



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

**Comparação do efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na  
descontaminação de implantes, associados ou não ao uso de L-PRF em  
defeitos peri-implantares induzidos em Minipigs**

BÁRBARA FURTADO MASALSKAS MARTINS

**PG-PERIO**  
FOP- USP

RIBEIRÃO PRETO -SP

2022

BÁRBARA FURTADO MASALSKAS MARTINS

**Comparação do efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na  
descontaminação de implantes, associados ou não ao uso de L-PRF em  
defeitos peri-implantares induzidos em Minipigs**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior

“Versão corrigida”

RIBEIRÃO PRETO-SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### **Catálogo da Publicação**

**Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.**

**Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**

“Versão corrigida da Dissertação/Tese”. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa”.

Masalskas Martins, Bárbara Furtado.

Comparação do efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na descontaminação de implantes, associados ou não ao uso de L-PRF em defeitos peri-implantares induzidos em Minipigs / Bárbara Furtado Masalskas Martins; orientador Arthur Belém Novaes Junior – Ribeirão Preto, 2022.

92 p. : il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ USP.

Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Novaes Jr, Arthur Belém

1. Peri-implantite. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Fibrina Rica em Plaquetas.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Bárbara Furtado Masalskas Martins,

Comparação do efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na descontaminação de implantes, associados ou não ao uso de L-PRF em defeitos peri-implantares induzidos em Minipigs.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Aprovado em: 24/03/2022

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*DEDICATÓRIA*

---

Primeiramente à Deus e a minha grande família,

Aos meus amados pais, **João e Izilda**, às minhas queridas irmãs, **Michelle, Janaína e Alaíne**, às minhas lindas sobrinhas, **Lara e Eduarda**, ao meu esposo, **Caio** e à minha filha, **Antonella**.

Vocês são meus alicerces, minha inspiração e fonte de energia diária. Amo vocês.

# *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

---

Aos meus amados pais, **João e Izilda** que estiveram sempre ao meu lado dando berço, educação, muito amor e ensinaram que quando temos humildade e força de vontade podemos conquistar todos nossos objetivos. À vocês, minha eterna gratidão por me darem os melhores valores e princípios, vocês me fizeram primeiramente pessoa para que depois eu pudesse buscar ser uma excelente profissional. À vocês, todo meu amor.

Ao meu amado esposo e companheiro de vida, **Caio** com quem divido meus dias, problemas, sucessos, alegrias e tristezas. Me acompanhou desde o início desta jornada e tornou este trabalho mais prazeroso. Obrigada pelo incentivo, paciência e parceria. Obrigada por sonhar tão alto ao meu lado e como você sempre diz, vamos colher grandes frutos. Amo muito você.

À minha filha, **Antonella**, que ainda em meu ventre foi inspiração e ressignificação de tantos objetivos traçados ao longo desses anos. Filha, você foi fonte de dedicação, amor e cuidado, foi meu maior incentivo para concluir alguns objetivos propostos em minha vida. Obrigada pelo amor incondicional que você trouxe à minha vida. Amo você, minha menina.

Às minhas queridas irmãs, **Michelle, Janaína e Alaine** que com muito companheirismo e amor que nossos pais nos deram, fizeram-nos cada dia mais unidas e torcendo pelo sucesso umas das outras, obrigada pelo carinho, respeito e união. Amo vocês.

Às minhas sobrinhas, **Lara e Eduarda**, com o amor mais puro que uma criança pode ter, fizeram meus dias cinzentos se tornarem ensolarados, obrigada por me darem tanto amor. Me orgulho muito dos seres humanos lindos que vocês estão se tornando.

Ao meu orientador, **Profº. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**, pelo exemplo de profissional e docente, mantendo sua carreira contínua e sólida. Muito obrigada pelas oportunidades, confiança e aprendizados.

À minha amiga e colega de pós-graduação, **Marília**, que sempre me motivou a buscar conhecimentos, embasar cientificamente habilidades clínicas e me incentivar pela busca incansável de sabedoria. Você foi minha madrinha na Odontologia e ainda tive o prazer de ser acompanhada por você dentro desse projeto. Obrigada por tanto.

