBEIRO** por sempre torcerem por mim, por estarem presentes mesmo distantes e pela amizade sincera mantida apesar de todos os obstáculos do tempo e do espaço!

Ao professor titular e chefe da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Prof. Dr. EULOIR PASSANEZI** por ajudar com sua experiência, me orientando nas tomadas de decisões, e pelos ensinamentos adquiridos, extremamente valiosos e que serviram de base para o meu crescimento profissional.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Profª. Drª. ADRIANA CAMPOS PASSANEZI SANT'ANA, Profª. Drª. CARLA ANDREOTTI DAMANTE e Prof. Dr. SEBASTIÃO LUIZ AGUIAR GREGHI** pela amizade, por fazerem parte da minha evolução profissional, pelo constante aprendizado e pelas importantes lições científicas, as quais levarei pelo resto da vida.

Ao professor titular da Disciplina de Patologia da FOB/USP **Prof. Dr. ALBERTO CONSOLARO** pela paciência e dedicação em me ensinar a compreender um “pouquinho” da análise microscópica. Agradeço por participar ativamente desse trabalho, dedicando muito de seu precioso tempo em nos ajudar, enriquecendo-o com seus conhecimentos e ideias, imprescindíveis para o resultado obtido.

Ao professor titular da Disciplina de Periodontia da FOA/UNESP **Prof. Dr. VALDIR GOUVEIA GARCIA** pela prontidão em colaborar com nossa pesquisa, ainda em fase de projeto, e pela disponibilização de seu tempo em participar de etapas fundamentais do trabalho.

Ao professor da Disciplina de Farmacologia da FOB/USP **Prof. Dr. CARLOS FERREIRA DOS SANTOS** por acreditar em mim e por lutar por seus alunos, sem se esquecer de seus princípios éticos e profissionais. Exemplo de pessoa e de professor. Docente no qual me espelho pelo caráter e amor à profissão.

Aos professores da Disciplina de Patologia da FOB/USP **Prof^a. Dr^a. DENISE TOSTES OLIVEIRA**, **Prof. Dr. LUÍS ANTÔNIO DE ASSIS TAVEIRA** e **Prof^a. Dr^a. VANESSA SOARES LARA** pela gentileza em disponibilizar os equipamentos e materiais necessários, sem os quais essa pesquisa não seria possível.

Ao **Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO PEREIRA LAURIS** por dedicar parte de seu tempo nos ajudando na análise estatística.

Aos meus colegas de mestrado **CARLOS FEDERICO FRANCO ALVAREZ** e **MÔNICA GARCIA RIBEIRO** por participarem dessa etapa comigo; e **RAFAEL MANSANO DE CASTRO LARA** por colaborar nas cirurgias dos animais.

Aos meus colegas de pós-graduação **EDUARDO FIGUEIRA ALEIXO** e **ROBERTA SANTOS DOMINGUES** pelo enorme aprendizado e pela ajuda nas cirurgias dos animais; **BRUNA FIDENCIO RAHAL FERRAZ**, **PEDRO TEIXEIRA GARCIA COESTA** e **RENATA RODRIGUES DE FREITAS BLAGITZ** por também fazerem parte dessa fase da minha vida.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia da FOB/USP:

EDILAINE LÚCIO RODRIGUES TORRECILHA pelo apoio e amizade recebidos durante todos esses anos de convivência;

IVÂNIA KOMATSU DA COSTA ARRUDA por sua incansável dedicação e amizade; exemplo de força e perseverança que me ajuda a seguir em busca do meu sonho, superando todos os obstáculos que surgem no decorrer do caminho;

MARCOS ANTONIO DE GODOY pela confecção das placas utilizadas pelos voluntários.

Aos estagiários da Disciplina de Periodontia da FOB/USP em 2010, **ANDRES MALDONADO ERAZO, BRUNO NICOLIELLO MOREIRA, CAMILA MASCARENHAS MORAES, CARMEN EMÍLIA CABA, FABÍOLA PONTES AZEVEDO, GUILHERME SANTOS MOREIRA, IRIS JASMIN SANTOS GERMAN, MARÍA ALEJANDRA MEDINA VALDIVIA, PAULA STEPHANIA BRANDÃO HAGE KARAM** e **PAULA THEODORO GUERRA JACINTHO**, responsáveis pelos impagáveis momentos de descontração.

Aos pós-graduandos da Disciplina de Patologia da FOB/USP **ADRIANA CAETANO, ANA REGINA CASAROTO, BRUNA VILARDI, DIEGO MAURÍCIO BRAVO CÁLDERON, ELOISA COLI PADULA, FERNANDA MONBRINI PIGATTI, HELITON GUSTAVO DE LIMA, KAREN HENRIETTE PINKE, MARIA CAROLINA MARTINS MUSSI, PRISCILA TOBOUTI** e **TAÍSA VILARDI** pela amizade sincera e pela forma como me acolheram em seu departamento durante o período em que convivemos juntos.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia da FOB/USP:

FÁTIMA APARECIDA SILVEIRA pela amizade, pelo carinho e por sua imensurável colaboração ao passar parte de seu conhecimento técnico, sendo fundamental na qualidade dos resultados obtidos neste trabalho;

MARIA CRISTINA CARRARA FELIPPE pelo carinho e pela forma atenciosa com que sempre me recebeu, disponibilizando tudo que estava ao seu alcance para me ajudar.

Aos voluntários da pesquisa **BRUNO CALZAVARA, CARLOS EDUARDO PALANCH REPEKE, CAROLINA ORTIGOSA CUNHA, FERNANDA LESSA AMARAL, GUILHERME ALENCAR JACOB, KEIZE TÁVORA BARBOSA, LÍVIA PICCHI COMAR, LUCAS BRONDI RIBEIRO, LUIZ EDUARDO DE MORAES, MÔNICA LOBO DO NASCIMENTO, PAULA THEODORO GUERRA JACINTHO, RAFAEL MANSANO DE CASTRO LARA, RAQUEL DATI MACEDO, RENATA ABOU EL HOSN OHANA** e **ROBERTA SANTOS DOMINGUES** pela boa vontade e pela imensa colaboração, sem os quais não teríamos realizado esta pesquisa.

Às secretárias do departamento de Prótese **ANA CLÁUDIA PEREIRA MATTAR** e **DÉBORA ANDREA RIÊRA BLASCA**, por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos funcionários do biotério da FOB/USP **ELIAS FRANCISCO CRESTA**, **ERASMO GONÇALVES DA SILVA**, **LUIZ CARLOS DA SILVA** e **Richard NELSON GUANAES SIMÕES** por cederem e cuidarem dos meus animais e pela disponibilidade em atender aos nossos pedidos.

Aos **funcionários** da biblioteca, da esterilização e toda a Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP).

À **Universidade do Sagrado Coração (USC)** pela oportunidade de utilizarmos o microscópico para realização das fotos; e ao **técnico** do Laboratório de Biologia Molecular **WILSON APARECIDO ORCINI** por sua colaboração com as escalas das fotografias.

À **Pós-graduação** da FOB/USP, na pessoa do **Presidente Prof. Dr. PAULO CÉSAR RODRIGUES CONTI**, pela disponibilização de recursos que foram fundamentais para a realização da pesquisa.

Às funcionárias da pós-graduação **ANA LETÍCIA PALOMBO MOMESSO**, **FÁTIMA CASSADOR CARVALHO**, **LEILA REGINA DA SILVA** e **MARIA MARGARETH PEREIRA MOKARZEL** pelos esclarecimentos prestados.

À empresa **TITANIUM FIX** pela gentileza em fabricar e ceder os discos de titânio utilizados neste trabalho.

Às agências de fomento **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pela concessão do Auxílio à Pesquisa solicitado, sem o qual não seria possível a concretização desse trabalho; e **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP), minha segunda casa, na pessoa do diretor *Prof. Dr. JOSÉ CARLOS PEREIRA*.

E a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Samira Salmeron

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.”

Albert Einstein

RESUMO

A peri-implantite acomete um número crescente de indivíduos e os protocolos de tratamento objetivam descontaminar as superfícies dos implantes e torná-las novamente osseointegráveis. Porém, ainda não foi estabelecido um padrão ouro de tratamento para peri-implantite. Este estudo testa o poder de descontaminação do laser em baixa intensidade (LBI), da terapia fotodinâmica (PDT) e do azul de toluidina O (TBO). Sobre discos de titânio de 1,5 mm de espessura e 4,0 mm de diâmetro de superfícies lisas ou rugosas foi permitida a deposição natural de biofilme microbiano por 7 dias após os quais os discos foram divididos em grupos experimentais (15 discos por grupo), de acordo com o método de descontaminação: grupo LBI (laser de InGaAlP de 660 nm, 30 mW, 45 J/cm² no modo contínuo por 30 s); grupo PDT; grupo TBO (aplicação de TBO por 60 s); grupo controle positivo (C) sem tratamento e grupo controle negativo (NC) estéril. Os discos foram implantados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e, após 7, 28 e 84 dias, foram obtidas 5 biópsias de cada grupo para análise em microscopia óptica. Implantes lisos e rugosos não diferiram com relação ao grau de fibrosamento e severidade do infiltrado inflamatório, mas a área do tecido reacional perimaterial foi maior nos rugosos ($2,6 \pm 3,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) do que nos lisos ($1,9 \pm 2,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). O grupo C foi o que apresentou menor grau de fibrosamento do tecido reacional (1), mas somente houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0230$) entre os grupos C e NC. A severidade do infiltrado inflamatório somente diferiu significativamente entre os grupos aos 7 dias, quando o grupo NC apresentou o menor escore (2) em comparação aos demais grupos (3). Com relação à área do tecido reacional perimaterial, só houve diferenças entre os grupos aos 7 dias, quando o grupo C apresentou maior área que os demais grupos ($9,11 \pm 2,10 \times 10^6 \mu\text{m}^2$), porém, sem diferença estatisticamente significativa em comparação aos grupos LBI e TBO. A área apresentada pelo grupo PDT ($4,34 \pm 1,49 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) só foi inferior ao grupo NC ($0,65 \pm 0,23 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). A espessura do tecido reacional não confirmou a diferença entre os discos de superfície lisa e os de superfície rugosa ($p = 0,2801$), mas confirmou todas as demais comparações relativas à área, sendo que o grupo NC apresentou menor espessura que os demais somente aos 7 dias. O grupo NC apresentou menor espessura de tecido reacional do que os demais grupos, mas essa diferença foi estatisticamente significativa somente aos 7 dias. Os demais

grupos não diferiram entre si quanto a esse parâmetro. Concluiu-se que implantes rugosos ou lisos contaminados por biofilme microbiano e tratados com LBI, PDT e TBO não diferem entre si quanto aos parâmetros inflamatórios teciduais, parecendo haver leve superioridade da PDT sobre os demais tratamentos apenas no período mais precoce de observação. Porém, com o passar do tempo, todos os tratamentos se equiparam a implantes estéreis quanto à reação tecidual perimaterial.

Palavras-chave: Descontaminação. Implante dentário. Terapia a laser. Terapia fotodinâmica. Azul de toluidina O.

ABSTRACT

Effect of low intensity laser, photodynamic therapy and toluidine blue O the on decontamination of metallic implants surfaces. Microscopic study in rats' subcutaneous tissue

The peri-implantitis is a disease that is increasing in a number of individuals and the protocols of treatment has intended to decontaminate the implant surfaces and makes this biocompatible again. However, until this moment, a gold standard for peri-implantitis treatment was not established. The present study tests the power of decontamination of low intensity laser (LBI), photodynamic therapy (PDT) and toluidine blue O (TBO). The natural deposition of microbial biofilm was allowed on titanium discs with 1,5 mm of thickness and 4,0 mm of diameter and smooth and grooved surfaces during 7 days when the discs were separated in experimental groups (15 discs each group), in accordance with the decontamination method: LBI group (decontamination with InGaAlP laser, 660 nm, 30 mW, 45 J/cm² in continuous way during 30 s); PDT group; TBO group (application of TBO during 60 s); controlled positive group (C) without any kind of treatment and controlled negative group (NC), sterile. The discs had been implanted in rats' subcutaneous connective tissue and, after 7, 28 and 84 days, had been gotten 5 biopsies from each group for histology processing. Smooth and grooved implants did not differ on fibrosis grade and severity of the inflammatory infiltrate, however the perimaterial reaction tissue area was bigger on grooved implants ($2,6 \pm 3,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) than on smooth implants ($1,9 \pm 2,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). The C group was the one that showed the smallest reaction tissue fibrosis grade (1), but only was significant statistical difference ($p = 0,0230$) between C and NC groups. The severity of inflammatory infiltrate only significant differed between the groups on 7 days, when the NC group showed the smallest score (2) in comparison to the others groups (3). In relation to the perimaterial reaction tissue area, only were differences between the groups on 7 days, when C group showed bigger area than the others ($9,11 \pm 2,10 \times 10^6 \mu\text{m}^2$), nevertheless, without significant statistical difference in comparison to LBI and TBO groups. The area presented by PDT group ($4,34 \pm 1,49 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) only was inferior to NC group ($0,65 \pm 0,23 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). The reaction tissue thickness did not confirmed

the difference between smooth and grooved surfaces discs ($p = 0,2801$), however it confirmed all the comparisons related to the area parameter, where NC group showed smaller thickness than the others only on 7 days. NC group showed smaller thickness than the others, but this difference was statistical significant only on 7 days. The other groups did not differ among them in this parameter. It was concluded that grooved and smooth implants contaminated by a microbial biofilm and treated with LBI, PDT and TBO did not differ among them in relation to tissue inflammatory parameters, seems that is a light superiority of PDT in relation to the others only in the earliest period of observation. Nevertheless, with the time, all the treatments were equally to sterile implants in relation to perimaterial reaction tissue.

Key words: Decontamination. Dental implantation. Laser therapy. Photodynamic therapy. Toluidine blue O.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Linha de espectro eletromagnético	067
Figura 2 –	Diagrama representativo da estrutura do laser em baixa intensidade.	068
Figura 3 –	Diagrama representativo da penetração do laser nos tecidos de acordo com o comprimento de onda (λ)	069
Figura 4 –	Diagrama ilustrativo do mecanismo de ação do laser em baixa intensidade sobre as células vivas	070
Figura 5 –	Estrutura química do azul de toluidina O representada por um sistema de anel aromático tricíclico planar	074
Figura 6 –	Implantes de titânio na forma de discos, juntamente com a embalagem em que vieram de fábrica.	087
Figura 7 –	Imagens dos discos de implantação geradas pelo microscópio eletrônico de varredura	088
Figura 8 –	Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco liso produzida pelo perfilômetro de contato	088
Figura 9 –	Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco rugoso produzida pelo perfilômetro de contato	089
Figura 10 –	Diagrama representativo da distribuição dos discos de titânio no dispositivo acrílico palatino removível	090
Figura 11 –	Sequência de confecção do dispositivo acrílico palatino	090
Figura 12 –	Sequência de remoção dos discos dos dispositivos acrílicos palatinos	091
Figura 13 –	Equipamento de laser utilizado	092
Figura 14 –	Diagrama representativo dos sentidos da irradiação	093
Figura 15 –	Descontaminação da superfície de um disco do grupo LBI de modo a formar um único ponto	093
Figura 16 –	Sequência de tratamento para o grupo PDT	094

Figura 17 – Tratamento dado ao grupo TBO	095
Figura 18 – Sequência cirúrgica da implantação dos discos no tecido subcutâneo dos ratos	097
Figura 19 – Delineamento esquemático da distribuição dos grupos de acordo com os períodos experimentais	098
Figura 20 – Macroscopia	099
Figura 21 – Identificação da área do tecido reacional perimaterial	102
Figura 22 – Identificação da espessura do tecido reacional perimaterial	103
Figura 23 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC _L em vários aumentos	108
Figura 24 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC _L em vários aumentos	109
Figura 25 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC _L em vários aumentos	110
Figura 26 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC _R em vários aumentos	111
Figura 27 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC _R em vários aumentos	112
Figura 28 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC _R em vários aumentos	113
Figura 29 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C _L em vários aumentos	115
Figura 30 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C _L em vários aumentos	117

Figura 31 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C _L em vários aumentos	118
Figura 32 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C _R em vários aumentos	119
Figura 33 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C _R em vários aumentos	120
Figura 34 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C _R em vários aumentos	121
Figura 35 – Espécime do grupo C _R de 84 dias em uma visão panorâmica em fotomontagem do corte	122
Figura 36 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI _L em vários aumentos	124
Figura 37 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI _L em vários aumentos	125
Figura 38 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI _L em vários aumentos	126
Figura 39 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI _R em vários aumentos	128
Figura 40 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI _R em vários aumentos	129
Figura 41 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI _R em vários aumentos	130

Figura 42 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT _L em vários aumentos	132
Figura 43 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT _L em vários aumentos	133
Figura 44 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT _L em vários aumentos	134
Figura 45 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT _R em vários aumentos	135
Figura 46 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT _R em vários aumentos	136
Figura 47 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT _R em vários aumentos	137
Figura 48 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO _L em vários aumentos	138
Figura 49 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO _L em vários aumentos	139
Figura 50 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO _L em vários aumentos	140
Figura 51 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO _R em vários aumentos	141
Figura 52 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO _R em vários aumentos	142

Figura 53 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO_R em vários aumentos	143
---	------------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Protocolo utilizado para descontaminação com laser em baixa intensidade	093
Tabela 2 –	Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos experimentais	144
Tabela 3 –	Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial de acordo com os períodos experimentais	145
Tabela 4 –	Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial aos 7 dias entre os grupos	145
Tabela 5 –	Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos experimentais	146
Tabela 6 –	Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial de acordo com os períodos experimentais	146
Tabela 7 –	Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial aos 7 dias entre os grupos	147
Tabela 8 –	Médias das áreas do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos e períodos experimentais	148
Tabela 9 –	Médias das áreas do tecido reacional ao redor dos implantes rugosos de acordo com os grupos e períodos experimentais	148
Tabela 10 –	Médias das espessuras do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos e períodos experimentais	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetencomitans</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Enzima adenosina trifosfatase
CGMIs	Células gigantes multinucleadas inflamatórias
cpTi	Titânio comercialmente puro
C	Grupo Contaminado
C _L	Grupo Contaminado de superfície lisa
C _R	Grupo Contaminado de superfície rugosa
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
Er:YAG	Laser de érbio
GaAlAs	Laser de arseneto de gálio-alumínio
GaAs	Laser de arseneto de gálio
GBR	Guide Bone Regeneration (regeneração óssea guiada)
InGaAlP	Laser de índio-gálio-alumínio-fósforo
InGaAsP	Laser de arseneto de gálio-índio-fósforo
ISO	International Organization for Standardization
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-Eosina
He-Ne	Laser de hélio-neônio
Ho:YAG	Laser de hólmio
MB	Metilene blue (azul de metileno)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo
NC	Grupo Não Contaminado
NC _L	Grupo Não Contaminado de superfície lisa
NC _R	Grupo Não Contaminado de superfície rugosa
Nd:YAG	Laser de neodímio
LASER	Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation (amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação)
LBI	Grupo Laser em Baixa Intensidade
LBI _L	Grupo Laser em Baixa Intensidade de superfície lisa