# *AGRADECIMENTOS*

---

À **Deus**, por me conceder a oportunidade de viver, aprender diariamente e escrever uma história da qual me orgulho tanto.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, responsáveis por minha formação profissional. Ao **Prof. Dr. Mário Taba Júnior**, pelo excelente trabalho voltado à pesquisa e por ser uma pessoa tão agradável. Ao **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pelos conselhos e incentivos que acrescentaram ainda mais em minha aplicação clínica. À **Profa. Daniela Bazan Palioto** pelos ensinamentos transmitidos. Ao **Prof. Michel Reis Messor**a pelos ensinamentos e trocas de experiência e à **Profa. Flávia Furlaneto** por toda experiência e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de Pós-Graduação, **Umberto Demoner, Marília Reis, Gabriel Bastos Sérgio Lago, Catarina Tahin, Luiz Fernando, Felipe Torres, Gabriel David, Karine Figueredo, Pedro Félix, Kleber Suzuki, Natacha Malu, Uislen Cadore, Yasmin Dal Acqua, Renata Cardoso, Cristhiam Hernandez e Átila Nobre**, pelo companheirismo e equipe.

Em especial aos colegas de Pós-Graduação, **Marília Reis e Gabriel David** que tornaram-se grandes amigos, enaltecendo o conhecimento um dos outros com a troca de experiências profissionais e de vida. Agradeço imensamente por terem cruzado meu caminho, a história de vocês me inspira diariamente.

Aos colegas, **Umberto Demoner**, pós-doutorando deste trabalho, que com todo seu conhecimento pôde engrandecer este projeto, se fez presente durante este percurso e proporcionou inúmeros conhecimentos e troca de experiências, minha eterna gratidão; e ao colega **Gabriel Bastos** por tornar o experimento deste projeto mais divertido, e por sempre conduzir com bons olhos qualquer situação por mais difícil que seja. Muito obrigada pela participação direta e indireta neste trabalho.

À técnica do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos, **Adriana Luisa Gonçalves de Almeida**, pela amizade, paciência, carinho e assistência prestada durante minha passagem dentro do laboratório.

Ao técnico do Laboratório de Histologia, **Sebastião Bianco**, pelo processamento das peças calcificadas.

À técnica **Mila Sprone**, pelo processamento das peças descalcificadas.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, **Dulce de Oliveira Negretti**, **Maria Isabel Gobbo Simonetti (Bel)** e **Carla Daniela Lima (Dani)**, secretárias do departamento de CTBMF e Periodontia, por estarem sempre dispostas à exercerem seus trabalhos, além da relação de respeito para com todos docentes, discentes e funcionários.

Às secretarias da seção de pós-graduação, **Mary Possani**, pela disponibilidade e cordialidade no atendimento às nossas necessidades recorrentes.

Às funcionárias da Clínica de Pós-Graduação, **Dani**, pela amizade, competência, alegria, desabafos, disponibilidade e compreensões diárias. Minha eterna gratidão em cruzar com profissionais como você, Dani.

Aos funcionários do Biotério II, **Aldo** cuja contribuição foi imprescindível para a realização de nosso estudo, você é outro exemplo de profissional competente que não mede esforços para resolução de qualquer problema. Aos médicos veterinários, **Rafael** e **Fábio** por toda dedicação e competência demonstrada no cuidado com os Minipigs.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)**, pela estrutura científica e tecnológica oferecida aos estudantes para realização de pesquisas em nível de excelência internacional.

À **CAPES** pelo recurso financeiro através da bolsa de pós-graduação.

À **FAPESP** pelo recurso financeiro através do Projeto de Pesquisa (2016/10453-0).

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia”

Robert Collier

*RESUMO*

---

## RESUMO

Masalskas Martins, BF. **Comparação do efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na descontaminação de implantes, associados ou não ao uso de L-PRF em defeitos peri-implantares induzidos em Minipigs**. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2022.

**Introdução:** Até o presente momento não há tratamento padrão ouro para a peri-implantite, portanto, há uma necessidade de se testar/estabelecer um protocolo terapêutico efetivo na descontaminação e reparo ósseo de implantes afetados e, se possível possibilitar a regeneração do tecido perdido no transcurso da doença. O objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil microbiológico, inflamatório e clínico da peri-implantite induzida em Minipigs e avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) associada ao uso de L-PRF, na descontaminação e re-osseointegração de defeitos peri-implantares.

**Materiais e Métodos:** Oito Minipigs tiveram seus terceiros, quartos pré-molares e primeiro molar mandibulares extraídos. Após a espera de 2 meses foi realizada a instalação de 8 implantes, seguida da instalação de cicatrizadores, dois meses após. Duas semanas após a instalação dos cicatrizadores, foram instaladas ligaduras ao redor dos implantes para indução da doença peri-implantar. Antes da instalação das ligaduras, foi realizada a coleta de fluido crevicular, seguido da coleta de biofilme submucoso, sendo assim determinado os parâmetros de saúde peri-implantar (t0-inicial). Seis semanas após a instalação das ligaduras foi realizada outra coleta de biofilme submucoso para constatação da evolução da doença peri-implantar (t1-6 semanas). Doze semanas após a instalação das ligaduras, prazo que foi estendido no decorrer do projeto, a doença peri-implantar foi constatada através de radiografias periapicais. Em seguida, foi realizada a remoção das ligaduras e após duas semanas de fase crônica, as regiões foram tratadas. Prévio ao tratamento, foram realizadas nova coleta de fluido crevicular, seguido da coleta de biofilme submucoso, sendo assim determinado os parâmetros de doença peri-implantar (t5-pré-tratamento). Foram quatro tipos de tratamento: nenhum tratamento, descontaminação através de raspagem manual com curetas, descontaminação com raspagem associada TFDa ou descontaminação com raspagem associada à TFDa e ao uso de L-PRF. Após 12 semanas do tratamento, foi feita reabertura para a mensuração clínica dos defeitos, instalação de cicatrizadores estéreis e, após 15 dias, a eutanásia dos animais juntamente com as coletas de biofilme submucoso e fluido crevicular (t7-pós-tratamento). Para caracterização da peri-implantite, foi realizada a análise de citocinas por Luminex (perfil inflamatório), o DNA-DNA Checkerboard (perfil microbiológico) e a avaliação clínica da doença através de sondagens.

Para avaliar o efeito do uso combinado da TFDa associada ou não ao L-PRF, na descontaminação e reparo ósseo dos defeitos peri-implantares foram realizadas análises clínicas de extensão do defeito, micro-CT, e histomorfometria com uma análise qualitativa de score inflamatório.

**Resultados:** Os resultados não demonstraram diferenças estatisticamente significante entre os grupos de tratamento. Em geral, não foi possível detectar ganhos ósseos significantes nas amostras na comparação dos dados lineares, tanto com o uso da microtomografia quanto com a avaliação histomorfométrica. A análise histomorfométrica quantitativa de inflamação demonstrou que o grupo controle negativo apresentou scores aumentados com indícios que podem denotar reabsorção óssea progressiva. A indução da doença, no entanto, foi exitosa com evidências de shift de uma microbiota preponderante compatível com o estágio inicial com evolução para doença peri-implantar e para uma microbiota patogênica ao final da indução.

**Palavras chave:** Peri-implantite, terapia fotodinâmica antimicrobiana, fibrina rica em plaquetas e leucócitos.

*ABSTRACT*

---

## ABSTRACT

Masalskas Martins, BF. **Comparison of the effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on implant decontamination, associated or not with the use of L-PRF in peri-implant defects induced in Minipigs.** 92p. Thesis (PhD) – School of Dentistry of Ribeirao Preto University of Sao Paulo, Ribeirão Preto; 2022.

**Introduction:** To date, there is no gold standard treatment for peri-implantitis, therefore, there is a need to test/establish an effective therapeutic protocol for the decontamination and bone repair of affected implants and, if possible, to enable the regeneration of tissue lost during the disease. The aim of this study was to characterize the microbiological, inflammatory, and clinical profile of peri-implantitis induced in Minipigs and to evaluate the effect of antimicrobial photodynamic therapy (PDT) associated with the use of L-PRF on the decontamination and re-osseointegration of peri-implant defects.