LBI _R	Grupo Laser em Baixa Intensidade de superfície rugosa
LPS	Lipopolissacarídeos
p	Nível de significância
PDT	Grupo Terapia Fotodinâmica
PDT _L	Grupo Terapia Fotodinâmica de superfície lisa
PDT _R	Grupo Terapia Fotodinâmica de superfície rugosa
<i>P.g</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>P.intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
RNA	Ribonucleic Acid (ácido ribonucléico)
SLA	Sand-blasted, large grit, acid-etched (jateamento seguido de ataque ácido)
TBO	Grupo azul de toluidina O (toluidine blue O)
TBO _L	Grupo azul de toluidina O de superfície lisa
TBO _R	Grupo azul de toluidina O de superfície rugosa
TPS	Titanium plasma spray (spray de plasma de titânio)
UFCs	Unidades formadoras de colônia
YAG	Ítrio-alumínio-granada

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
Ca ⁺⁺	íon cálcio
H ⁺	íon hidrogênio
K ⁺	íon potássio
Na ⁺	íon sódio
CO ₂	dióxido de carbônico
s	segundo (unidade de tempo)
cm	centímetro (unidade de comprimento)
cm ²	centímetro quadrado (unidade de área)
mm	milímetro (unidade de comprimento)
mm ²	milímetro (unidade de área)
λ	lambda (comprimento de onda)
nm	nanômetro (unidade de medida de comprimento de onda)
μm	micrômetro (unidade de comprimento)
μm ²	micrômetro quadrado (unidade de área)
ml	mililitro (unidade de volume)
J	joule (unidade de energia)
mJ	milijoule (unidade de energia)
J/cm ²	densidade de energia
W	watt (medida de potência)
mW	miliwatt (medida de potência)
g	grama (unidade de massa)
μg	micrograma (unidade de massa)
μg/ml	micrograma por mililitro (concentração)
pps	pulsos por segundo (frequência)
%	porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	59
2 REVISÃO DE LITERATURA	65
2.1 PERI-IMPLANTITE	65
2.2 LASER EM BAIXA INTENSIDADE E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA PERI-IMPLANTITE	66
2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA	73
2.4 RELAÇÃO ENTRE RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE E PERI-IMPLANTITE	77
2.4.1 Aderência de biofilme	77
2.4.2. Resposta a tratamentos de descontaminação e de regeneração	78
3 PROPOSIÇÃO	83
4 MATERIAL E MÉTODOS	87
4.1 IMPLANTES DE TITÂNIO	87
4.2 CONTAMINAÇÃO DOS IMPLANTES	89
4.3 DESCONTAMINAÇÃO DOS IMPLANTES	91
4.3.1 Tratamento com laser em baixa intensidade: grupo LBI	92
4.3.2 Tratamento com terapia fotodinâmica: grupo PDT	94
4.3.3 Tratamento com azul de toluidina O: grupo TBO	95
4.4 CIRURGIA DE IMPLANTAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO EM TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS	96
4.5 MACROSCOPIA	98
4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA	99
4.6.1 Análise microscópica descritiva	100
4.6.2 Análise microscópica semiquantitativa	100
4.6.2.1 Grau de fibrosamento	100
4.6.2.2 Severidade do infiltrado inflamatório	101
4.6.3 Análise microscópica quantitativa	101
4.6.3.1 Cálculo da área	102
4.6.3.2 Cálculo da espessura	102
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	103
4.7.1 Análise estatística dos dados semiquantitativos	103
4.7.2 Análise estatística dos dados quantitativos	104

5 RESULTADOS	107
5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA	107
5.1.1 Grupo não contaminado liso: NC _L	107
5.1.2 Grupo não contaminado rugoso: NC _R	111
5.1.3 Grupo contaminado liso: C _L	114
5.1.4 Grupo contaminado rugoso: C _R	119
5.1.5 Grupo tratado com laser em baixa intensidade liso: LBI _L	123
5.1.6 Grupo tratado com laser em baixa intensidade rugoso: LBI _R	127
5.1.7 Grupo tratado com terapia fotodinâmica liso: PDT _L	131
5.1.8 Grupo tratado com terapia fotodinâmica rugoso: PDT _R	135
5.1.9 Grupo tratado com azul de toluidina O liso: TBO _L	138
5.1.10 Grupo rugoso tratado com azul de toluidina O: TBO _R	141
5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA SEMIQUANTITATIVA	144
5.2.1 Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial	144
5.2.2 Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial	145
5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA	147
5.3.1 Área do tecido reacional perimaterial	147
5.3.2 Espessura do tecido reacional perimaterial	148
6 DISCUSSÃO	153
7 CONCLUSÕES	165
REFERÊNCIAS	169
APÊNDICES	179
ANEXOS	185

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Embora os implantes dentais tenham se consagrado como uma opção de tratamento altamente previsível ao longo do tempo (ADELL et al., 1990), com o crescimento gradativo do número de indivíduos reabilitados com esta modalidade de terapia, pode-se esperar também um número aumentado de complicações nos tecidos peri-implantares.

O termo “peri-implantite” foi definido como um processo inflamatório que afeta os tecidos duros e moles ao redor de implantes funcionais, resultando em perda de osso de suporte (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994). Para o desenvolvimento da peri-implantite, é necessário que haja a prévia colonização da superfície metálica do implante por bactérias na forma de biofilme (BECKER et al., 1990; MOMBELLI, 2002). Resultados de estudos microbiológicos em implantes que apresentaram doença peri-implantar identificaram bactérias que também estão implicadas como patógenos da doença periodontal (RAMS; LINK, 1983; MOMBELLI et al., 1995), mas o mecanismo de aderência de bactérias à superfície de implantes ainda não está totalmente esclarecido (DRAKE; PAUL; KELLER, 1999). Há evidências de que a superfície dos implantes se torna infectada por bactérias de forma semelhante à que ocorre na superfície de raízes dentais e se impregna com substâncias contaminantes que, ao serem liberadas, intensificam e perpetuam a resposta inflamatória, além de alterar a camada de óxido superficial (SHIBLI et al., 2004). Essas alterações são influenciadas por fatores físicos e biológicos, entre eles, a rugosidade de superfície, que parece proteger os microrganismos da remoção pelo fluxo salivar e por procedimentos de higiene oral (QUIRYNEN et al., 1990).

As substâncias contaminantes de superfícies de implantes foram identificadas como sendo lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS estão associados com a membrana externa de bactérias gram-negativas e estão implicados na destruição de tecidos duros e moles na doença periodontal (SIMON et al., 1971).

Considera-se que os LPS se aderem tão firmemente a superfícies metálicas (KNOERNSCHILD et al., 1994; NELSON et al., 1997; BICK et al., 1981), que são necessários tratamentos especiais para destruir sua estrutura (FREUDENBERG; GALANOS, 1990). Verificou-se que são potentes promotores da reabsorção óssea, induzem a liberação de mediadores inflamatórios potentes por

várias células, influenciam a migração de neutrófilos e são estáveis ao calor (BICK et al., 1981).

Diversos métodos de descontaminação de superfícies de implantes e de recuperação dos tecidos de suporte peri-implantares têm sido propostos, incluindo cirurgias a retalho, debridamento e condicionamento químico da superfície do implante, antibioticoterapia tópica e/ou sistêmica, *lasers* de diversos comprimentos de onda em diferentes potências e procedimentos de regeneração óssea (ERICSSON et al., 1996; PERSSON et al., 1996; HÜRZELER et al., 1997; BACH et al., 2000; DEPPE et al., 2001; KREISLER et al., 2002a; SCHOU; BERGLUNDH; LANG, 2004). Esses métodos buscam atingir o objetivo primordial do tratamento de descontaminação de implantes expostos à peri-implantite, que consiste em não apenas remover o óxido superficial contaminado, como também manter inalterada a topografia de superfície e a integridade dos tecidos circundantes (BAIER; MEYER, 1988; MOUHYI; SENNERBY; VAN RECK, 2000), além de tornar a superfície do implante novamente receptiva às células do hospedeiro, ou seja, passível de se reosseointegrar.

Entretanto, até o momento, nenhuma metodologia está bem estabelecida como padrão ouro para o tratamento da peri-implantite (KOTSOVILIS et al., 2008). A falta de reosseointegração observada em muitos casos de implantes contaminados por peri-implantite tem sido atribuída à remoção incompleta dos biofilmes microbianos com procedimentos mecânicos convencionais como curetas plásticas e raspadores sônicos e ultrassônicos (SCHWARZ et al., 2006). Os jatos de pós abrasivos têm alcançado sucesso nesse objetivo *in vitro*, mas há limitações quanto ao seu uso clínico, porque pode levar a alterações microscópicas na superfície do implante, além de estar associado a risco aumentado de enfisema (KREISLER et al., 2005).

Diferentes sistemas de *lasers* têm sido estudados para limpeza ou descontaminação de superfícies de implantes no tratamento das infecções peri-implantares, com destaque para os *lasers* de gás carbônico (CO₂), neodímio: ítrio-alumínio-granada (Nd:YAG), hólmio: YAG (Ho:YAG), érbio:YAG (Er:YAG) e arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) (GANZ, 1994; DEPPE et al., 2001; ROMANOS; EVERTS; NENTWIG, 2000, 2001; DÖRTBUDAK et al., 2001; KREISLER et al., 2002a; KREISLER; AL HAJ; D'HOEDT, 2003; HAYEK et al., 2005; CASTRO et al., 2007).

A associação de vários tipos de *lasers* com agentes fotossensibilizantes, na chamada terapia fotodinâmica (PDT), também tem merecido um importante quinhão de relevância entre as publicações sobre tratamento de peri-implantite. Há inúmeros relatos de que essa combinação pode alcançar uma redução significativa na viabilidade de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos da placa subgengival de indivíduos com periodontite crônica (WILSON et al., 1995; HAAS et. al, 1997).

Entre os agentes fotossensibilizantes, o azul de ortotoluidina, também chamado de azul de toluidina O (TBO), tem se mostrado altamente efetivo na redução de microrganismos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WILSON et al., 1995; HAAS et al., 1997; DÖRTBUDAK et al., 2001). Por outro lado, observa-se que a falta de uniformidade metodológica das pesquisas, a ampla variedade de possibilidades de emprego do laser e da terapia fotodinâmica, além do elevado número de variáveis possíveis, dificultam a avaliação dos resultados e a comparação entre eles, o que, em parte, pode justificar a carência, até o momento, de um protocolo unânime de terapia para casos de peri-implantite.

A influência da rugosidade superficial dos implantes nos diferentes tratamentos propostos para descontaminação também tem sido alvo de investigações (PARK et al., 2005; ROMANOS; EVERTS; NENTWIG, 2000, 2001; SHIBLI et al., 2006), com base em fortes indícios de que implantes que apresentam rugosidades em sua superfície aderem biofilmes microbianos mais fortemente do que os de superfície lisa (NAKAZATO et al., 1989; RAMS; LINK, 1983; DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; QUIRYNEN et al., 1993) a ponto de, no campo da medicina, já haverem esforços para adicionar antibióticos a implantes ortopédicos de superfície rugosa para prevenir as frequentes infecções a eles associadas (AVIV; BERDICEVSKY; ZILBERMAN, 2007; ANTOCI Jr et al., 2007).

Esta dissertação procurou avaliar a reação dos tecidos vivos a implantes de titânio de superfícies lisas e rugosas contaminados por biofilme microbiano e tratados com laser em baixa intensidade, terapia fotodinâmica e azul de toluidina O, na intenção de contribuir para a elucidação desse controverso tema da Odontologia, qual seja, reunir subsídios que apoiem uma modalidade de tratamento segura, confiável e previsível para a peri-implantite.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O tratamento da peri-implantite faz interface indissociável com temas correlatos, os quais serão abordados a seguir. Esses temas foram divididos em itens para facilitar a compreensão.

2.1 PERI-IMPLANTITE

O termo peri-implantite foi introduzido por Mombelli et al. (1987) e definido mais tarde por Albrektsson e Isidor (1994) como um processo inflamatório que afeta os tecidos duros e moles ao redor de um implante osseointegrado em função, resultando em perda de osso de suporte.

Para o desenvolvimento da peri-implantite, é necessário que haja a prévia colonização da superfície metálica do implante por bactérias na forma de biofilme (BECKER et al., 1990; MOMBELLI, 2002), o que acarreta uma reação de corpo estranho e o implante é encapsulado por um tecido fibroso. Consequentemente, os sinais clínicos da peri-implantite incluem aumento da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, supuração, edema, hiperplasia e vermelhidão nos tecidos marginais (HEITZ-MAYFIELD, 2008; MOMBELLI; LANG, 1998). Assim como acontece na periodontite, a dor não é um sinal típico da peri-implantite (MOMBELLI; LANG, 1998). Caso haja mobilidade do implante, isso indica que há completa falta de osseointegração, acarretando a indicação da remoção do implante (LINDHE; MEYLE, 2008).

Radiograficamente, a peri-implantite apresenta-se, geralmente, como um defeito ao redor do implante em formato de pires, enquanto que a parte mais apical do implante encontra-se osseointegrada (MOMBELLI; LANG, 1998).

A etiopatogenia da peri-implantite não está totalmente esclarecida, mas parece ser multifatorial e estar relacionada ao ambiente peri-implantar, à interface implante/tecido mole, aos fatores relacionados ao paciente (tabagismo, doenças sistêmicas, higiene oral, sobrecarga oclusal) e ao sistema imunológico (CASTRO et al., 2007).

Segundo Lindhe e Meyle (2008), higiene oral deficiente, diabetes mal controlado, tabagismo e componentes genéticos podem ser considerados como fatores de risco. Esses autores consideraram, ainda, que o histórico de periodontite também constitui um fator de risco para o desenvolvimento da peri-implantite.

Resultados de estudos microbiológicos em implantes que apresentaram doença peri-implantar identificaram bactérias que também estão implicadas como patógenos da doença periodontal (MOMBELLI et al., 1995), mas o mecanismo de aderência de bactérias à superfície de implantes ainda não está totalmente esclarecido (DRAKE; PAUL; KELLER, 1999).

Uma revisão sistemática recente sobre o tratamento da peri-implantite, feita por Kotsovilis et al. (2008), chegou à conclusão de que os estudos mais criteriosos são muito limitados em número, exibem amostra muito pequena e períodos de acompanhamento curtos. Entretanto, os autores destacaram que o debridamento mecânico combinado com antibioticoterapia, laser Er:YAG ou técnicas regenerativas podem ser usadas para o tratamento de peri-implantite, ainda que as indicações para cada uma dessas técnicas ainda não estejam bem delineadas.

2.2 LASER EM BAIXA INTENSIDADE E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA PERI-IMPLANTITE

“LASER” representa a sigla do inglês (Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation) e significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Trata-se de uma radiação eletromagnética não ionizante (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

A radiação laser é uma luz com características especiais como: monocromaticidade, ou seja, possui um só comprimento de onda; coerência, pois suas ondas caminham de forma similar em tempo e espaço; colimação, o que significa que seu feixe de luz é praticamente paralelo (BAGNATO, 2001; GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Em Odontologia, os *lasers* são usados em alta e em baixa intensidade. Os *lasers* em alta intensidade agem pela geração de calor. Por este motivo, são utilizados na realização de procedimentos cirúrgicos periodontais, na segunda fase

da terapia com implantes (reabertura), na descontaminação e selamento do canal radicular, entre outras finalidades (PINHEIRO, 2010a). Os mais conhecidos são os Er:YAG, Nd:YAG e CO₂. Entretanto, pelo custo bastante elevado, sua utilização na prática diária não é muito difundida.

O tratamento com laser em baixa intensidade transforma a energia dos fótons absorvidos em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos nas células e tecidos (RIBEIRO; ZECELL, 2004). Esse tipo de laser é bastante indicado nos pós-operatórios para controle da dor, do edema e aceleração da cicatrização; em casos de parestesia, aftas, herpes em estágio inicial e no tratamento de peri-implantites, quando associados a agentes fotossensibilizadores (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

A fototerapia com laser em baixa intensidade utiliza a luz situada nas faixas correspondentes ao espectro visível e infravermelho (DAMANTE, 2007). A luz visível compreende a faixa entre as cores violeta e vermelha, sendo que comprimentos de onda acima ou abaixo dessa faixa não são perceptíveis pelo olho humano (PINHEIRO, 2010b). Desta forma, para o ser humano, pode ser considerado que cada comprimento de onda (λ) representa uma cor (PINHEIRO, 2010b) (Figura 1).

Fonte: Adaptado de DAMANTE, 2009 (comunicação pessoal).

Figura 1 – Linha de espectro eletromagnético, onde é possível identificar os comprimentos de onda e suas respectivas faixas de cor

Dentre os *lasers* em baixa intensidade, há os de rubi, argônio, hélio-neônio (He-Ne) e os *lasers* de diodo ou semi-condutores.

O mecanismo de funcionamento dos *lasers* de diodo consiste na presença de várias camadas de polos positivo e negativo, com emissão da radiação pelas laterais (DAMANTE, 2007). Essas faces laterais, ao serem cortadas e polidas perpendicularmente à saída do feixe de luz, atuam como espelhos, fazendo com que haja reflexão dos raios (DAMANTE, 2007). A produção do laser ocorre através do bombeamento de energia, ou seja, passagem de corrente elétrica, por entre essas camadas, gerando excitação dos elétrons com emissão de fótons (partículas luminosas) (Figura 2). A utilização de diferentes materiais faz com que haja mudança da distância entre as bandas, alterando o comprimento de onda (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Fonte: Adaptado de GUTKNECHT; FRANZEN, 2004.

Figura 2 – Diagrama representativo da estrutura do laser em baixa intensidade

Os *lasers* semi-condutores ou de diodo incluem o arseneto de gálio (GaAs) e GaAlAs, com espectro infravermelho e gálio-alumínio-índio-fósforo (AlGaInP), que é um laser vermelho. Tanto a radiação vermelha como a infravermelha mostram-se benéficas para muitos tratamentos, porém são diferentes em relação a suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas, com efeitos também diferentes nos tecidos (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

Para obtenção de resposta biológica satisfatória, devem ser observados os seguintes parâmetros: comprimento de onda, densidade de energia ou fluência (dose), densidade de potência (intensidade), tipo de regime de operação do laser e número de tratamentos (DAMANTE, 2007).

O comprimento de onda do laser define seu efeito biológico (KREISLER; AL HAJ; D'HOEDT, 2003), uma vez que comprimentos de onda longos se espalham menos, penetrando mais profundamente nos tecidos (DAMANTE, 2007) (Figura 3).

Fonte: Adaptado de www.nupen.com.br (27/03/2011).

Figura 3 – Diagrama representativo da penetração do laser nos tecidos de acordo com o comprimento de onda (λ)

A luz próxima à região infravermelha é primeiramente absorvida pelos tecidos com alto conteúdo de hemoglobina e células com componentes de pigmentos escuros, como os encontrados nos periodontopatógenos (KREISLER; AL HAJ; D'HOEDT, 2003). Entretanto, a interação que ocorre do raio laser com os tecidos está relacionada às suas propriedades ópticas e ao comprimento de onda do laser (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). Ao incidir sobre os tecidos, o feixe pode sofrer processo de reflexão, absorção, espalhamento ou transmissão, sendo que os efeitos do laser advêm da energia que os fótons transferem ao tecido durante a absorção (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Karu (1989) sugeriu que o mecanismo de ação dos *lasers* em baixa intensidade ocorre da seguinte maneira: a luz visível produz alterações fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, alterando seu metabolismo, levando à

transdução do sinal a outras partes da célula, gerando uma fotorresposta. Já Smith (1991) sugeriu que, devido às propriedades fotofísicas e fotoquímicas da radiação infravermelha, esta inicia a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas celulares, gerando a mesma resposta final (Figura 4).

Fonte: Adaptado de RIBEIRO; ZECELL, 2004.

Figura 4 – Diagrama ilustrativo do mecanismo de ação do laser em baixa intensidade sobre as células vivas

Diferentes sistemas de *lasers* têm sido estudados como método de esterilização e limpeza ou descontaminação de superfícies de implantes no tratamento das infecções peri-implantares, com destaque para os *lasers* de CO₂, Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG e GaAlAs (GANZ, 1994; DEPPE et al., 2001; ROMANOS; EVERTS; NENTWIG, 2000, 2001; KREISLER et al., 2002a).

Alguns estudos empregam o laser de CO₂ como método de tratamento da inflamação peri-implantar por seu efeito bactericida e porque a temperatura do corpo do implante não aumenta significativamente após a irradiação (MOUHYI et al., 1999), além de não produzir alterações de superfície em análises microscópicas de varredura (OYSTER; PARKER; GHER, 1995). Estes achados têm sido atribuídos ao fato de que a energia do laser de CO₂ não é absorvida significativamente por superfícies metálicas, o que reduz o potencial de dano ao implante e injúrias

térmicas aos tecidos subjacentes (DEDERICH et al., 1990). De fato, Deppe et al. (2001) verificaram em cães que, quando o laser de CO₂ foi usado no modo superpulsado, ocorreu derretimento da superfície, mas nenhuma alteração foi vista no modo contínuo, mesmo em altas potências. Cortes histológicos de 4 meses mostraram evidência de contato direto osso-implante após a terapia a laser, especialmente quando foram usadas membranas.

Também Shibli et al. (2004) confirmaram a propriedade do laser de CO₂ de não alterar a topografia de superfície de implantes, embora seu efeito de limpeza não tenha sido satisfatório neste experimento. Esses autores removeram implantes que falharam de pacientes e, de um lado, os implantes foram irradiados com laser de CO₂ (teste) enquanto que o outro lado não recebeu irradiação (controle). Observaram, à microscopia eletrônica de varredura (MEV) que, empregando laser de CO₂ a 1,2 W em onda contínua por 40 s (40 J de energia) e em modo de varredura (cervical-apical), as superfícies teste apresentavam diferentes graus de resíduos orgânicos e elementos estranhos como carbono, oxigênio, sódio, cálcio e alumínio.

O laser de Nd:YAG foi comparado ao laser de CO₂ quanto a alterações de superfície de implantes de diferentes rugosidades em várias potências comumente empregadas para cirurgia de tecido mole por Park et al. (2005). A análise à MEV demonstrou que, depois do tratamento com Nd:YAG, todas as superfícies mostraram alterações e a quantidade de dano foi proporcional à potência. Já o laser de CO₂ não alterou nenhuma das superfícies independente do tipo de implante, o que os levou a concluir que o tratamento com laser de CO₂ parece ser menos danoso que com Nd:YAG no tratamento da peri-implantite. Esses resultados confirmaram os de Romanos, Everts e Nentwig (2000) que verificaram à MEV, extenso derretimento em todas as superfícies de spray de plasma de titânio (TPS) e hidroxiapatita (HA) tratadas com Nd: YAG nos quais foram vistos danos como perda de porosidade e microfraturas do revestimento, mesmo nas potências mais baixas. Já o laser de diodo não causou alterações nas superfícies estudadas.

O efeito bactericida de um laser de Er:YAG sobre diferentes tipos de superfícies de implantes dentais (jateada e atacada por ácido/SLA, TPS e HA) foi estudado por Kreisler et al. (2002a) que incubaram amostras dessas superfícies com uma suspensão de *Streptococcus sanguis* e as irradiaram com laser de Er:YAG a energias de pulso de 60 mJ e 120 mJ e frequência de 10 pps em um estágio de

translação XY controlado por computador. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs), avaliações de elevação de temperatura durante a irradiação e análise das superfícies por MEV demonstraram que, em comparação a espécimes não-irradiados, houve significativa redução bacteriana sem elevações excessivas de temperatura ou alterações morfológicas na superfície dos implantes.

Entretanto, ao compararem, à MEV, os efeitos dos *lasers* Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂ e GaAlAs nas propriedades superficiais de implantes endósseos de variados tipos de superfície, Kreisler et al. (2002a) observaram que, dependendo da energia empregada, os *lasers* YAG pulsados induziram derretimento parcial, rachaduras e formação de crateras. Além disso, o laser de CO₂ causou alterações nos implantes com superfície de HA, TPS e atacados por ácido, ao passo que o laser de GaAlAs não danificou nenhuma superfície.

Em estudo subsequente, Kreisler, Al Haj e d'Hoedt (2003) investigaram as alterações de temperatura que ocorrem na interface implante-osso durante a simulação de descontaminação com laser GaAlAs a 809 nm. Implantes de dois tipos de superfície (HA e SLA) foram inseridos em perfurações produzidas em blocos de osso fresco removido do fêmur de porcos. O laser foi aplicado com uma fibra óptica a 0,5 mm de distância da superfície dos implantes, em potência variando entre 0,5 e 2,5 W no modo contínuo. As elevações de temperatura durante a irradiação foram registradas por 120 s e, em média, a temperatura crítica de 47 °C foi excedida depois de 9,0 s a 2,5 W, 12,5 s a 2,0 W, 18,0 s a 1,5 W e 30,5 s a 1,0 W. As características de superfície não produziram efeito significativo na elevação de temperatura. Concluíram que, dependendo da energia, a descontaminação com laser de GaAlAs deve ter tempo de duração limitada para permitir o resfriamento do osso e do implante.

Por outro lado, Deppe, Horch e Neff (2007) conseguiram verificar, em humanos, ganho ósseo e reosseointegração significativamente superiores nos implantes que receberam irradiação a laser de CO₂ do que nos que não receberam. A irradiação foi realizada em associação a levantamento de retalho, remoção de tecido de granulação, jato de pó abrasivo, enxerto com uma mistura de osso autógeno e fosfato beta-tricálcico e membrana não reabsorvível (Gore Tex). Entretanto, aos 5 anos, essa diferença não era mais detectável, o que os levou a concluir que o tratamento da peri-implantite pode ser acelerado pelo uso de laser de

CO₂, mas, a longo prazo, esta não parece ser uma vantagem em relação à terapia convencional.

Também o laser de diodo (InGaAsP) de 980 nm durante 60 s em diferentes energias não produziu diferenças significantes entre superfícies de titânio tratadas e não tratadas em um recente estudo de Castro et al. (2007). Esta observação levou-os a concluir que o laser InGaAsP não danifica a superfície do titânio e parece ser seguro e útil no tratamento da peri-implantite.

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica é uma modalidade de tratamento que se baseia na ativação, por uma fonte de luz, de agentes fotossensibilizadores exógenos ou corantes.

Fotossensibilizadores são moléculas capazes de absorver energia luminosa e utilizá-la para promover reações químicas nas células e tecidos quando submetidos à luz (ZANIN et al., 2010). Quando são de cores diferentes da fonte luminosa excitadora, complementam o comprimento de onda da luz.

O fotossensibilizador excitado reage com o substrato, na maioria das vezes o oxigênio ou a água, para produzir variedades de oxigênio altamente reativas, com radicais livres e/ou oxigênio singlete (HAYEK et al., 2005), que podem causar danos a várias estruturas celulares como membranas e DNA (BHATTI et al., 1998; SARKAR; WILSON, 1993).

Para que se obtenham os efeitos esperados, o corante utilizado precisa ser compatível com o comprimento de onda do laser, apresentar mínima toxicidade, alta absorção e ressonância com os comprimentos de onda dos *lasers* mais eficientes (SOUSA, 2007).

Geralmente, no processo de fotossensibilização, o laser ou o corante isolados não são tóxicos e, por essa razão, apenas células que possuam o fotossensibilizador e também tiverem sido irradiadas serão afetadas pelo tratamento (O'NEILL; HOPE; WILSON, 2002).

Corantes roxos, marrons e verdes podem ser utilizados na terapia fotodinâmica, porém os mais empregados são os corantes azuis: azul de metileno

(MB) e azul de toluidina O. Estudos têm demonstrado que o azul de toluidina O é um fotossensibilizador efetivo para diversas bactérias, incluindo espécies encontradas na cavidade oral (SARKAR; WILSON, 1993). Recentemente, Goulart et al. (2010a,b) demonstraram, pela primeira vez, que é possível a geração de variedades reativas de oxigênio sob luz visível com a ativação do corante rosa bengala (usado em oftalmologia), azul de metileno e eritrosina por um aparelho fotopolimerizador convencional para resina composta. Os autores encontraram eficácia dos tratamentos contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) em culturas planctônicas e biofilmes, com superioridade da eritrosina sobre o azul de metileno.

O azul de toluidina O é um corante fenotiazínico, representado por uma molécula catiônica com estrutura fundamental composta por um sistema de anel aromático tricíclico planar (Figura 5) (BUCK, 2009).

Fonte: Adaptado de BUCK, 2009.

Figura 5 – Estrutura química do azul de toluidina O representada por um sistema de anel aromático tricíclico planar

Os corantes fenotiazínicos possuem intensa absorção na região de 620 – 660 nm, portanto são úteis em terapia fotodinâmica por estarem dentro da janela terapêutica requerida não só para a penetração eficiente da luz no tecido, como também para a produção suficiente de oxigênio singlete (WAINWRIGHT; GIDDENS, 2003).

O mecanismo pelo qual o azul de toluidina O causa a morte celular ainda não está totalmente esclarecido, embora sejam propostas duas hipóteses: 1) transferência direta de elétrons entre corante e biomoléculas; 2) transferência de energia da molécula excitada do corante para as moléculas de oxigênio, resultando na formação de oxigênio singlete (BHATTI et al., 1998).

Na terapia fotodinâmica, as densidades de potência (intensidades ou taxas de fluência) utilizadas são baixas e, mantendo-se a mesma dose (densidade

de energia ou fluência) e variando a intensidade ou o tempo de exposição, pode-se obter diferentes resultados, sendo os efeitos também dependentes da concentração do fotossensibilizador e do tempo de irradiação (RIBEIRO; ZECELL, 2004). Além disso, segundo Kreisler, Al Haj e d'Hoedt (2003), o comprimento de onda do laser é decisivo, em virtude do seu efeito biológico.

Wainwright (1998) relatou que diversos fatores podem interferir na eficácia da irradiação laser como a capacidade de absorção da luz pelo microrganismo fotossensibilizado, o comprimento de onda do laser, o estado fisiológico da bactéria, a emissão do laser, o tempo de exposição, o pH do meio, a coloração da área irradiada, o conteúdo de água, a condutividade térmica e a matriz orgânica.

Uma redução completa na viabilidade de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos foi demonstrada quando do uso de diferentes fontes de radiação laser em combinação com fotossensibilizadores (HAAS et al., 1997). Placas de titânio comercialmente puro de superfície usinada, cobertas com HA ou com TPS ou ainda, com superfícies SLA, foram incubadas com uma suspensão de *A.a*, *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) ou *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*). As superfícies foram tratadas com azul de toluidina e irradiadas com laser de diodo de 905 nm de comprimento de onda. Nenhum dos esfregaços obtidos das superfícies tratadas dessa forma mostrou crescimento bacteriano, ao passo que os esfregaços obtidos das superfícies que foram sujeitas a apenas um tipo de tratamento não mostraram alteração no crescimento dessas bactérias. Este foi o primeiro estudo a demonstrar efetividade da terapia fotodinâmica na eliminação completa desses microrganismos quando aderidos tanto a superfícies lisas quanto a superfícies rugosas de implantes metálicos.

Já O'Neill, Hope e Wilson (2002) não encontraram o mesmo resultado ao procurarem determinar a suscetibilidade de biofilmes compostos por várias espécies bacterianas encontradas na cavidade oral humana à fotossensibilização letal. Utilizaram o azul de toluidina O (25 µm/ml) e laser de He-Ne (632 nm) associados ou isoladamente. Enquanto que 97,4% das bactérias foram eliminadas com a utilização do laser associado ao azul de toluidina O, apenas 26,9% das bactérias foram mortas quando somente o laser foi utilizado. O uso do azul de toluidina O isoladamente não causou morte bacteriana.

Dörtbudak et al. (2001) também não conseguiram eliminação completa de patógenos encontrados em bolsas peri-implantares usando laser e fotossensibilizadores isolados ou em associação. O estudo foi realizado em 15 pacientes com peri-implantite nos quais foi aplicado azul de toluidina O sobre a superfície dos implantes por 1 minuto antes da irradiação com laser de diodo em baixa intensidade com comprimento de onda de 690 nm por 60 s. Encontraram que o tratamento apenas com azul de toluidina O reduziu significativamente a contagem de *A.a* e *P. intermedia* em relação à contagem inicial, entretanto essa redução não foi significativa para *P.g*. Já o tratamento combinado (azul de toluidina O + laser) resultou em diminuição significativa nos 3 grupos de bactérias em relação aos demais tratamentos sem, contudo, eliminá-las completamente. Os autores afirmaram que a redução significativa de *P.intermedia* e *A.a*, mas não de *P.g* com a aplicação de azul de toluidina O sozinho não pode ser explicada pelo fato da *P. intermedia* ser pigmentada porque a *P.g* também o é. Ainda assim, a *P.intermedia* respondeu melhor ao tratamento do que o *A.a*. Segundo os autores, o que pode explicar essa diferença é o comportamento variável de diferentes membranas celulares em relação ao corante.

Já o estudo de Hayek et al. (2005) não encontrou diferença significativa entre os efeitos da terapia fotodinâmica e terapia convencional a retalho e irrigação com clorexidina em defeitos peri-implantares induzidos por ligadura em cães. Depois de aplicarem hidrocarbono-aromático-policíclico dentro das bolsas peri-implantares por 5 minutos, a superfície dos implantes foi irradiada com laser de diodo GaAlAs a 660 nm, 40 mW, 7,2 J por 3 minutos. O laser foi aplicado no modo focado de contato por varredura das superfícies durante 180 s. Amostras microbiológicas foram colhidas antes e imediatamente depois dos tratamentos, mostrando substancial redução do número de *Prevotella sp.*, *Fusobacterium sp.* e *Streptococcus beta-haemolyticus* em amostras de ambos os grupos, sem diferença entre eles.

Em concordância com todos esses achados, uma revisão de literatura realizada por Almeida et al. (2006) demonstrou que a terapia fotodinâmica é eficaz na redução bacteriana também no tratamento da periodontite, apresentando-se como um coadjuvante promissor à terapia periodontal básica.

2.4 RELAÇÃO ENTRE RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE E PERI-IMPLANTITE

2.4.1 Aderência de biofilme

Atualmente, a maioria dos implantes apresenta superfície rugosa para aumentar a área de contato entre osso e implante e a força de ancoragem no osso alveolar (KREISLER et al., 2002b). Entretanto, essa rugosidade de superfície torna mais difícil a eliminação das bactérias quando ocorre exposição ao meio bucal (KREISLER et al., 2002a), o que pode explicar a maior incidência de peri-implantite em implantes de superfície rugosa do que em lisos (PARLAR et al., 2009).

Tem sido observado que as características superficiais de implantes, como rugosidade e energia livre de superfície, interferem na adesão e crescimento bacteriano (MOMBELLI et al. 1987; MOMBELLI; MERICKSE-STERN, 1990; RAMS et al., 1991). Entretanto, parece que essa interferência ocorre apenas nas fases iniciais de deposição, antes de 48 horas, de forma que não se veem mais diferenças qualitativas na fase de maturação do biofilme (NAKAZATO et al., 1989). Esse evento foi observado por Rams et al. (1991), que acompanharam, por 7 a 10 meses, pacientes portadores de implantes lisos e com cobertura de hidroxiapatita quanto aos parâmetros clínicos periodontais clássicos e microbiologicamente, pela coleta da placa subgengival com pontas de papel. Embora não tenham sido encontradas diferenças microbiológicas entre as duas superfícies, foi observado que o aumento da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e perda óssea radiográfica marginal nos implantes recobertos por hidroxiapatita se apresentaram em maior intensidade do que nos lisos. Quirynen et al. (1993, 1994) justificaram que essas diferenças entre superfícies lisas e rugosas seriam devidas à influência da energia livre de superfície na formação da placa supragengival e subgengival. Observaram que, quando *abutments* de titânio que faziam parte de próteses fixas funcionais suportadas por implantes eram substituídos por *abutments* rugosos ou recobertos por fluoretileno-propileno (superfície lisa com baixa energia livre), ocorriam mudanças significantes nas composições da placa supragengival e subgengival. Os *abutments* recobertos por fluoretileno-propileno apresentaram mais cocos, enquanto espiroquetas ou microrganismos móveis foram encontrados ao

redor dos demais. Subgengivalmente, o número de UFCs foi 5 vezes maior nos *abutments* de titânio do que nos *abutments* de fluoretileno-propileno, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Mais tarde, Drake, Paul e Keller (1999) estudaram o comportamento de três diferentes rugosidades de superfícies (lisa, SLA e rugosa) de implantes quanto à colonização bacteriana primária por *Streptococcus sanguis*. Ao serem quantificadas as UFCs nas amostras, verificou-se que o método de esterilização, mais do que a rugosidade de superfície, interferia na colonização inicial, interferência esta, relacionada à molhabilidade produzida (hidrofilia) após a esterilização. Assim, quanto mais hidrofílicas se mostravam as superfícies, menores eram as contagens de UFCs. Como a passivação ácida das superfícies SLA aumenta a hidrofilia, neste tipo de superfície foram vistas menores quantidades de bactérias do que nas demais. Amostras esterilizadas por óxido de etileno mostraram quantidades também baixas de UFCs, independentemente da rugosidade de superfície, em parte por seu efeito microbicida residual e, em parte, por não alterar as propriedades conferidas de fábrica aos implantes. Já as amostras autoclavadas 10 vezes mostraram contagens 3 a 4 vezes mais altas do que as demais, independentemente da rugosidade superficial.