**Materials and Methods:** Eight minipigs had their third, fourth premolars and first mandibular molar extracted. After the 2-month wait, 8 implants were installed, followed by the installation of healers, two months later. Two weeks after the installation of the healers, the ligatures were installed around the implants to induce peri-implant disease. Before the ligatures were installed, crevicular fluid was collected, followed by the collection of submucous biofilm, thus determined by peri-implant health parameters (initial t0). Six weeks after ligature installation, another submucous biofilm collection was performed to verify the evolution of peri-implant disease (t1-6 weeks). Twelve weeks after the ligature's installation, a period that was extended during the project, the peri-implant disease was verified by periapical radiographs. Then, the ligatures were removed and after two weeks of chronicity, the regions were treated. Prior to treatment, a new collection of crevicular fluid was performed, followed by the collection of submucous biofilm, thus determining the parameters of peri-implant disease (t5-pre-treatment). Four treatments were performed: no treatment, decontamination by manual scaling with curettes, decontamination with associated scaling and aPDT or decontamination with scaling and aPDT and the use of L-PRF. After 12 weeks of the treatment, a reopening was made for the clinical measurement of defects, installation of sterile healers and, after 15 days, euthanasia of the animals together with the collections of submucous biofilm and crevicular fluid (t7-post-treatment). To characterize peri-implantitis, luminex cytokine scans (inflammatory profile), DNA-DNA Checkerboard (microbiological profile) and clinical evaluation of the disease through surveys were performed. To evaluate the effect of the combined use of PDT associated or not with L-PRF, on the decontamination and bone repair of peri-implant defects, clinical

analyses of defect extension, micro-CT, and histomorphometry were performed with a qualitative analysis of inflammatory score.

**Results:** The results did not show statistically significant differences between the treatment groups. In general, it was not possible to detect significant bone gains in the samples in the comparison of linear data, both with the use of microtomography and with the histomorphometric evaluation. Quantitative histomorphometric analysis of inflammation showed that the negative control group presented increased scores with indications that may denote progressive bone resorption. The induction of the disease, however, was successful with evidence of shift of a predominant microbiota compatible with the initial stage with progression to peri-implant disease and to a pathogenic microbiota at the end of induction.

**Keywords:** Peri-implantitis, antimicrobial photodynamic therapy, fibrin rich in platelets and leukocytes.

## *LISTA DE FIGURAS*

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho Experimental proposto no estudo	44
Figura 2	Incisão intrasulcular (A); odontosecção (B); retalho suturado (C)	45
Figura 3	(A) Aparência do rebordo 12 semanas após as exodontias; (B) Aspecto do rebordo alveolar após deflexão do retalho de espessura total; (C) Implantes instalados; (D) Distância interimplantar obtida após a instalação; (E) Pós operatório imediato.	46
Figura 4	(A) Cicatrizadores instalados (B) Coleta de periopapers (C) Coleta de biofilme (D) Sondagem clínica (E) instalação de ligaduras.	47
Figura 5	Radiografia periapical após a indução por 6 semanas. A linha azul demarca a plataforma do implante, nota-se uma perda óssea vertical/horizontal, porém ainda discreta, menor que 3mm.	49
Figura 6	Indução após 12 semanas de ligadura. Perda de 1 implante e extensa perda vertical em outros 3. Foto realizada de radiografia processada analogicamente.	49
Figura 7	(A) Aspecto dos implantes antes do rebatimento do retalho; (B) retalho rebatido; (C) Aspecto da região após o uso da TFDa; (D) Membrana de L-PRF em posição; (E) Membrana de L-PRF após ser removida do tubo de ensaio; (F) Retalho suturado	52
Figura 8	Ilustração do método utilizado para a realização das medidas lineares para histomorfometria.	54
Figura 9	Imagens histológicas por grupo, realizadas no laboratório de microscopia da Adams School of Dentistry (UNC - Chapel Hill).	60
Figura 10	(A) Imagem capturada em 1.6x no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; (B) Imagem capturada por meio de escaneamento automático da lâmina em 10x, no laboratório de histologia da Adams School of Dentistry. O escaneamento quadro a quadro possibilitou <i>zoom in</i> e <i>zoom out</i> na imagem, e o balanço de branco automático quadro a quadro possibilita melhor qualidade de imagem.	60
Figura 11	Print screen de tela ilustrando a metodologia utilizada para o score inflamatório modificado: ROI 1- região analisada a nível de sulco; ROI 2- região analisada ao nível ósseo	61
Figura 12	Reconstruções microtomográficas, da esquerda para direita: superfície de contato tecido mineral e implante, reconstrução do bloco, e corte sagital do bloco tridimensional	62
Figura 13	Imagem retirada do estudo citado Monje et al., 2019 representando a classificação dos defeitos peri-implantares.	65