Todavia, em um estudo realizado em cães por Zitzmann et al. (2002) comparando o grau de influência da superfície lisa e da superfície tratada por condicionamento ácido na formação do biofilme microbiano, após 6 meses, não houve diferença significativa que comprovasse essa influência em relação ao tamanho, localização e composição do biofilme microbiano formado entre o pilar protético e o implante.

2.4.2. Resposta a tratamentos de descontaminação e de regeneração

Como a aderência microbiana a diferentes tipos de superfícies metálicas demonstrou que implantes rugosos podem reter microrganismos em sua estrutura, passou-se a estudar a maneira pela qual diferentes tipos de superfícies responderiam aos métodos de descontaminação.

O estudo de Haas et al. (1997), já relatado no item anterior, encontrou que a diferença de estrutura e energia de superfície dos implantes parece não ter relevância na eficiência do tratamento por fotossensibilização letal. Por outro lado, a capacidade de reosseointegração de implantes de superfície rugosa se mostrou muito maior do que a de implantes lisos no estudo de Persson et al. (2001), embora os autores tenham tratado implantes submetidos ao desenvolvimento de peri-implantite experimentalmente em cães, apenas com solução salina e antibioticoterapia sistêmica.

Entretanto, quando a fotossensibilização letal foi empregada por Shibli et al. (2006), o tipo de superfície não pareceu influenciar a reosseointegração de implantes submetidos à indução de peri-implantite em cães. Estes autores avaliaram, por métodos clínicos e histométricos, o efeito da fotossensibilização letal associada à regeneração óssea guiada (GBR) no tratamento de defeitos ao redor de implantes com 4 tipos diferentes de cobertura superficial: titânio comercialmente puro (cpTi); TPS; superfície atacada com ácido e superfície jateada. Implantes controle foram tratados por debridamento e GBR, enquanto que os implantes teste receberam terapia adicional usando laser de diodo GaAlAs, com comprimento de onda de 830 nm e potência de 50 mW por 80 s (4 J/cm^2), e fotossensibilização com azul de toluidina O (100 $\mu\text{g/ml}$). Depois de 5 meses, os implantes controle apresentaram exposição precoce da membrana enquanto que os implantes do grupo teste apresentaram um maior ganho em altura óssea. A reosseointegração variou entre 41,9% para a superfície de cpTi e 31,19% para a superfície TPS nos lados teste, sem diferença estatística entre elas. A fotossensibilização letal associada à GBR permitiu melhor reosseointegração na área adjacente aos defeitos, independentemente da superfície do implante.

Um estudo recente de Parlar et al. (2009) também não conseguiu demonstrar interferência da rugosidade de superfície de implantes na quantidade de formação óssea e reosseointegração de defeitos peri-implantares produzidos em cães após diferentes métodos de limpeza. Esses métodos incluíram limpeza com spray de solução salina isoladamente ou prévia à autoclavagem. Os autores verificaram que ambos os tipos de superfície tornaram-se passíveis de se reosseointegrar com a limpeza apenas com o spray de solução salina “*in situ*”.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi:

1) Comparar microscopicamente aos 7, 28 e 84 dias, a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos à descontaminação de implantes de titânio de superfícies lisas e rugosas com laser em baixa intensidade, terapia fotodinâmica e azul de toluidina O por meio da avaliação:

a) da área e da espessura do tecido reacional perimaterial;

b) do grau de fibrosamento e da severidade do infiltrado inflamatório no tecido reacional perimaterial;

2) Comparar superfícies lisas e rugosas entre si, quanto aos parâmetros a) e b) do item 1) e quanto aos tratamentos;

3) Comparar os efeitos dos tratamentos do item 1) entre si e em relação aos efeitos produzidos por implantes não contaminados e contaminados sem tratamento quanto aos mesmos parâmetros a) e b) do item 1).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (processo nº 121/2008) e pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (processo nº 015/2008) da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP) e seguiu os critérios para avaliação da reação tecidual a materiais de implantação preconizados pela ISO 10993-6 (1994).

4.1 IMPLANTES DE TITÂNIO

Foram empregados 150 implantes de titânio na forma de discos (DAMÉ, 2002) de 1,5 mm de espessura e 4,0 mm de diâmetro, especialmente fabricados para o experimento (Titanium Fix – AS Technology Ltda, São José dos Campos/Brasil), sendo 75 de superfícies lisas (torneadas) e 75 de superfícies rugosas (SLA), esterilizados de fábrica (Figura 6).

Figura 6 – Implantes de titânio na forma de discos, juntamente com a embalagem em que vieram de fábrica. A) Superfície lisa. B) Superfície rugosa.

Para qualificação visual das superfícies dos discos foram utilizados 2 métodos: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfilometria de contato. A MEV (LEO 435-VP – Cambridge Instruments, Inglaterra) foi realizada junto ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ – USP) pelo Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka (Figura 7).

Figura 7 – Imagens dos discos de implantação geradas pelo microscópio eletrônico de varredura. A) Superfície do disco liso. B) Superfície do disco rugoso

A perfilometria de contato (Figuras 8 e 9) foi realizada no Laboratório de Tecnologia da Usinagem (LATUS) da Faculdade de Engenharia de Bauru (FEB – UNESP) pelo Prof. Arthur Alves Fiocchi. O rugosímetro perfilômetro empregado possui apalpador com raio de ponta de 0,2 μm e resolução vertical de 16 nm (Form Talysurf Intra i60 – Taylor Hobson, Leicester/Inglaterra). A área de medição foi de 2,25 mm^2 (1,5 mm nas direções X e Y) localizada, aproximadamente, no centro dos discos.

Figura 8 – Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco liso produzida pelo perfilômetro de contato. X e Y representam os comprimentos da região analisada e Z a distância máxima entre picos e vales. A escala indica a variação de profundidade do ponto mais profundo (vale, $Z = 0$) ao mais alto (pico, $Z = 20 \mu\text{m}$)

Figura 9 – Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco rugoso produzida pelo perfilômetro de contato. X e Y representam os comprimentos da região analisada e Z a distância máxima entre picos e vales. A escala indica a variação de profundidade do ponto mais profundo (vale, Z = 0) ao mais alto (pico, Z = 16,3 μm)

4.2 CONTAMINAÇÃO DOS IMPLANTES

Trinta dos 150 discos foram mantidos esterilizados de fábrica e, em todas as superfícies dos demais 120 discos, foi permitido o crescimento de um biofilme microbiano segundo metodologia adaptada de Furlani (2007).

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), 15 voluntários periodontalmente saudáveis e livres de qualquer doença sistêmica usaram, por 7 dias consecutivos, dispositivos acrílicos palatinos intrabuciais removíveis contendo 8 discos cada um, sendo 4 de superfície lisa do lado direito e 4 de superfície rugosa do lado esquerdo (Figura 10).

Figura 10 – Diagrama representativo da distribuição dos discos de titânio no dispositivo acrílico palatino removível

Os discos foram inseridos no dispositivo acrílico, com o auxílio de uma pinça de titânio (Nobel Biocare, São Paulo, Brasil), em nichos nele produzidos empregando como molde a ponta cilíndrica de uma pedra para resina. Os discos foram mantidos em posição dentro dos nichos, pela fixação de uma tela de *nylon* (Tela Fix – Ciplás, Rio de Janeiro/Brasil) com cianoacrilato (Super Bonder – Henkel, Itapevi/Brasil), cujas bordas foram finalizadas com a aplicação de resina composta fotopolimerizável (Filtek Z250 – 3M do Brasil, Sumaré/Brasil) para evitar incômodo aos voluntários (Figura 11).

Figura 11 – Sequência de confecção do dispositivo acrílico palatino. A) Dispositivo acrílico intrabucal ainda sem os discos. B) Fixação parcial da tela com cianoacrilato. C) Colocação dos discos nos nichos. D) Tela completamente fixada. E) Aspecto final após acabamento com resina composta

Os voluntários foram instruídos a remover os dispositivos acrílicos apenas durante as refeições e para realização da higiene bucal. Foram orientados a não fazerem qualquer tipo de limpeza da tela ou dos discos, inclusive por meio de jatos de água. Apenas foi permitida a higiene da região do dispositivo que ficava em contato com o palato.

4.3 DESCONTAMINAÇÃO DOS IMPLANTES

Transcorridos 7 dias, as telas foram removidas e, dos 120 discos que foram contaminados, 30 (pertencentes ao grupo controle positivo) foram imediatamente transferidos com pinça de titânio para ampolas de vidro estéreis vedadas. Os demais 90 discos foram escovados com escova dental macia (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Paulo/Brasil) e soro fisiológico estéril, empregando 5 movimentos de escovação em cada superfície dos discos. Em seguida, também foram armazenados em ampolas de vidro estéreis fechadas até o momento da descontaminação (Figura 12).

Figura 12 – Sequência de remoção dos discos dos dispositivos acrílicos palatinos. A) Corte da tela com tesoura. B) Discos após remoção do dispositivo: nota-se presença de placa bacteriana visível. C) Limpeza com escova dental macia e soro fisiológico estéril realizada em 90 discos. D) Armazenamento do disco em ampola de vidro estéril

Após o procedimento acima, os discos foram vertidos diretamente das ampolas para placas acrílicas para cultura de células de 24 poços (Biosystems, Curitiba/Brasil) sem qualquer outro tipo de contato, de modo que cada poço recebeu um único disco. Neste momento, os discos foram divididos em 5 grupos de 30 discos cada um (15 lisos e 15 rugosos), de acordo com a forma de tratamento da superfície, conforme a seguir.

4.3.1 Tratamento com laser em baixa intensidade: grupo LBI

Foi utilizado o laser Thera Lase[®] (D.M.C. Equipamentos Ltda, São Carlos/Brasil), que apresenta as seguintes características: emissores InGaAlP (laser vermelho) 630 a 690 nm e GaAlAs (laser infravermelho) 790 a 830 nm de comprimento de onda, potência útil do emissor de 100 mW, emissão contínua e pulsada com diâmetro de fibra ótica de 600 μ m (Figura 13).

Figura 13 – Equipamento de laser utilizado

Antes da realização dos tratamentos foi feita a calibração da fibra ótica, garantindo a fidelidade do protocolo estabelecido.

Os discos pertencentes a este grupo de tratamento receberam irradiação de acordo com o protocolo apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Protocolo utilizado para descontaminação com laser em baixa intensidade

Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Fluência (J/cm ²)	Modo de emissão	Modo de aplicação	Tempo de exposição (s)	Área (cm ²)
660 (vermelho)	30	45	Contínuo	Varredura	30	0,126

Cada disco deste grupo recebeu a irradiação durante 30 s, sendo 10 s de varredura no sentido horizontal, 10 s de varredura no sentido vertical e 10 s de varredura no sentido oblíquo de um dos lados do disco (Figura 14), com o laser perpendicular à superfície do disco e de modo a formar um único ponto (Figura 15).

Figura 14 – Diagrama representativo dos sentidos da irradiação. A) Irradiação horizontal. B) Irradiação vertical. C) Irradiação oblíqua

Figura 15 – Descontaminação da superfície de um disco do grupo LBI de modo a formar um único ponto

Em seguida, os discos foram virados do lado oposto, ainda não tratado, presos pelas bordas laterais com o auxílio de uma pinça de titânio, sobre uma superfície estéril do mesmo poço e todo o protocolo de irradiação foi novamente realizado. Após este procedimento, os discos foram colocados dentro de outras ampolas de vidro estéreis mantidas vedadas até o momento de sua implantação em subcutâneo de ratos.

4.3.2 Tratamento com terapia fotodinâmica: grupo PDT

Inicialmente, por meio de uma pipeta automática, foi depositado 1 ml da solução de azul de toluidina O (Sigma-Aldrich – Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo/Brasil), na concentração de 100 µg/ml, em cada poço da placa acrílica a receber os 30 discos deste grupo. Os discos foram, então, imersos nessa solução durante 60 s. Após esse tempo, os discos foram apreendidos pelas laterais com uma pinça de titânio e tratados com o mesmo protocolo de irradiação a laser utilizado no grupo LBI. Em seguida, os discos foram armazenados em ampolas estéreis vedadas até o momento da implantação no subcutâneo dos animais (Figura 16).

Figura 16 – Sequência de tratamento para o grupo PDT. A) Deposição solução azul de toluidina O nos poços com uso de pipeta automática. B) Introdução dos discos nos poços. C) Imersão dos discos na solução azul de toluidina O por 60 s. D) Apreensão dos discos para irradiação. E) Discos sendo irradiados. F) Armazenamento na ampola estéril

4.3.3 Tratamento com azul de toluidina O: grupo TBO

Para o tratamento somente com azul de toluidina O, foi depositado 1 ml da solução de azul de toluidina O nos poços, na qual os 30 discos pertencentes a este grupo foram mergulhados por 60 s. Em seguida, foram retirados da solução e armazenados nas ampolas estéreis vedadas até o momento da implantação no subcutâneo dos animais (Figura 17).

Figura 17 – Tratamento dado ao grupo TBO. A) Poços contendo 1 ml da solução de azul de toluidina O. B) Imersão dos discos na solução de azul de toluidina O

Em resumo, os 150 discos de titânio deste estudo foram distribuídos nos grupos experimentais da seguinte forma:

Grupo NC_L: 15 discos de superfície lisa que não foram contaminados (controle negativo liso);

Grupo NC_R: 15 discos de superfície rugosa que não foram contaminados (controle negativo rugoso);

Grupo C_L: 15 discos de superfície lisa que não receberam descontaminação (controle positivo liso);

Grupo C_R: 15 discos de superfície rugosa que não receberam descontaminação (controle positivo rugoso);

Grupo LBI_L: 15 discos de superfície lisa que receberam o tratamento com laser em baixa intensidade;

Grupo LBI_R: 15 discos de superfície rugosa que receberam o tratamento com laser em baixa intensidade;

Grupo PDT_L: 15 discos de superfície lisa que receberam o tratamento por terapia fotodinâmica;

Grupo PDT_R: 15 discos de superfície rugosa que receberam o tratamento por terapia fotodinâmica;

Grupo TBO_L: 15 discos de superfície lisa que receberam o tratamento com azul de toluidina O;

Grupo TBO_R: 15 discos de superfície rugosa que receberam o tratamento com azul de toluidina O.

4.4 CIRURGIA DE IMPLANTAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO EM TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Foram empregados 150 ratos isogênicos adultos machos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando cerca de 400 g, criados e mantidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP). Os animais foram separados em caixas plásticas (5 animais por caixa) e permaneceram em uma sala com temperatura e umidade constantes (21°C e 72%, respectivamente).

Os animais foram anestesiados na porção interna da coxa direita traseira por injeção intramuscular de 0,3 ml de uma associação de 3 ml de cloridrato de xilazina (Anasedan – Vetbrands, Jacareí/Brasil) com 10 ml de cloridrato de ketamina (Dopalen – Vetbrands, Jacareí/Brasil), utilizando seringa de insulina. Após a tricotomia da região dorsal dos animais, realizada com lâmina de barbear (Gillette – P&G do Brasil, São Paulo/Brasil), a pele recebeu antissepsia com solução de digluconato de clorexidina a 2% (Riohex – Rioquímica Indústria Farmacêutica, São Paulo/Brasil) e a região foi coberta por campo cirúrgico estéril fenestrado. Uma incisão de aproximadamente 1 cm foi realizada com lâmina de bisturi número 15 (Free-Bac – EMBRAMAC, Itapira/ Brasil) no dorso dos animais. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica de ponta romba (Quinelato – Schobell Industrial Ltda, Rio Claro/Brasil) foi produzido, por divulsão do tecido conjuntivo subcutâneo, envelopes, no sentido crânio-caudal, nos quais foram inseridos os discos metálicos. Assim,

cada animal recebeu um único disco no intuito de evitar interferência de um grupo experimental sobre o outro. Foi realizada sutura com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson&Johnson, SãoPaulo/Brasil), removida após 7 dias. Aos animais foram oferecidas água e alimentação *ad libitum* de dieta apropriada (Labina – Purina do Brasil, Paulínia/Brasil). A Figura 18 ilustra as etapas cirúrgicas descritas.

Figura 18 – Sequência cirúrgica da implantação dos discos no tecido subcutâneo dos ratos. A) Dorso do animal após tricotomia. B) Incisão com lâmina de bisturi nº 15. C) Divulsão com tesoura de ponta romba para a criação do envelope. D) Disco inserido no subcutâneo do animal. E) Sutura da pele com fio de seda 4.0

Após os períodos de 7, 28 e 84 dias, 5 animais de cada grupo foram mortos por overdose de anestésico para remoção das biópsias (Figura 19).

Os espécimes foram removidos em blocos quadrangulares de tecido contendo o disco e, imediatamente fixados em solução aquosa de formaldeído a 10% ou formalina (Synth – LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema/Brasil) por, no mínimo, 12 horas em potes plásticos devidamente identificados.

Figura 19 – Delineamento esquemático da distribuição dos grupos de acordo com os períodos experimentais

4.5 MACROSCOPIA

Os espécimes foram retirados da formalina e os discos localizados visualmente. Na porção interna da peça, os tecidos foram cortados com navalha (Leica 818 – Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch/Alemanha) no centro da reação tecidual induzida pelo disco, dividindo o bloco em duas partes. Os discos foram removidos com o auxílio de uma pinça clínica (Duflex – SS White, Rio de Janeiro/Brasil) e o corte foi terminado até separar totalmente as metades. Uma delas foi empregada para o estudo (doravante denominada espécime) e a outra foi armazenada. Em seguida, cada espécime foi colocado em um cassete de plástico identificado e enviado para processamento histotécnico. (Figura 20).

Figura 20 – Macroscopia. A) Bloco tecidual onde se percebe visualmente a posição do disco. B) Corte central na área da reação tecidual induzida com exposição do disco. C) Aspecto do tecido após remoção do disco. D) Aspecto final do espécime após remoção dos excessos

Após a realização da macroscopia, os espécimes foram submetidos ao processamento histotécnico convencional para microscopia óptica e coloração por hematoxilina-eosina (HE) no laboratório da Disciplina de Patologia do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), onde foram obtidos cortes semi-seriados de 4,0 μm de espessura.

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A análise microscópica descritiva foi realizada por um patologista experiente empregando microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Nova York/Estados Unidos) nos aumentos de 2, 4, 10, 20 e 40X. Em seguida, foram efetuadas as análises semiquantitativa pelo mesmo profissional (índice Kappa = 0,99) e quantitativa pela pesquisadora (índice Kappa = 0,99), conforme descrição abaixo (QUEIROZ, 2008).

4.6.1 Análise microscópica descritiva

Foi descrita a reação tecidual observada frente aos grupos nos diferentes períodos experimentais, caracterizando o grupo analisado como um todo.

4.6.2 Análise microscópica semiquantitativa

Nesta análise da reação do tecido periférico aos discos foram atribuídos escores aos fenômenos referentes ao grau de fibrosamento e severidade do infiltrado inflamatório neutrofílico, seguindo os critérios abaixo discriminados.

4.6.2.1 Grau de fibrosamento

Foram levadas em consideração a quantidade e a densidade de fibras colágenas de permeio às células periféricas localizadas no tecido reacional circunjacente aos discos de titânio. O fibrosamento foi classificado em quatro graus, de acordo com os seguintes escores:

- Escore 0: ausência de fibrosamento;
- Escore 1 (fibrosamento discreto): fibras colágenas individualizadas tal qual em um tecido conjuntivo normal, entremeadas por espaços negativos indicativos de componentes não fibrosos de matriz extracelular;
- Escore 2 (fibrosamento moderado): fibras colágenas individualizadas, mas com áreas alternadas de matriz extracelular eosinofílica sem as formações lineares e onduladas típicas das mesmas;

- Escore 3 (fibrosamento intenso): fibras colágenas em meio a matriz extracelular eosinofílica, sem formações lineares e onduladas típicas, não permitindo sua individualização.

4.6.2.2 Severidade do infiltrado inflamatório

Foi avaliada a concentração de neutrófilos polimorfonucleares de permeio ao tecido reacional ao redor dos discos. Esta concentração foi classificada em quatro graus, de acordo com os seguintes escores:

- Escore 0: ausência de infiltrado inflamatório;
- Escore 1 (infiltrado inflamatório discreto): 5 a 50 neutrófilos no tecido reacional;
- Escore 2 (infiltrado inflamatório moderado): 51 a 100 neutrófilos no tecido reacional;
- Escore 3 (infiltrado inflamatório intenso): mais de 100 neutrófilos no tecido reacional.

4.6.3 Análise microscópica quantitativa

Os cortes teciduais foram fotografados com câmera digital MicroPublisher 3.3 RTV (Q Imaging, Canadá) e as imagens foram transferidas para um computador. As imagens foram analisadas pelo programa analisador de imagens de domínio público Image J 1.38x (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>). Foi medida a área (μm^2) e a espessura média (μm) do tecido reacional perimaterial relacionado à superfície de interesse (lisa ou rugosa que recebeu ou não a contaminação e o tratamento), em cada espécime dos

diferentes grupos. Para efeito de comparação foram considerados os valores médios obtidos para cada grupo.

4.6.3.1 Cálculo da área

A área (A) do tecido reacional perimaterial foi obtida subtraindo-se a área interna (A_i) da área externa (A_e), conforme a seguinte equação: $A = A_e - A_i$ (Figura 21).

Figura 21 – Identificação da área do tecido reacional perimaterial. Traços em verde: delimitação de A correspondente ao espaço entre a linha da A_e (1) e a linha da A_i (2)

4.6.3.2 Cálculo da espessura

O cálculo da espessura (E) do tecido reacional perimaterial de cada espécime foi obtido pela média dos valores tomados em 4 regiões distintas,

equivalentes às direções norte (N), sul (S), leste (L) e oeste (O), conforme a seguinte fórmula: $E = \frac{N+S+L+O}{4}$ (Figura 22).

Figura 22 – Identificação da espessura do tecido reacional perimaterial. Traços em verde: espessura correspondente ao espaço entre a linha da Ae (1) e a linha da Ai (2) nas direções N (3), S (4), L (5) e O (6)

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo da área e da espessura do tecido reacional perimaterial foram realizados 3 traçados em cada espécime e a média destes valores foi utilizada para a análise estatística. O coeficiente de correlação intraclasse (ITC) foi feito para verificação da credibilidade dos resultados e, tanto para área quanto para espessura, teve valor igual a 0,99.

4.7.1 Análise estatística dos dados semiquantitativos

As análises dos fenômenos grau de fibrosamento e severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial foram efetuadas pelo teste

Mann-Whitney para a comparação dos tipos de superfícies (lisa e rugosa) e pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para a comparação entre os tratamentos e entre os tempos experimentais. O nível de significância adotado foi de 5% (p).

4.7.2 Análise estatística dos dados quantitativos

Os parâmetros área e média da espessura do tecido reacional perimaterial foram comparados pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% (p).

Resultados

5 RESULTADOS

Dos 150 discos de titânio utilizados, apenas 6 não puderam ser incluídos nas análises microscópica e estatística. Esses discos pertenciam aos seguintes grupos: 2 do grupo C_L e 2 do grupo C_R ambos de 84 dias; 1 disco do grupo C_R de 28 dias e 1 disco do grupo LBI_R de 28 dias. A razão que impossibilitou o aproveitamento desses espécimes foi que, no momento da coleta das biópsias, os discos não foram encontrados, provavelmente por terem sido expelidos pela abertura da incisão devido à severidade da inflamação verificada nos primeiros dias de pós-operatório desses animais, principalmente os que portavam discos contaminados sem tratamento. Os demais animais tiveram pós-operatório sem qualquer intercorrência.

5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

5.1.1 Grupo não contaminado liso: NC_L

Aos 7 dias pós-cirúrgicos, a reação perimaterial caracterizou-se pelo acúmulo de macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMIs) com 4 a 5 núcleos diretamente sobre a superfície dos discos teste. Junto a esses macrófagos e mais periféricamente, o tecido reacional apresentou-se constituído por muitos fibroblastos jovens e feixes colágenos bem definidos. Permeando os espaços intercelulares, notaram-se vasos neoformados e congestos. De permeio, notou-se presença de moderado infiltrado neutrofílico. Mais periféricamente, os fibroblastos e as fibras colágenas estiveram mais organizados e se distinguiram do tecido conjuntivo subcutâneo mais frouxo. Destacou-se a ausência de focos de abscedecção (Figura 23).

Figura 23 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se nota a presença de vasos neoformados e congestos (elipse tracejada). **C)** Destaque em roxo de **B** em que se observam fibras colágenas organizadas (setas) distinguindo-se do tecido conjuntivo frouxo. **D)** Destaque em verde de **C** contendo moderado infiltrado neutrofílico (**N**). **E)** Destaque em azul de **D** com a presença de fibroblastos (f) e fibras colágenas (c). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

No período experimental de 28 dias, o grau de fibrosamento no tecido reacional perimaterial foi maior, apresentando áreas de hialinização. Os fibroblastos presentes estavam com núcleos ligeiramente menores e mais condensados em sua cromatina. Os vasos neoformados eram poucos e periféricos. Na interface com a superfície do material, notou-se também a presença de macrófagos, mas em menor número, com poucas CGMIs. Os neutrófilos presentes estavam esparsos e aleatoriamente distribuídos (Figura 24).

Figura 24 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em roxo de **A** onde se nota menor espessura do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em verde de **B** em que se observa área de hialinização (setas). **D)** Destaque em azul de **C** com a presença de fibroblastos (f) e macrófagos (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Aos 84 dias, a reação tecidual perimaterial limitou-se a uma pequena e estreita faixa densamente colagenizada, com áreas hialinas, revelando fibroblastos maduros em função de seus núcleos estreitos, longilíneos e basofílicos. Os vasos neoformados que persistiram eram raros e os neutrófilos, quando presentes, estavam muito esparsos e aleatoriamente distribuídos. Na interface com o material, ou seja, na superfície interna do tecido reacional, os macrófagos presentes estavam desorganizados, sem denotar CGMIs (Figura 25).

Figura 25 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** onde se nota pequena e estreita faixa densamente colagenizada (setas). **C)** Destaque em azul de **B** em que se observa a presença de fibroblastos (f) e macrófago (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.2 Grupo não contaminado rugoso: NC_R

A organização geral e a espessura do tecido reacional ao redor do material, aos 7 dias, apresentaram-se de forma muito semelhante ao grupo não contaminado de superfície lisa aos 7 dias. Os fibroblastos, no meio das fibras colágenas bem definidas e organizadas, eram jovens, com núcleos esféricos e cromatina frouxa. Os vasos neoformados estavam evidentes e congestionados. Os neutrófilos, em grau moderado quanto a sua presença, infiltravam-se aleatoriamente e difusamente no tecido reacional. Na interface do material com o tecido reacional, havia muitos macrófagos e CGMIs com 5 a 10 núcleos (Figura 26).

Figura 26 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em roxo de **A** onde se nota a presença de vaso neoformado e congestionado (círculo tracejado) **C)** Destaque em verde de **B** com a presença de fibroblastos (f), fibras colágenas bem definidas (c) e célula gigante multinucleada inflamatória (elipse tracejada). **D)** Destaque em azul de **A** contendo macrófagos (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

No período experimental de 28 dias, a presença de neutrófilos ainda era marcante. No tecido reacional, as fibras colágenas estavam numerosas e bem organizadas e, apenas em alguns espécimes (dois), notaram-se áreas de hialinização. Na interface material/tecido reacional, os macrófagos ainda eram exuberantes e as CGMIs eventuais (Figura 27).

Figura 27 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** onde se nota a presença de fibras colágenas organizadas (setas). **C)** Destaque em azul de **B** em que se observam macrófagos (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Aos 84 dias, a organização e a espessura do tecido reacional perimaterial foram semelhantes ao mesmo período experimental do grupo controle negativo com superfície lisa. As fibras colágenas estavam bem organizadas, os fibroblastos maduros e notavam-se áreas de hialinização. Os neutrófilos infiltrados ainda estavam numericamente importantes, mas sem observação de áreas de abscedação. Os neutrófilos encontravam-se aleatoriamente distribuídos. Na interface com o material, os macrófagos estavam esparsos e não se observaram CGMIs (Figura 28).

Figura 28 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo NC_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A**. **C)** Destaque em roxo de **B** contendo fibras colágenas organizadas (setas). **D)** Destaque em azul de **C** com a presença de fibroblastos (f). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.3 Grupo contaminado liso: C_L

Na interface do material com o tecido reacional, aos 7 dias, observou-se exuberante quantidade de neutrófilos predominantemente íntegros, mas também era grande a quantidade de neutrófilos fragmentados. Entre os neutrófilos, observou-se material eosinofílico correspondente ao conteúdo proteico coagulado do exsudato purulento. Entre os neutrófilos mais distantes da superfície do material, observou-se grande quantidade de macrófagos contendo, no seu interior, restos celulares e micropartículas que lhes davam um aspecto espumoso ou pseudochantomatoso. Circundando esse acúmulo desorganizado de neutrófilos e macrófagos, o tecido reacional caracterizava-se pela proliferação angioblástica e fibroblástica permeadas pela distribuição aleatória de neutrófilos e macrófagos distribuídos difusamente. A espessura do material correspondia a 5 ou 6 vezes mais que a observada no mesmo período experimental do grupo controle negativo. Do ponto de vista morfológico, o quadro microscópico observado é de um abscesso exuberante e espessa membrana piogênica no tecido subcutâneo (Figura 29).

Figura 29 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte em fotomontagem. **B)** Destaque em verde de **A** em que se observa a presença de membrana piogênica (MP), formada por neutrófilos (N) e tecido de granulação (TG) circunscrevendo a coleção purulenta (pus). **C)** Destaque em azul de **B** contendo macrófagos com aspecto espumoso (MO). **D)** Destaque em rosa de **A** com a presença de neutrófilos (N) e exsudato purulento (círculos). (TC = tecido conjuntivo; M = músculo; Ti = local onde estava inserido o disco de titânio). (HE)

Com 28 dias, o tecido reacional perimaterial revelou-se constituído por tecido conjuntivo capsular rico em fibras colágenas bem definidas e fibroblastos bem organizados, ora maduros, ora jovens. A espessura do tecido reacional era fina e comparável ao mesmo período experimental do grupo controle negativo. Os neutrófilos estavam presentes de forma difusa, aleatória e em pequeno número. Na interface com o material, os macrófagos dispunham-se em paliçada grosseira e eram raras as CGMIs. Na periferia do tecido reacional, observaram-se concentrações pequenas de macrófagos com hemossiderina no seu interior, caracterizando a hemossiderose focal, um evento típico de áreas hemorrágicas focais antigas. Os vasos neoformados estavam presentes e congestos, mas em número comparável ao do grupo controle negativo no mesmo período experimental (Figura 30).

Figura 30 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se nota a fina espessura do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em roxo de **B** contendo fibras colágenas bem definidas (setas). **D)** Destaque em verde de **C** contendo macrófagos (destaque em preto) e fibroblastos (f). **E)** Destaque em azul onde se notam macrófagos com hemossiderina em seu interior (MO) **F)** Destaque em rosa de **A** em que se observa a presença de hemossiderose focal (círculo tracejado). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo; Ti = local onde estava inserido o disco de titânio). (HE)

Aos 84 dias, o tecido perimaterial caracterizou-se por fibrosamento com áreas hialinas e discreto infiltrado inflamatório, caracterizado por células esparsas distribuídas aleatoriamente. Os macrófagos, na interface com o material, apresentavam-se dispostos em grosseira paliçada e as CGMIs eram eventuais. Os vasos neoformados estavam presentes de forma muito discreta e na periferia do tecido reacional (Figura 31).

Figura 31 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** onde se nota a presença de fibras colágenas (c) e fibroblastos (f). **C)** Destaque em azul de **B** em que se observam os macrófagos em paliçada grosseira (setas). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.4 Grupo contaminado rugoso: C_R

Aos 7 dias, o grupo controle positivo com superfície rugosa apresentou-se com as mesmas características morfológicas do grupo controle positivo com superfície lisa. A descrição dessas características está na página 114 (Figura 32).

Figura 32 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se nota a espessura do tecido (seta dupla). **C)** Destaque em roxo de **B** em que se observa a membrana piogênica (MP). **D)** Destaque em azul de **C** contendo macrófagos com aspecto espumoso (MO), neutrófilos (N) e exsudato purulento (círculo). (TC = tecido conjuntivo; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

O tecido reacional perimaterial, no período de 28 dias, caracterizou-se por fibras colágenas bem constituídas e, em dois espécimes, com pequenas áreas hialinas. Os fibroblastos eram predominantemente jovens, mas havia alguns de morfologia madura. Os neutrófilos presentes estavam aleatoriamente distribuídos, sem focos de abscedecção. Vasos neoformados estavam presentes e congestionados, principalmente na periferia do tecido reacional. Notou-se, também, a presença de hemossiderose focal, caracterizada por macrófagos carregados de hemossiderina. Na interface com o material, os macrófagos se dispunham desorganizadamente e as CGMIs estavam escassamente presentes (Figura 33).

Figura 33 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em roxo de **A** em que se observam vasos neoformados e congestionados (círculo tracejado). **C)** Destaque em verde de **B** onde se nota a presença de fibras colágenas (setas), fibroblastos (f), hemossiderose focal (elipse tracejada) e macrófagos com hemossiderina em seu interior (MO). **D)** Destaque em azul de **B** contendo macrófagos (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava inserido o disco de titânio). (HE)

Aos 84 dias, em dois espécimes, o tecido reacional capsular apresentou espessura fina e organização delicada caracterizada por fibras colágenas bem definidas e organizadas, permeadas eventualmente por neutrófilos difusamente distribuídos. Algumas pequenas áreas de hemossiderose focal ainda puderam ser vistas. Na interface com o material, os macrófagos apresentavam-se em grosseira paliçada e não se observou CGMIs (Figura 34).

Figura 34 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo C_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se observa a fina espessura do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em verde de **B** contendo fibras colágenas organizadas e bem definidas (setas). **D)** Destaque em azul de **C** com a presença de macrófagos (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Neste grupo, em um dos espécimes a reação inflamatória aguda purulenta foi tão exuberante que o abscesso formado era muito maior do que os observados aos 7 dias (Figura 35).

Figura 35 – Espécime do grupo C_R de 84 dias em uma visão panorâmica em fotomontagem do corte onde podem ser identificados: área do abscesso (AB), epitélio estratificado pavimentoso (EP), tecido conjuntivo (TC) e local onde estava implantado o disco de titânio (Ti). (HE)

5.1.5 Grupo tratado com laser em baixa intensidade liso: LBI_L

Aos 7 dias, observou-se a presença de um abscesso caracterizado por muitos neutrófilos e rico exsudato purulento e fibrinoso por entre a grande concentração de neutrófilos. De permeio aos neutrófilos estavam presentes muitos macrófagos, especialmente os espumosos ou pseudochantomatosos. O tecido reacional perimaterial revelou exuberante proliferação angioblástica e fibroblástica, permeadas por grande número de neutrófilos. O fibrosamento era muito discreto e a espessura do tecido reacional era menor do que a observada no grupo controle positivo. De modo geral, morfológicamente pôde-se inferir que a reação tecidual neste grupo, embora exsudativa purulenta, foi menor que a do grupo controle positivo no mesmo período experimental. Em um dos espécimes, a abscedecção não estava presente (Figura 36).

Figura 36 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** evidenciando a espessura do tecido (seta duplas). **C)** Destaque em verde de **B** com fibrosamento discreto (setas). **D)** Destaque em azul de **B** contendo macrófagos espumosos (MO), neutrófilos (**N**) e exsudatos purulento (círculo) e fibrinoso (círculo tracejado). (TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

O tecido reacional perimaterial, aos 28 dias, revelou-se com fibrosamento intenso, fibroblastos predominantemente jovens permeados por neutrófilos distribuídos aleatoriamente sem evidência de abscedação. Na interface com o material, notaram-se macrófagos em paliçada e eventuais CGMIs pequenas. Na periferia do tecido perirreacional, notaram-se áreas de hemossiderose focal (Figura 37).

Figura 37 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em roxo de **A** onde se nota a presença de fibras colágenas (setas). **C)** Destaque em verde de **B** em que se observa hemossiderose focal (destaque em preto tracejado). **D)** Destaque em azul de **C** contendo macrófagos em paliçada (setas) e macrófagos com hemossiderina em seu interior (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Aos 84 dias, a espessura do tecido reacional perimaterial apresentou-se muito fina e as fibras colágenas bem definidas, com fibroblastos maduros de permeio. Os neutrófilos apresentaram-se esparsos e aleatórios. Os macrófagos na interface apresentavam-se discretamente dispostos em grosseira paliçada. As CGMIs foram raramente observadas (Figura 38).

Figura 38 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBL em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em roxo de **A** em que se observa a fina espessura do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em verde de **B** onde se nota a presença de fibras colágenas bem definidas (setas). **D)** Destaque em azul de **C** contendo fibroblastos (f). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.6 Grupo tratado com laser em baixa intensidade rugoso: LBI_R

Do ponto de vista morfológico, a reação tecidual com 7 dias foi a mesma observada no grupo LBI_L aos 7 dias. Em todos os espécimes encontrou-se abscedação (Figura 39).

Figura 39 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** em que se observa a espessura do tecido (seta dupla). **C)** Destaque em roxo de **B** com membrana piogênica (MP). **D)** Destaque em verde de **C** onde se nota a presença de neutrófilos (**N**) e tecido de granulação (**TG**). **E)** Destaque em azul de **D** contendo macrófagos espumosos (MO), neutrófilos (**N**) e exsudato purulento (círculo). (TC = tecido conjuntivo; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

As mesmas características descritivas do grupo LBI_L aos 28 dias (Figura 40) e 84 dias (Figura 41) foram observadas no grupo LBI_R nos mesmos períodos, respectivamente.