Figura 14	(A) Defeito Cl IIIb – M; (B) Defeito Cl Ib – S; (C) Defeito Cl II – M.	66
Figura 15	Representação gráfica bacteriana antes e após a indução da doença peri-implantar	68
Figura 16	Representação gráfica dos níveis bacterianos pós-tratamento	69
Figura 17	Representação gráfica bacteriana dos tempos experimentais: t0(inicial), t1(6 semanas) e t5 (pré-tratamento). *Os testes estatísticos foram realizados a partir da distribuição de normalidade dos dados. O teste de Friedman foi aplicado para todas as amostras utilizando um nível de significância de 5%. O post-hoc Dunn's foi realizado para comparar a diferença entre os tempos t0-t5 (A-B) para as bactérias #A,ODON1A (p= 0,002) e #C.SHO1a (p=0,02), sendo que A e B são estatisticamente significantes	70
Figura 18	Box-plot representativos dos níveis detectados de citocinas por tempo/grupo (**a e b são diferentes entre si)	74

## *LISTA DE TABELAS*

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Divisão de grupos planejados no início e final do estudo	43
Tabela 2	Medidas lineares histomorfométricas de acordo com os parâmetros (OI-CO; OI-D; C-D) ilustrados na figura 8	59
Tabela 3	Resultados Microtomográficos da comparação intergrupos dos dados lineares (em micrômetros - $\mu\text{m}$ )	63
Tabela 4	Resultados Microtomográficos da comparação entre grupos dos dados lineares (em micrômetros - $\mu\text{m}$ )	64
Tabela 5	Classificação de defeitos infra-ósseos encontrados de acordo com Monje et al, 2019 (n=48, referente as amostras analisadas com o Micro-ct)	66
Tabela 6	Comparação da análise Imunoinflamatória intragrupos	72
Tabela 7	Comparação da análise Imunoinflamatória intergrupos	73
Tabela 8	Comparação dos dados de todos os grupos e avaliação de citocinas pós indução em $\text{pg}/\mu\text{L}$	74

*LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS  
E SÍMBOLOS*

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

TFDa	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ROG	Regeneração óssea guiada
PRF	Fibrina rica em plaquetas
L-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose tumoral
P1	Primeiro Pré-molar
P2	Segundo Pré-molar
P3	Terceiro Pré-molar
P4	Quarto Pré-molar
M1	Primeiro molar
Mm	Milímetro
Mm	Micrometro
%	Porcento
ml	Mililitro
Rpm	Rotação por minuto
PPP	Plasma pobre em plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
Mg/kg	Miligramas por quilograma
Mg/ml	Miligramas por mililitro
ml/kg	Mililitro por quilograma
W/cm <sup>2</sup>	Watts por centímetros ao quadrado
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetros ao quadrado
C-	Controle positivo - descontaminação mecânica
C+	Controle negativo – nenhum tratamento realizado
T1-C	Descontaminação mecânica e Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa)
T2-D	Grupo Descontaminação mecânica e TFDa associada ao uso de L-PRF
UI	Unidade internacional

NaOH	Hidróxido de cálcio
° C	Grau Celsius
RNA	Ácido ribonucleico
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
>	Maior
Micro-ct	Microtomografia Computadorizado
OI-CO	Ombro implante - Crista óssea
OI-CO	Ombro implante - Crista óssea
OI-D	Ombro implante – Defeito
D-C	Defeito – Crista
pg/μL	Picograma/Microlitro
BIC	Superfície de Contato Osso-Implante
TV	Volume Tecidual
BV	Volume ósseo
BV/TV	Percentual de volume ósseo
BS/TV	Densidade de superfície óssea
PO (%)	Porosidade
Tb.Th	Espessura Trabecular
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação trabecular
Conn.Dn	Densidade conjuntiva

## *LISTA DE ANEXOS*

---

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo A	Certificado de aprovação da Comissão de Ética do uso de animais	92
---------	---	----

O presente estudo foi realizado no Biotério II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), no Laboratório de Histologia e no Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Laboratório de Histologia e no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Guarulhos-SP.