Figura 40 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se nota uma área de hemorragia causada por trauma (elipse tracejada). **C)** Destaque em verde de **B** (porção esquerda) em que se observa presença de fibrosamento intenso (setas). **D)** Destaque em verde de **B** (porção direita) contendo macrófagos em paliçada (setas). **E)** Destaque em azul de **C** com a presença de macrófagos (MO) e neutrófilos (N). **F)** Destaque em rosa de **D** contendo neutrófilos (N) e hemácias em meio ao exsudato (H). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Figura 41 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo LBI_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** em que se observa a fina espessura do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em azul de **B** onde se nota a presença de fibras colágenas bem definidas (setas). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.7 Grupo tratado com terapia fotodinâmica liso: PDT_L

A reação tecidual observada com 7 dias promoveu uma inflamação aguda purulenta localizada do tipo abscesso, tal qual aconteceu no grupo controle positivo e no grupo experimental com laser em baixa intensidade no mesmo período experimental. Neste grupo experimental, no entanto, a quantidade de neutrófilos acumulados e de exsudato purulento foi bem menor. Os neutrófilos fragmentados e o exsudato purulento estavam muito reduzidos em relação ao grupo controle positivo e mesmo em relação ao grupo laser em baixa intensidade. O exsudato fibrinoso, aqui se destacou. Circundando o acúmulo de neutrófilos e de exsudato, o tecido reacional apresentou-se com exuberante proliferação angioblástica e fibroblástica, permeadas por grande número de neutrófilos e macrófagos difusamente distribuídos (Figura 42).

Figura 42 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** onde se nota a presença de neutrófilos (**N**) e exsudato fibrinoso (círculo tracejado). **C)** Destaque em azul de **B** em se observam neutrófilos (**N**), macrófagos (**MO**) e exsudato fibrinoso (círculo tracejado). (TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Aos 28 dias, o fibrosamento era avançado e a presença de neutrófilos discreta e difusamente distribuída, sem áreas de abscedação. Na interface com o material, os macrófagos apresentavam-se esparsos e distribuídos em paliçada grosseira e com eventuais CGMIs. Em apenas um dos espécimes, notaram-se focos de hemossiderose focal (Figura 43).

Figura 43 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** em que se observa um fibrosamento avançado (setas) e macrófagos com hemossiderina em seu interior (MO). **C)** Destaque em azul de **B** contendo fibroblastos (f) e célula gigante multinucleada inflamatória (elipse tracejada). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

No período experimental de 84 dias, a espessura do tecido reacional perimaterial era fina e o fibrosamento intenso. Os neutrófilos estavam aleatoriamente distribuídos sem abscedação. Os macrófagos, na interface, estavam dispostos grosseiramente com poucas CGMIs (Figura 44).

Figura 44 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se nota a espessura fina do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em verde de **B** contendo macrófagos com hemossiderina em seu interior (MO). **D)** Destaque em azul de **C** em que se observa fibrosamento intenso (setas). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.8 Grupo tratado com terapia fotodinâmica rugoso: PDT_R

No período experimental de 7 dias, este grupo apresentou-se com características morfológicas semelhantes ao do grupo com superfície lisa e submetido à mesma terapia. Destacou-se apenas um espécime com maior acúmulo de exsudato purulento e de macrófagos espumosos ou pseudochantomatosos (Figura 45).

Figura 45 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** onde se nota a presença de neutrófilos (**N**). **C)** Destaque em azul de **B** em se observam neutrófilos (**N**), macrófagos (**MO**) e exsudato fibrinoso (círculo tracejado). (TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Nos períodos experimentais de 28 dias (Figura 46) e 84 dias (Figura 47), observaram-se as mesmas características descritas no grupo PDT_L destacando que, aos 28 dias, encontraram-se áreas de hemossiderose focal nos espécimes.

Figura 46 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** em que se observa um fibrosamento avançado (setas) e regiões de hemossiderose focal (elipses tracejadas). **C)** Destaque em azul de **B** contendo macrófagos com hemossiderina em seu interior. (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Figura 47 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo PDT_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** se onde nota a espessura fina do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em verde de **B** em que se observa a presença de célula gigante multinucleada inflamatória (elipse tracejada). **D)** Destaque em amarelo de **B** contendo fibrosamento avançado (setas). **E)** Destaque em azul de **D** em que se observam macrófagos (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.9 Grupo tratado com azul de toluidina O liso: TBO_L

Neste grupo experimental, aos 7 dias, a reação tecidual perimaterial foi morfológicamente semelhante ao do grupo de terapia fotodinâmica. Embora os parâmetros morfológicos utilizados não permitissem diferenciação descritiva pôde-se observar quantidade de neutrófilos e de exsudato purulento menores neste grupo. No entanto, deve-se destacar que a reação continuava a ser uma inflamação aguda purulenta localizada do tipo abscesso (Figura 48).

Figura 48 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em roxo de **A** onde se nota a presença de proliferação angioblástica (elipses tracejadas). **C)** Destaque em azul de **B** em que se observam neutrófilos (**N**) e macrófagos (MO). (TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

As mesmas características do grupo tratado com terapia fotodinâmica foram observadas nos períodos experimentais de 28 dias (Figura 49) e 84 dias (Figura 50), respectivamente.

Figura 49 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** em que se observa um fibrosamento avançado (setas). **C)** Destaque em azul de **B** contendo macrófagos em paliçada grosseira (setas). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; M = músculo esquelético; TC = tecido conjuntivo; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Figura 50 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO_L em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em roxo de **A** onde se nota a espessura fina do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em verde de **B** em que se observa fibrosamento intenso (setas). **D)** Destaque em azul de **C** contendo fibras colágenas (c). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.1.10 Grupo rugoso tratado com azul de toluidina O: TBO_R

Muito embora, neste grupo a reação tenha sido a mesma do grupo TBO_L, a ponto de permitir a mesma descrição morfológica, percebeu-se que na superfície rugosa no período experimental de 7 dias, houve um pouco mais de exsudato purulento e de neutrófilos na área central do abscesso induzido (Figura 51).

Figura 51 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 7 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se nota a presença de proliferação angioblástica (círculos tracejados). **C)** Destaque em verde de **B** em que se observam neutrófilos (**N**). **D)** Destaque em azul de **C** contendo macrófagos (**MO**). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Para os períodos de 28 dias (Figura 52) e 84 dias (Figura 53), as observações foram as mesmas descritas para o grupo TBO_L.

Figura 52 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 28 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em verde de **A** em que se observa um fibrosamento avançado (setas). **C)** Destaque em azul de **B** contendo macrófagos (MO). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; M = músculo esquelético; TC = tecido conjuntivo; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

Figura 53 – Aspectos microscópicos do tecido reacional perimaterial após 84 dias de implantação subcutânea em rato do grupo TBO_R em vários aumentos. **A)** Visão panorâmica do corte. **B)** Destaque em laranja de **A** onde se nota a espessura fina do tecido reacional perimaterial (seta dupla). **C)** Destaque em azul de **B** em que se observa fibrosamento intenso (setas). (EP = epitélio estratificado pavimentoso; TC = tecido conjuntivo; M = músculo esquelético; Ti = local onde estava implantado o disco de titânio). (HE)

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA SEMIQUANTITATIVA

Com relação ao grau de fibrosamento e à severidade do infiltrado inflamatório, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos de superfície e, por este motivo, os dados foram agrupados, de forma a serem considerados 10 espécimes para cada grupo estudado.

Como foram atribuídos escores para a análise semiquantitativa, na apresentação dos resultados serão adotados, para cada grupo, os escores mais prevalentes.

5.2.1 Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial

O grupo controle positivo (C) foi o que apresentou menor grau de fibrosamento do tecido reacional ao redor dos discos de titânio implantados. Entretanto, somente houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0230$) entre os grupos controle positivo (C) e controle negativo (NC), quando comparados os tratamentos entre si (Tabela 2).

Tabela 2 – Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos experimentais

GRUPOS	GRAU DE FIBROSAMENTO escore (incidência)
NC	3 (56,67%) ^a
C	1 (40%) ^b
LBI	3 (41,38%) ^{ab}
PDT	3 (50%) ^{ab}
TBO	3 (53,33%) ^{ab}

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

Com relação aos períodos experimentais, aos 7 dias, o grau de fibrosamento foi menor do que aos 28 e 84 dias, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0000$). Entre 28 e 84 dias não foram detectadas diferenças estatísticas (Tabela 3).

Tabela 3 – Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial de acordo com os períodos experimentais

Períodos experimentais (dias)	GRAU DE FIBROSAMENTO escore (incidência)
7	1 (80%) ^a
28	3 (58,33%) ^b
84	3 (78,26%) ^b

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

Como a diferença no grau de fibrosamento ocorreu entre os 7 dias e os demais períodos ($p = 0,000$), foram analisados os comportamentos dos grupos com relação a esse parâmetro aos 7 dias. Verificou-se maior grau de fibrosamento no grupo não contaminado em relação aos demais que, por sua vez, não diferiram entre si (Tabela 4).

Tabela 4 – Grau de fibrosamento do tecido reacional perimaterial aos 7 dias entre os grupos

Grupo/Período	NC	C	LB	PDT	TBO
7 dias	2 (70%) ^a	1 (100%) ^b	1 (100%) ^b	1 (100%) ^b	1 (100%) ^b

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

5.2.2 Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial

A severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional ao redor dos discos de titânio implantados, quando comparados os tratamentos entre si, não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0931$). Entretanto, a maior severidade foi observada no grupo C (Tabela 5).

Tabela 5 – Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos experimentais

GRUPOS	SEVERIDADE escore (incidência)
NC	2 (46,67%) ^a
C	3 (44%) ^a
LBI	1 (37,93%) ^a
PDT	1 (46,67%) ^a
TBO	1 (40%) ^a

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

Da mesma forma que ocorreu com o grau de fibrosamento, em relação aos períodos experimentais, houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 7 e 28 dias e entre 7 e 84 dias ($p = 0,0000$), mas não entre 28 e 84 dias para a severidade do infiltrado inflamatório perimaterial (Tabela 6).

Tabela 6 – Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial de acordo com os períodos experimentais

Períodos experimentais (dias)	SEVERIDADE escore (incidência)
7	3 (80%) ^a
28	1 (60,42%) ^b
84	1 (60,87%) ^b

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

Como a diferença na severidade do infiltrado inflamatório perimaterial ocorreu entre os 7 dias e os demais períodos ($p=0,000$), foram analisados os comportamentos dos grupos com relação a esse parâmetro aos 7 dias. Verificou-se menor severidade de infiltrado inflamatório no grupo não contaminado em relação aos demais, que por sua vez, não diferiram entre si (Tabela 7).

Tabela 7 – Severidade do infiltrado inflamatório do tecido reacional perimaterial aos 7 dias entre os grupos

Grupo/Período	NC	C	LBI	PDT	TBO
7 dias	2 (90%) ^a	3 (100%) ^b	3 (100%) ^b	3 (100%) ^b	3 (100%) ^b

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA

5.3.1 Área do tecido reacional perimaterial

A área do tecido reacional ao redor dos discos rugosos foi maior do que a dos discos lisos ($p = 0,0377$), sendo a média da área de todos os discos de superfície lisa igual a $1,9 \pm 2,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ e a dos discos de superfície rugosa, igual a $2,6 \pm 3,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$.

Os dados referentes à análise do parâmetro área encontram-se apresentados na Tabela 8.

O grupo não contaminado apresentou área média de tecido reacional significativamente menor do que os demais grupos aos 7 dias e também menor do que os grupos C e LBI aos 84 dias. Ao longo de todo o estudo, a área do tecido reacional do grupo NC não apresentou diferenças estatísticas.

O grupo contaminado (C) foi o que apresentou maior área de tecido reacional do que todos os demais grupos aos 7 dias. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa em comparação aos grupos LBI e TBO nesse mesmo período de observação. Apenas o grupo PDT demonstrou comportamento melhor do que o grupo C com relação a esse parâmetro, mas ainda assim, inferior ao grupo NC.

Após os 28 dias, todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante, não havendo diferença estatística entre eles, com exceção do grupo C de 84 dias, que não manteve comportamento uniforme com relação a nenhum parâmetro.

Tabela 8 – Médias das áreas do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos e períodos experimentais

Grupos	7 dias (μm^2)	28 dias (μm^2)	84 dias (μm^2)
NC	$0,65 \pm 0,23 \times 10^6 \text{ a}$	$0,55 \pm 0,11 \times 10^6 \text{ a}$	$0,51 \pm 0,11 \times 10^6 \text{ a}$
C	$9,11 \pm 2,10 \times 10^6 \text{ b}$	$0,60 \pm 0,23 \times 10^6 \text{ ac}$	$4,30 \pm 8,65 \times 10^6 \text{ c}$
LBI	$5,45 \pm 1,98 \times 10^6 \text{ be}$	$0,69 \pm 0,24 \times 10^6 \text{ acd}$	$0,55 \pm 0,16 \times 10^6 \text{ d}$
PDT	$4,34 \pm 1,49 \times 10^6 \text{ e}$	$0,56 \pm 0,24 \times 10^6 \text{ ad}$	$0,50 \pm 0,19 \times 10^6 \text{ ad}$
TBO	$5,33 \pm 2,13 \times 10^6 \text{ be}$	$0,64 \pm 0,19 \times 10^6 \text{ acd}$	$0,84 \pm 0,47 \times 10^6 \text{ acd}$

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

Como os implantes rugosos apresentaram maior área de tecido reacional perimaterial do que os implantes lisos, foram considerados à parte e comparados com relação à área de tecido reacional de acordo com os grupos. Esta análise objetivou verificar se havia superioridade na descontaminação superficial proporcionada por um tratamento em relação a outro. Verificou-se que, aos 7 dias, nenhum tratamento diferiu entre si com relação à área, sendo que todos apresentaram área maior do que os implantes não contaminados. Aos 28 e 84 dias, não houve diferença entre nenhum dos grupos estudados com relação a esse parâmetro (Tabela 9).

Tabela 9 – Médias das áreas do tecido reacional ao redor dos implantes rugosos de acordo com os grupos e períodos experimentais

Grupos	7 dias (μm^2)	28 dias (μm^2)	84 dias (μm^2)
NC	$0,75 \pm 0,21 \times 10^6 \text{ a}$	$0,60 \pm 0,10 \times 10^6 \text{ a}$	$0,48 \pm 0,16 \times 10^6 \text{ a}$
C	$8,90 \pm 2,51 \times 10^6 \text{ b}$	$0,69 \pm 0,29 \times 10^6 \text{ a}$	$7,62 \pm 12,42 \times 10^6 \text{ ac}$
LBI	$6,12 \pm 1,50 \times 10^6 \text{ bc}$	$0,73 \pm 0,19 \times 10^6 \text{ ad}$	$0,55 \pm 0,16 \times 10^6 \text{ ad}$
PDT	$5,14 \pm 1,46 \times 10^6 \text{ bc}$	$0,60 \pm 0,35 \times 10^6 \text{ ad}$	$0,38 \pm 0,12 \times 10^6 \text{ d}$
TBO	$6,30 \pm 1,29 \times 10^6 \text{ b}$	$0,68 \pm 0,24 \times 10^6 \text{ ad}$	$1,06 \pm 0,58 \times 10^6 \text{ d}$

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

5.3.2 Espessura do tecido reacional perimaterial

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as médias da espessura do tecido reacional entre os discos de superfície lisa e os de

superfície rugosa ($p = 0,2801$). Por outro lado, ao serem comparados os tratamentos e os períodos experimentais isoladamente, houve diferença estatística, assim como no cruzamento desses dados ($p = 0,0000$ para ambos).

Os dados referentes à análise do parâmetro espessura encontram-se apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Médias das espessuras do tecido reacional perimaterial de acordo com os grupos e períodos experimentais

Grupos	7 dias (μm)	28 dias (μm)	84 dias (μm)
NC	$82,71 \pm 33,12^a$	$61,51 \pm 10,04^a$	$66,28 \pm 19,44^a$
C	$610,52 \pm 93,91^b$	$68,16 \pm 32,52^a$	$174,95 \pm 204,22^a$
LBI	$439,99 \pm 116,35^b$	$69,15 \pm 26,31^a$	$61,66 \pm 22,01^a$
PDT	$396,64 \pm 92,60^b$	$62,31 \pm 25,79^a$	$66,43 \pm 26,09^a$
TBO	$426,69 \pm 133,17^b$	$78,86 \pm 29,20^a$	$91,10 \pm 51,19^a$

Letras iguais significam ausência de diferença estatística

Considerando esse parâmetro, o grupo NC apresentou menor espessura de tecido reacional do que os demais grupos em todos os períodos estudados e essa diferença foi estatisticamente significativa, sendo a menor espessura observada aos 28 dias.

A espessura média do tecido perimaterial no grupo C, aos 7 dias, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos que receberam tratamento. Somente houve diferença quando comparado ao grupo NC, sendo a espessura consideravelmente maior no grupo C.

Da mesma forma, a espessura do tecido perimaterial dos espécimes do grupo LBI diferiu estatisticamente do grupo NC em todos os períodos. Dentro deste grupo, foi mais espessa aos 7 dias do que nos períodos posteriores e esta diferença foi estatisticamente significativa. Nos demais períodos não houve diferença significativa com nenhum dos grupos, incluindo o NC. O mesmo comportamento foi apresentado pelos grupos PDT e TBO.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A busca por uma modalidade terapêutica segura para a peri-implantite tem gerado inúmeras publicações combinando as mais diversas técnicas e materiais em procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos (ERICSSON et al., 1996; PERSSON et al., 1996; HÜRZELER et al., 1997; BACH et al., 2000; DEPPE et al., 2001; KREISLER et al., 2002a; SCHOU; BERGLUNDH; LANG, 2004), visando à remoção dos contaminantes sem alterar a topografia superficial dos implantes (BAIER; MEYER, 1988; MOUHYI; SENNERBY; VAN RECK, 2000), sem dano para os tecidos vivos e com boa relação custo-benefício. Como consequência, verifica-se grande diversidade de protocolos para o tratamento da peri-implantite o que gera, no clínico, insegurança na eleição de um deles para ampla aplicação. Isto ocorre até mesmo porque há peculiaridades inerentes aos implantes (como tipo de superfície, desenho do implante e da prótese implanto-suportada) e aos pacientes (como condições sistêmicas, tabagismo, higiene oral e padrão oclusal), que podem interferir no prognóstico do tratamento (QUIRYNEN et al., 1990; LINDHE; MEYLE, 2008).

Além disso, a peri-implantite é uma morbidade ainda não completamente compreendida (DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; CASTRO et al., 2007), cujos mecanismos biológicos relacionados à sua etiopatogênese estão por ser adequadamente desvendados e cujo conhecimento pode ajudar a diminuir as limitações terapêuticas.

Ainda que não se conheçam todas as vias que levam ao desenvolvimento da peri-implantite, seus efeitos sobre os tecidos duros e moles estão bem estabelecidos, traduzindo-se essencialmente por inflamação da mucosa peri-implantar e por perda óssea marginal que podem vir a comprometer a permanência do implante na boca (BECKER et al., 1990; MOMBELLI, 2002). Esses efeitos requerem tratamento adequado e, aparentemente, o ponto crítico para o sucesso é a recuperação de superfícies metálicas biocompatíveis e passíveis de se reosseointegrar.

Neste estudo foram comparados laser em baixa intensidade, terapia fotodinâmica e o azul de toluidina O, na descontaminação de superfícies de implantes de titânio, por serem métodos que comprovadamente resultam em benefícios no tratamento da peri-implantite (KOTSOVILIS et al., 2008) e por

apresentarem vantagens em relação a outras técnicas. Por exemplo, instrumentos mecânicos e manuais usados para raspagem radicular, não são apropriados para uso em superfícies de titânio por deixarem resíduos contaminantes originados do próprio material (CASTRO et al., 2007). Além disso, as terapias convencionais com curetas de plástico, raspadores sônicos e ultrassônicos e jatos abrasivos têm se mostrado insuficientes na eliminação completa de biofilmes microbianos e de bactérias de superfícies rugosas (KREISLER et al. 2005; SCHWARZ et al. 2006), além de não alcançarem áreas de defeitos ósseos muito profundos e estreitos (DÖRTBUDAK et al., 2001).

A literatura é farta em publicações que atestam a viabilidade do tratamento da peri-implantite com diversos tipos de laser em baixa intensidade (GANZ, 1994; DEPPE et al., 2001; SHIBLI et al., 2004; KREISLER et al., 2002a,b; MOUHYI et al., 1999; PARK et al., 2005; OYSTER; PARKER; GHER, 1995; DEPPE; HORCH; NEFF, 2007; CASTRO et al., 2007), da terapia fotodinâmica com vários agentes fotossensibilizadores (ZANIN et al., 2010; GOULART et al., 2010 a,b; HAYEK et al., 2005; BHATTI et al., 1998; SARKAR; WILSON, 1993; RIBEIRO; ZECELL, 2004; HAAS et al., 1997) e de substâncias corantes isoladas (BUCK, 2009; BHATTI et al., 1998) que, ao se fixarem na parede celular bacteriana, produzem efeitos citotóxicos. Entretanto, não foram encontrados estudos comparando esses 3 métodos de limpeza de implantes contaminados por placa bacteriana quanto à reação tecidual produzida pela sua implantação em tecidos vivos, conforme foi proposto neste trabalho.

Os resultados alcançados neste estudo permitiram a constatação de que laser em baixa intensidade, terapia fotodinâmica e azul de toluidina O produziram descontaminação suficiente das superfícies metálicas contaminadas, como atestado pela semelhança verificada no grau de fibrosamento e severidade do infiltrado inflamatório em todos os períodos de observação em relação a superfícies estéreis (Tabelas 2 e 5), sem evidente superioridade de um método de descontaminação sobre outro, já que depois dos 28 dias de observação, todos os discos, contaminados ou não, produziram resposta tecidual muito semelhante.

As principais diferenças em todos os parâmetros avaliados foram vistas apenas aos 7 dias e foram mais evidentes quando se compararam implantes estéreis e contaminados sem tratamento. Nem mesmo o tipo de superfície (lisa ou rugosa) influenciou significativamente a resposta tecidual aos tratamentos a não ser

no parâmetro área do tecido reacional perimaterial, no qual os implantes rugosos mostraram-se mais irritantes do que os lisos. Estas observações contrastam com conceitos já estabelecidos de que a rugosidade de superfície parece proteger os microrganismos da remoção por procedimentos de higiene oral (QUIRYNEM et al., 1990) e de que a ligação dos LPS a superfícies metálicas é extremamente firme (KNOERNSCHILD et al., 1994; NELSON et al., 1997). Embora este estudo não tenha realizado análises microbiológicas, uma explicação para essa aparente discrepância com dados de outros autores pode residir na possibilidade de que o mecanismo imunológico dos animais tenha reduzido a carga de contaminação com o tempo.

A análise descritiva dos cortes histológicos demonstrou que, conforme esperado, tanto para o grupo NC_L como para o NC_R, ocorreu inflamação moderada aos 7 dias sem formação de abscesso, o que foi considerado reação natural em decorrência da presença do disco estéril em ambiente com mobilidade. Os implantes lisos e rugosos não contaminados também produziram reação tecidual semelhante entre si aos 28 e 84 dias com a formação de cápsula gradativamente mais colagenizada e menos infiltrada por neutrófilos, caracterizando resolução da inflamação aguda com o tempo.

Por outro lado, aos 7 dias, os discos pertencentes aos grupos C_L e C_R produziram uma reação inflamatória tão intensa que ocorreu a formação de infiltrado inflamatório purulento em grande área do tecido perimaterial. Este achado foi constante e, provavelmente, foi o que causou a expulsão dos cinco discos que não foram localizados no momento das biópsias nesses grupos.

Aos 28 e 84 dias, entretanto, a intensa reação inflamatória verificada nos implantes contaminados não tratados, deu lugar a um tecido reacional fino e comparável, nos mesmos períodos experimentais, aos dos grupos NC_L e NC_R. Apenas a periferia do tecido reacional do grupo C lembrava a condição severa observada aos 7 dias, pois aí observou-se hemossiderose focal, denunciando a ocorrência prévia de áreas hemorrágicas. Um espécime do grupo C_R de 84 dias, apresentou excepcionalmente a manutenção de um exuberante abscesso, fugindo às características desse grupo. Não foi encontrada uma explicação razoável para esse comportamento, já que todos os procedimentos foram realizados dentro de um rigoroso padrão, mas não foi descartada a possibilidade de que possa ter havido alguma falha de fabricação que resultou em alteração nas características

superficiais, tornando-a mais irritante, como aumento da rugosidade com eventual maior acúmulo bacteriano.

Os grupos LBI_L e LBI_R comportaram-se de forma muito semelhante entre si nos três períodos de estudo. Aos 7 dias, a maioria também formou abscessos, porém, menos intensos do que os vistos nos grupos controle positivos, embora um deles pertencente ao grupo LBI_R, no período de 28 dias não tenha sido encontrado, provavelmente por também ter sido expulso pelo abscesso. Já, aos 28 e 84 dias, todos se comportaram de forma muito semelhante aos discos dos demais grupos contaminados, inclusive pela presença de hemossiderose focal na periferia. Esses dados concordam com os de Deppe, Horch e Neff (2007) que verificaram que em implantes acometidos por peri-implantite tratados por irradiação a laser de CO₂, não diferem de não tratados em longo prazo quanto à taxa de reosseointegração.

Em comparação aos grupos C, LBI e TBO, a terapia fotodinâmica produziu o mesmo efeito aos 7 dias, com formação de inflamação aguda purulenta caracterizando abscesso. No entanto, a quantidade de neutrófilos acumulados e de exsudato purulento foi bem menor nesse grupo do que nos demais, o que pode ter sido responsável pela ausência da observação frequente de hemossiderose focal periférica (observada em apenas um espécime). Todavia, também esta diferença se dissipou aos 28 e 84 dias. Estes dados estão em acordo com os de Haas et al. (1997), Dörtbudak et al. (2001), O'Neill, Hope e Wilson (2002), que verificaram excelente redução microbiana da superfície de implantes de titânio de diferentes rugosidades de superfície quando tratadas com terapia fotodinâmica em comparação ao laser e azul de toluidina O isolados e com os de Hayek et al. (2005) que não verificaram diferença significativa entre os efeitos da terapia fotodinâmica e terapia convencional a retalho e irrigação com clorexidina.

A análise descritiva dos grupos de discos tratados por azul de toluidina O foi praticamente a mesma que a dos grupos PDT, com a ressalva de que nos discos de superfície rugosa, no período experimental de 7 dias, houve um pouco mais de exsudato purulento e de neutrófilos na área central do abscesso induzido, mas essa observação não foi confirmada pelas análises semiquantitativa e quantitativa.

De fato, o tipo de superfície, liso ou rugoso não influenciou o grau de fibrosamento nem a severidade do infiltrado inflamatório. Como esses dois parâmetros estão proporcionalmente relacionados à intensidade da reação inflamatória, pôde-se considerar que as diferenças topográficas entre as superfícies

do metal empregado (titânio comercialmente puro torneado ou torneado e tratado por jateamento de óxido de alumínio e ataque ácido) não são suficientemente grandes para produzir diferenças de comportamento do tecido mole frente à sua implantação. Nem mesmo os tratamentos empregados causaram danos aos tecidos circundantes, contemplando um dos objetivos preconizados para os métodos de tratamento da peri-implantite: o de manter inalterada a integridade dos tecidos circundantes (BAIER; MEYER, 1988; MOUHYI; SENNERBY; VAN RECK, 2000).

Uma observação interessante de Nakazato et al. (1989) foi a de que a rugosidade de superfície interfere na adesão bacteriana, mas somente até as 48 horas, não havendo mais mudanças qualitativas depois desse tempo. Esse evento foi atribuído a diferenças na energia livre de superfície entre diferentes texturas dos materiais, de forma que implantes de superfície lisa (com baixa energia de superfície) retêm mais cocos do que os de superfície rugosa (com alta energia de superfície), os quais retêm mais espiroquetas e microrganismos móveis (QUIRYNEN et al., 1993, 1994; ZITZMANN et al., 2002). Este poderia ser um dos argumentos que apoiariam a hipótese de que a equiparação entre a resposta tecidual aos tratamentos encontrada seria devida à semelhança na composição do biofilme microbiano produzido na superfície dos discos de titânio.

Com relação ao grau de fibrosamento, foi menor em todos os grupos aos 7 dias do que nos outros dois períodos (Tabela 3). De forma geral, houve diferença apenas entre os discos do grupo C em relação ao grupo NC (Tabela 2). Esta informação pode ser interpretada pela contaminação evidentemente maior daqueles discos em relação a todos os demais, mas especialmente em relação aos estéreis, o que provavelmente gerou resposta inflamatória mais intensa. Entretanto, quando o grupo C foi comparado aos demais grupos de tratamento, não houve diferença estatística entre eles.

O mesmo pode ser dito com relação à severidade do infiltrado inflamatório, que foi maior aos 7 dias do que nos períodos posteriores, sem diferença entre os grupos (Tabela 6), embora o escore mais prevalente encontrado para os discos estéreis (2) tenha sido menor que o mais prevalente dos demais grupos (3) (Tabela 7). Após os 28 dias, todos os grupos se equiparam também em relação a esse parâmetro.

A avaliação da área e espessura do tecido reacional ao redor de materiais implantados tem sido empregada como parâmetro para avaliação da

biocompatibilidade desses materiais (QUEIROZ, 2008; DAMÉ, 2002), porque a uma inflamação mais intensa, corresponde um número maior de células e volume maior de líquido intersticial acarretando, por consequência, maior área e espessura de tecido reacional (CONSOLARO, 2009). Área e espessura do tecido reacional perimaterial são, portanto, parâmetros complementares e coerentes quando esse tecido apresenta uniformidade de dimensões. Neste estudo, pode ser afirmado, pela observação das lâminas, que as reações teciduais foram uniformes no que se refere ao contorno e espessura na maioria dos cortes. Esta uniformidade refletiu diretamente a ausência de fatores agressores além da presença dos discos propriamente dita, provavelmente devido ao rigor da técnica cirúrgica empregada, na qual contaminação e trauma adicionais foram excluídos.

Embora na análise semiquantitativa, discos rugosos e lisos não tenham diferido entre si, na análise quantitativa, os discos rugosos apresentaram maior área de tecido reacional do que os lisos e essa diferença foi estatisticamente significativa. Como teoricamente a superfície rugosa pode oferecer maior dificuldade de descontaminação, atribuiu-se a esse fator a diferença encontrada. Por esta razão, os implantes rugosos foram considerados à parte, com o objetivo de avaliar se algum dos tratamentos aplicados apresentou-se superior a outro em seu efeito de descontaminação. Essa superioridade, todavia, não foi observada, confirmando os achados de Parlar et al. (2009) que empregaram soro fisiológico e autoclavagem como métodos de limpeza e descontaminação.

Como era esperado em vista da avaliação descritiva, o grupo NC apresentou menor área de tecido reacional do que os demais grupos aos 7 e 28 dias (Tabela 8). A maior área foi apresentada pelo grupo C aos 7 dias, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa em comparação aos grupos LBI e TBO no mesmo período. Um achado interessante foi que o único grupo a se mostrar superior ao grupo C nesse parâmetro e nesse tempo, foi o grupo PDT (ainda que inferior ao NC) o que sugere uma leve vantagem deste tipo de tratamento sobre os demais.

O cálculo da espessura do tecido reacional perimaterial foi feito com o objetivo de comprovar os resultados da área, já que ambos os parâmetros refletem o mesmo fenômeno. Da mesma forma que a área, espera-se que a espessura desse tecido diminua com o tempo, à medida que a inflamação vai se tornando menos intensa, o que de fato, ocorreu com todos os grupos. Entretanto, a primeira

divergência encontrada em relação à área foi a falta de diferença estatisticamente significativa entre discos lisos e rugosos quanto às espessuras médias do tecido reacional perimaterial ($p = 0,2801$). Como a escolha das regiões do tecido a serem medidas para o cálculo de espessura média foi padronizada, nem sempre corresponderam à região de maior espessura em cada espécime. Este pode ter sido o fator que contribuiu para a falta de correspondência verificada entre os parâmetros espessura e área de tecido reacional perimaterial em alguns grupos.

Confirmando os resultados de área, o grupo NC apresentou a menor e o grupo C, a maior espessura de tecido reacional perimaterial do que todos os demais grupos em todos os períodos (Tabela 10). Entretanto, em comparação aos grupos de tratamento, o grupo contaminado não mostrou diferença estatística, nem mesmo com o grupo PDT, do qual diferiu em relação à área.

Como após os 28 dias, todos os grupos se comportaram equivalentemente quanto à área e espessura do tecido reacional perimaterial e lembrando que o grupo C não recebeu qualquer limpeza antes da implantação, poder-se-ia especular que, quando submersos em tecido vivo sem acesso ao meio externo, implantes contaminados, até mesmo sem tratamento algum, podem vir a ser bem tolerados pelo organismo.

Os resultados desta pesquisa levam à suposição de que, quando implantes contaminados por biofilme microbiano e limpos por um dos métodos estudados são implantados em ambiente hermético de tecido vivo, o próprio organismo se encarrega, depois de determinado tempo, de eliminar o agente causador da reação inflamatória, de forma a não haver mais diferenças entre implantes estéreis e contaminados tratados ou não.

Em suma, os resultados deste trabalho sugerem que pode haver alguma interferência do método de descontaminação de superfícies de implantes de titânio sobre o comportamento tecidual apenas nas fases iniciais de reparação e que, neste aspecto, a terapia fotodinâmica seria levemente superior à aplicação do laser em baixa intensidade ou do azul de toluidina O isoladamente. Esta informação assume especial importância ao se considerar um protocolo de tratamento para a peri-implantite, porque é nos primeiros dias do processo de reparo que as células advindas dos tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo estabelecem uma “disputa” pelo povoamento da ferida cirúrgica. Se for considerada a ferida cirúrgica peri-implantar da forma como se apresenta na condição clínica, as células epiteliais seriam as

primeiras a alcançar a superfície metálica dentro do período de 7 a 15 dias, porque sua taxa de proliferação é mais alta (Nyman et al., 1982). Talvez, seja dentro desse período que os métodos de descontaminação precisem apresentar diferenças entre si que justifiquem seu emprego no tratamento da peri-implantite. Se o comportamento apresentado pela terapia fotodinâmica neste estudo se repetir no ambiente peri-implantar real, é possível que as células precursoras ósseas sejam capazes de se aderirem às superfícies tratadas e das quais as células epiteliais sejam excluídas para favorecer a reosseointegração. Uma vantagem desse método em relação à terapia convencional a retalho seria a não necessidade do uso de enxertos, que implicam em maior morbidade pós-operatória, nem de antibióticos, que podem desenvolver resistência microbiana (BHATTI et al., 1998). Por outro lado, deve-se levar em consideração a limitação de quaisquer dos métodos aqui estudados quando transferidos para a situação clínica, que é a presença de sangramento. O sangue na área a ser tratada pode absorver grande parte da energia do laser que pode não atingir áreas mais profundas dos defeitos e assim, ter sua efetividade limitada (DEPPE; HORCH; NEFF, 2007; DÖRTBUDAK et al., 2001).

Concluindo, dentro das limitações inerentes ao modelo experimental e métodos empregados, pode-se depreender que tanto o laser de InGaAlP em baixa intensidade, nos ajustes aqui propostos, quanto a aplicação de azul de toluidina O e a terapia fotodinâmica mostraram-se igualmente eficazes na descontaminação de implantes de titânio lisos e rugosos, no que se refere à resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, com leve superioridade para a terapia fotodinâmica aos 7 dias. Ainda, implantes de superfícies lisas ou rugosas não parecem ser diferentes quanto à intensidade da resposta inflamatória induzida por sua presença e nem quanto à descontaminação alcançada pelos tratamentos empregados.

Uma sequência lógica para este estudo seria o teste dos efeitos dos mesmos tratamentos sobre o comportamento celular em cultura e/ou dos tecidos em uma condição de implantação em tecido ósseo. Nessas condições, a variável mobilidade do ambiente seria eliminada e os resultados aqui obtidos poderiam ser confirmados ou não.

O tratamento da peri-implantite permanece, pois, como um tema controverso e, dado ao crescente aumento da sua incidência entre os portadores de próteses implanto-suportadas, merecedor de mais investimentos em pesquisas

básicas e aplicadas que venham a preencher essa lacuna terapêutica dentro da Odontologia.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- implantes contaminados por biofilme microbiano e tratados com laser em baixa intensidade, terapia fotodinâmica e azul de toluidina O não diferem entre si quanto aos parâmetros inflamatórios teciduais em todos os períodos estudados;
- superfícies lisas e rugosas não diferem entre si quanto à resposta produzida nos tecidos vivos nem quanto aos tratamentos de descontaminação recebidos;
- em relação a implantes contaminados sem tratamento, apenas a terapia fotodinâmica parece levemente superior aos demais tratamentos;
- com o passar do tempo, todos os tratamentos se equiparam a implantes estéreis quanto à reação tecidual perimaterial.

Referências

REFERÊNCIAS

- Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark P-I, Jemt T. A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990;5(4):347-59.
- Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of Session IV. In: Lang, N. P. & Karring, T. (eds) *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. 1994. pp 365-69. London: Quintessence Publishing Co. Ltd.
- Almeida JM, Garcia VG, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Macarini VC. Terapia fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. *Arquivos em Odontologia*. 2006;42(3):161-256.
- Antoci V Júnior, King SB, Jose B, Parvizi J, Zeiger AR, Wickstrom E et al. Vancomycin covalently bonded to titanium alloy prevents bacterial colonization. *J Orthop Res*. 2007;25(7):858-66.
- Aviv M, Berdicevsky I, Zilberman M. Gentamicin-loaded bioresorbable films for prevention of bacterial infections associated with orthopedic implants. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(1):10-9.
- Bach G, Neckel C, Mall C, Krekeler G. Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. *Implant Dent*. 2000;9(3):247-51.
- Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. *Rev Bras Ensino Fis* 2001;2(2):4-9.
- Baier RE, Meyer AE. Implant surface preparation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3(1):9-20.
- Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol*. 1998;68(3):370-6.
- Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5(1):31-8.

Bick PH, Carpenter AB, Holdeman LV, Miller GA, Ranney RR, Palcanis KG, et al. Polyclonal B-cell activation induced by extracts of gram-negative bacteria isolated from periodontally diseased sites. *Infect Immun*. 1981;34(1):43-9.

Buck STG. Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica [dissertação]. São Carlos (SP): Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2009.

Castro GL, Gallas M, Núñez IR, Borrajo JLL, Álvarez JC, Varela LG. Scanning electron microscopic analysis of diode laser-treated titanium implant surfaces. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(2):124-8.

Consolaro A. Inflamação e Reparo. 1 ed. Maringá: Dental Press Editora; 2009.

Damante CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2007.

Damé JAM. Reação do tecido subcutâneo de ratos a implantes de Ti cp submetidos a tratamentos superficiais para peri-implantite [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2002.

Dederich ND, Pickard MA, Vaughn AS, Tulip J, Zakariasen KL. Comparative bactericidal exposures for selected oral bacteria using carbon dioxide laser radiation. *Lasers Surg Med*. 1990;10(6):591-4.

Deppe H, Horch HH, Neff A. Conventional versus CO₂ laser-assisted treatment of peri-implant defects with the concomitant use of pure-phase β -tricalcium phosphate: a 5-year clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(1):79-86.

Deppe H, Horch HH, Henke J, Donath K. Peri-implant care of ailing implants with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16(5):659-67.

Dörtbudak 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;12(2):104-8.

Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(2):226-32.

Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Edlund T, Lindhe J. The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res. 1996;7(4):320–8.

Freudenberg MA, Galanos C. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. Int Rev Immunol. 1990;6(4):207-21.

Furlani TA. Efeito do lactato de cálcio aplicado previamente ao dentifrício fluoretado na desmineralização do esmalte bovino e na composição da placa bacteriana formada *in situ* [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Ganz CH. Evaluation of the safety of the carbon dioxide laser used in conjunction with root form implants: a pilot study. J Prosthet Dent. 1994;71(1):27-30.

Goulart RC, Thedei G Júnior, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Photomed Laser Surg. 2010;28(suppl 1):85-90.

Goulart RC, Bolean M, Paulino TP, Thedei G Júnior, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Photomed Laser Surg. 2010;28(suppl 1):53-60.

Gutknecht N, Franzen R. O Laser: Função, Interação e Segurança. In: Gutknecht N, Eduardo CP. A Odontologia e o Laser: Atuação do Laser na Especialidade Odontológica. São Paulo: Quintessence Editora Ltda; 2004. p. 25-60.

Haas R, Dörtbudak 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;8(4):249-54.

Hayek RRA, Araújo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM Júnior, 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;76(8):1275-81.

Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. J Clin Periodontol. 2008;35(8 suppl):292-304.

Hürzeler MB, Quiñones CR, Schüpback P, Morrison EC, Caffesse RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: histologic findings. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997;12(2):168-75.

International Organization for Standardization ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation; 1994.

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

Knoernschild KL, Lefebvre CA, Schuster GS, Payant LM, Gagnon FM. Endotoxin adherence to and elution from two casting alloys. *Int J Prosthodont*. 1994;7(1):22–9.

Kotsovilis S, Karoussis IK, Trianti M, Fourmoussis I. Therapy of peri-implantitis: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008;35(7):621–29.

Kreisler M, Al Haj H, d'Hoedt B. Temperature changes induced by 809-nm GaAlAs laser at the implant-bone interface during simulated surface decontamination. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(1):91-6.

Kreisler M, Götz H, Duschner H, d'Hoedt B. Effect of the Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂ and GaAlAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002b;17(2):202-11.

Kreisler M, Kohnen W, Marinello C, Götz H, Duschner H, Jansen B, et al. Bactericidal effect of the Er:YAG laser on dental implant surface: an *in vitro* study. *J Periodontol*. 2002a;73(11):1292-8.

Kreisler M, Kohnen W, Christoffers AB, Götz H, Jansen B, Duschner H, et al. In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er: YAG laser and an air powder system. *Clinical Oral Implants Res*. 2005;16(1):36-43.

Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008;35(suppl):282-5.

Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2002;28:177-89.

Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment fo peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998;17:63-76.

Mombelli A, Merickse-Stern R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as *abutments* for overdentures. *Clin Oral Implants Res*. 1990;1(1):1-7.

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

Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with history of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1995;22(2):124-30.

Mouhyi J, Sennerby L, Van Reck J. The soft tissue response to contaminated and cleaned titanium surfaces using CO₂ laser, citric acid and hydrogen peroxide. An experimental study in the rat abdominal wall. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(2):93-8.

Mouhyi J, Sennerby L, Nammour S, Guillaume P, Van Reck J. Temperature increases during surface decontamination of titanium implants using CO₂ laser. *Clin Oral Implants Res*. 1999;10(1):54-61.

Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4(4):321-6.

Nelson SK, Knoernschild KL, Robinson FG, Schuster GS. Lipopolysaccharide affinity for titanium implant biomaterials. *J Prosthet Dent*. 1997;77(1):76-82.

NUPEN – Núcleo de Pesquisa e Ensino em Fototerapia nas Ciências da Saúde [homepage na internet]. São Carlos: Sede DMC Equipamentos; [acesso em 2011 mar 27]. Disponível em: <http://www.nupen.com.br>.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982;9(4):290-6.

O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med*. 2002;31(2):86-90.

Oyster DK, Parker WB, Gher ME. CO₂ lasers and temperature changes of titanium implants. J Periodontol. 1995; 66(12):1017-24.

Park CY, Kim SG, Kim MD, Eom TG, Yoon JH, Ahn SG. Surface properties of endosseous dental implants after NdYAG and CO₂ laser treatment at various energies. J Oral Maxillofac Surg. 2005;63(10):1522-27.

Parlar A, Bosshardt DD, Cetiner D, Schafroth D, Unsal B, Haytac C, et al. Effects of decontamination and implant surface characteristics on re-osseointegration following treatment of peri-implantitis. J Oral Implants Res. 2009;20(4):391-9.

Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Reosseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res. 2001;12(6):595-603.

Persson LG, Ericsson I, Berglundh T, Lindhe J. Guided bone regeneration in the treatment of periimplantitis. Clin Oral Implants Res. 1996;7(4):366-72.

Pinheiro ALB. Evolução Histórica e Uso do Laser na Odontologia. In: Pinheiro ALB, Brugnera Júnior A, Zanin FAA. Aplicação do Laser na Odontologia. São Paulo: Santos Editora; 2010. p. 1-22.

Pinheiro ALB. Noções básicas da Física do Laser. In: Pinheiro ALB, Brugnera Júnior A, Zanin FAA. Aplicação do Laser na Odontologia. São Paulo: Santos Editora; 2010. p. 47-63.

Queiroz AM. Materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos: avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* e da compatibilidade tecidual *in vivo* [tese]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2008.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Van Steenberghe D. The influence of surface energy and surface roughness on early plaque formation. An *in vivo* study in man. J Clin Periodontol. 1990;17(3):138-44.

Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An *in vivo* study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. J Dent Res. 1993;72(9):1304-9.

Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CM, Van der Bossche LH, Doornbusch GI, Marechal M, Van Steenberghe D, et al. The influence of surface-free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An in vivo study on implants. *J Periodontol.* 1994;65(2):162-7.

Rams TE, Link CC Júnior. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *J Oral Implantol.* 1983;11(1):93-100.

Rams TE, Roberts TW, Feik D, Molzan AK, Slots J. Clinical and microbiological findings on newly inserted hydroxyapatite-coated and pure titanium human dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(3):121-7.

Ribeiro MS, Zezell DM. Laser de Baixa Intensidade. In: Gutknecht N, Eduardo CP. *A Odontologia e o Laser: Atuação do Laser na Especialidade Odontológica.* São Paulo: Quintessence Editora Ltda; 2004. p. 217-40.

Romanos GE, Everts H, Nentwig GH. Alterations of the implant surface after CO₂- or Nd:YAG-laser irradiation: a SEM examination. *J Oral Laser Applications.* 2001;1(1):29-33.

Romanos GE, Everts H, Nentwig GH. Effects of diodo and Nd:YAG laser irradiation on titanium discs: a scanning electron microscope examination. *J Periodontol.* 2000;71(5):810-15.

Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 1993;28(3):204-10.

Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19(7):140-49.

Schwarz F, Jepsen S, Hertzen M, Sager M, Rothamel D, Becker J. Influence of different treatment approaches on non-submerged and submerged healing of ligature induced peri-implantitis lesions: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2006;33(8):584-95.

Shibli JA, Theodoro LH, Haypek P, Garcia VG, Marcantonio E Júnior. The effect of CO₂ laser irradiation on failed implant surfaces. *Implant Dent.* 2004;13(4): 342-51.

- Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Júnior, Marcantonio E Júnior. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(3):273-81.
- Simon BI, Goldman HM, Ruben MP, Baker E. The role of endotoxin in periodontal disease. III. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the histologic degree of inflammation. *J Periodontol.* 1971;42(4):210-6.
- Smith K. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser Ther.* 1991;3:19-24.
- Sousa GR. Análise comparativa da emissão de luz por led e lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas. Estudo “*in vitro*” [tese]. Belo Horizonte (MG): Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
- Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(1):13-28.
- Wainwright M, Giddens RM. Phenothiazinium photosensitisers: choice in synthesis and application. *Dyes and Pigments.* 2003;57:245-57.
- Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995;78(5):569-74.
- Zanin ICJ, Brugnera Júnior A, Zanin FAA, Teixeira A, Pratten J, Wilson M. Estágio Atual da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia. In: Pinheiro ALB, Brugnera Júnior A, Zanin FAA. *Aplicação do Laser na Odontologia.* São Paulo: Santos Editora; 2010. p. 153-67.
- Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue reactions to plaque formation at implant *abutments* with different surface topography. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2002;29(5):456-61.

Apêndices

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A pesquisa “**Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos**” pretende avaliar os efeitos da aplicação do laser na descontaminação de discos de titânio. Os voluntários que concordarem em participar da pesquisa usarão, por 7 dias consecutivos, placas removíveis de acrílico no céu da boca, contendo 8 discos presos no acrílico. Para isso, deverão ser submetidos a dois procedimentos clínicos na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP): um para moldagem das arcadas dentárias e outro para instalação das placas. As placas somente devem ser removidas para realizar as refeições e higiene bucal e não deverão ser escovadas ou limpas. Depois dos 7 dias de uso, os voluntários entregarão as placas à pesquisadora para remoção dos discos, execução da descontaminação e implantação dos discos em ratos. Os procedimentos descritos não acarretarão em riscos à saúde dos voluntários, porém poderão causar algum desconforto, durante a moldagem e durante a utilização da placa. Os voluntários não serão beneficiados de forma direta por participarem da pesquisa, mas sua contribuição ajudará a ampliar os conhecimentos científicos a respeito do uso do laser como tratamento de implantes que não deram certo. Todas as informações da pesquisa serão novamente explicadas antes da instalação das placas, dando ao voluntário a chance de sanar possíveis dúvidas. Os voluntários têm o direito de desistir da participação na pesquisa em qualquer momento, sem dar explicações sobre o motivo, mesmo tendo assinado seu consentimento. Caso haja algum tipo de reclamação a ser feita a respeito desta pesquisa ou se o participante precisar de informações adicionais, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FOB (CEP) no endereço Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru/SP ou pelo telefone (14) 3235-8356. A professora responsável pela pesquisa Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende encontra-se no endereço Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru/SP ou pelo telefone (14) 3235-8278 e a pesquisadora Samira Salmeron pode ser encontrada no telefone (14) 9795-2244.

Pelo documento aqui proposto, que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador (a) da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa do **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** devidamente explicada pelos profissionais e ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa, ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de 2009.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa
ou do Responsável Legal

Samira Salmeron

Samira Salmeron

APÊNDICE B – Nível de significância para o parâmetro área do tecido reacional perimaterial correlacionando os grupos com os períodos experimentais

Grupo - período	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NC 07dias (1)	---	0,999993742	0,999211192	0,000138283	1	0,185297549	0,000138283	1	0,999986947	0,000138283	0,999971688	0,993130863	0,000138283	1	0,999852836
NC 28dias (2)	0,999993742	---	1	0,000138283	1	0,036809623	0,000138283	0,999745786	1	0,000138283	1	0,999999285	0,000138283	0,999997377	0,951549113
NC 84dias (3)	0,999211192	1	---	0,000138283	0,999997735	0,014024615	0,000138283	0,992972076	1	0,000138283	1	1	0,000138283	0,999527454	0,811512172
C 07dias (4)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	---	0,000138283	0,000138283	0,303135633	0,000138283	0,000138283	0,024652183	0,000138283	0,000138283	0,133366227	0,000138283	0,000138283
C 28dias (5)	1	1	0,999997735	0,000138283	---	0,095624626	0,000138283	0,999998331	1	0,000138283	1	0,999899983	0,000138283	1	0,994521141
C 84dias (6)	0,185297549	0,036809623	0,014024615	0,000138283	0,095624626	---	0,000145137	0,339645386	0,032886744	0,000488102	0,028908789	0,006951988	0,000172198	0,169026911	0,684022784
LBI 07dias (7)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	0,303135633	0,000138283	0,000145137	---	0,000138283	0,000138283	0,999682903	0,000138283	0,000138283	1	0,000138283	0,000138283
LBI 28dias (8)	1	0,999745786	0,992972076	0,000138283	0,999998331	0,339645386	0,000138283	---	0,999586999	0,000138283	0,999309421	0,968426645	0,000138283	1	0,999998868
LBI 84dias (9)	0,999986947	1	1	0,000138283	1	0,032886744	0,000138283	0,999586999	---	0,000138283	1	0,999999762	0,000138283	0,999994159	0,940664351
PDT 07dias (10)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	0,024652183	0,000138283	0,000488102	0,999682903	0,000138283	0,000138283	---	0,000138283	0,000138283	0,999999166	0,000138283	0,000138283
PDT 28dias (11)	0,999971688	1	1	0,000138283	1	0,028908789	0,000138283	0,999309421	1	0,000138283	---	0,99999994	0,000138283	0,99998647	0,926439285
PDT 84dias (12)	0,993130863	0,999999285	1	0,000138283	0,999899983	0,006951988	0,000138283	0,968426645	0,999999762	0,000138283	0,99999994	---	0,000138283	0,995213747	0,657360017
TBO 07dias (13)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	0,133366227	0,000138283	0,000172198	1	0,000138283	0,000138283	0,999999166	0,000138283	0,000138283	---	0,000138283	0,000138283
TBO 28dias (14)	1	0,999997377	0,999527454	0,000138283	1	0,169026911	0,000138283	1	0,999994159	0,000138283	0,99998647	0,995213747	0,000138283	---	0,999738574
TBO 84dias (15)	0,999852836	0,951549113	0,811512172	0,000138283	0,994521141	0,684022784	0,000138283	0,999998868	0,940664351	0,000138283	0,926439285	0,657360017	0,000138283	0,999738574	---

APÊNDICE C – Nível de significância para o parâmetro espessura do tecido reacional perimaterial correlacionando os grupos com os períodos experimentais

Grupo - tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NC 07dias (1)	---	0,991686344	0,999045193	0,000138283	0,998479784	0,915234983	0,000138283	0,999924541	0,958680272	0,000138283	0,969397724	0,996806979	0,000138283	1	1
NC 28dias (2)	0,991686344	---	1	0,000138283	1	0,28055042	0,000138283	1	1	0,000138283	1	1	0,000138283	0,999118924	0,971914113
NC 84dias (3)	0,999045193	1	---	0,000138283	1	0,398626983	0,000138283	1	0,999999881	0,000138283	1	1	0,000138283	0,999960005	0,994655252
C 07dias (4)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	---	0,000138283	0,000138283	0,815117061	0,000138283	0,000138283	0,475230634	0,000138283	0,000138283	0,568197787	0,000138283	0,000138283
C 28dias (5)	0,998479784	1	1	0,000138283	---	0,344574034	0,000138283	1	1	0,000138283	1	1	0,000138283	0,999906063	0,992873847
C 84dias (6)	0,915234983	0,28055042	0,398626983	0,000138283	0,344574034	---	0,000155866	0,487206221	0,182205558	0,000246048	0,201059043	0,335196674	0,000206649	0,82755208	0,956628919
LBI 07dias (7)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	0,815117061	0,000138283	0,000155866	---	0,000138283	0,000138283	0,999999994	0,000138283	0,000138283	1	0,000138283	0,000138283
LBI 28dias (8)	0,999924541	1	1	0,000138283	1	0,487206221	0,000138283	---	0,999998093	0,000138283	0,999999404	1	0,000138283	0,999998808	0,999328434
LBI 84dias (9)	0,958680272	1	0,999999881	0,000138283	1	0,182205558	0,000138283	0,999998093	---	0,000138283	1	1	0,000138283	0,991315067	0,903138816
PDT 07dias (10)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	0,475230634	0,000138283	0,000246048	0,999999994	0,000138283	0,000138283	---	0,000138283	0,000138283	1	0,000138283	0,000138283
PDT 28dias (11)	0,969397724	1	1	0,000138283	1	0,201059043	0,000138283	0,999999404	1	0,000138283	---	1	0,000138283	0,994331479	0,923131585
PDT 84dias (12)	0,996806979	1	1	0,000138283	1	0,335196674	0,000138283	1	1	0,000138283	1	---	0,000138283	0,999777675	0,986552179
TBO 07dias (13)	0,000138283	0,000138283	0,000138283	0,568197787	0,000138283	0,000206649	1	0,000138283	0,000138283	1	0,000138283	0,000138283	---	0,000138283	0,000138283
TBO 28dias (14)	1	0,999118924	0,999960005	0,000138283	0,999906063	0,82755208	0,000138283	0,999998808	0,991315067	0,000138283	0,994331479	0,999777675	0,000138283	---	1
TBO 84dias (15)	1	0,971914113	0,994655252	0,000138283	0,992873847	0,956628919	0,000138283	0,999328434	0,903138816	0,000138283	0,923131585	0,986552179	0,000138283	1	---

Anexos

ANEXO A

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 121/2008

Bauru, 30 de outubro de 2008.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos."**, de autoria de Samira Salmeron, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 29 de outubro de 2008 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende
Docente do Departamento de Prótese

Samira Salmeron

ANEXO B

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 015/2008

Bauru, 21 de outubro de 2008.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos”**, de autoria de Samira Salmeron, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *“ad referendum”* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende

Docente do Departamento de Prótese

Samira Salmeron