Este estudo foi desenvolvido com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número: 2016/10453-0.

## *SUMÁRIO*

---

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	39
2.1 Objetivo Geral.....	40
2.2 Objetivos Específicos.....	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
3.1 Seleção e manejo dos animais.....	42
3.2 Descrição dos Grupos Experimentais.....	43
3.3 Delineamento Experimental.....	43
3.4 Procedimento Experimentais.....	44
3.4.1 Primeira Fase (Cirúrgica): exodontias.....	44
3.4.2 Segunda Fase Cirúrgica: instalação dos implantes.....	45
3.4.3 Terceira Fase Cirúrgica: instalação dos cicatrizadores (Inicial).....	46
3.4.4 Quarta Fase Cirúrgica: indução da doença peri-implantar.....	47
3.4.5 Quinta Fase Cirúrgica: tratamento da peri-implantite induzida (Pré-trat.) .....	50
3.4.5.1 Descrição dos Grupos experimentais por tratamento.....	51
3.4.6 Sexta fase: reabertura e instalação de novos cicatrizadores.....	53
3.5 Eutanásia (Pós-tratamento) .....	53
3.6 Metodologia Laboratorial.....	53
3.6.1 Análise Histomorfométrica.....	53
3.6.2 Análise Microtomográfica computadorizada.....	54
3.6.3 Análise Microbiológica.....	55
3.6.3.1 Hibridização das membranas com as sondas de DNA.....	55
3.6.3.2 Sondas de DNA.....	55
3.6.3.3 Detecção das espécies.....	56
3.6.4 Análise Imunoinflamatória.....	57
3.6.5 Análise Estatística.....	57
<b>4 RESULTADOS</b> .....	58
4.1 Análise Histomorfométrica.....	59
4.2 Análise Microtomográfica Computadorizada.....	62
4.2.1 Classificação dos defeitos peri-implantares.....	65
4.3 Análise Microbiológica.....	67
4.4 Análise Imunoinflamatória.....	71

<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	75
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	81
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	83
<b>ANEXO A</b> .....	92

*INTRODUÇÃO E  
REVISÃO DE LITERATURA*

---

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O uso de implantes dentais na reabilitação oral tem crescido exponencialmente desde a primeira descrição do fenômeno da osseointegração (BRANEMARK; ADEL; BREINE; HANSSON *et al.*, 1969; BRANEMARK; HANSSON BO; ADELL *et al.*, 1977). Os primeiros implantes produzidos para a reabilitação oral possuíam superfície maquinada lisa, e necessitavam de um grande tempo de espera afuncional (de 4 a 6 meses) antes de receber carga mastigatória (BRANEMARK; HANSSON BO; ADELL *et al.*, 1977).

Com o avanço do desenho e da macroestrutura dos implantes que proporcionaram uma maior estabilidade primária, aliados ao tratamento de superfície (microestrutura), o evento da osseointegração tornou-se mais rápido e de maior qualidade, reduzindo o tempo de tratamento até a prótese final (COELHO; BONFANTE; PESSOA *et al.*, 2011). Esses avanços possibilitaram um carregamento funcional precoce ou, muitas vezes, imediato, aumentando a versatilidade deste tipo de tratamento (DEGIDI; IEZZI; SCARANO; PIATTELLI, 2008).

Os frequentes avanços no campo da implantodontia têm difundido cada vez mais a utilização de implantes osseointegrados para a reabilitação de pacientes parcial e totalmente desdentados, constituindo, muitas vezes, o tratamento de primeira escolha para pacientes que sofrem perda de elementos dentais.

Assim como a doença periodontal, a peri-implantite é o resultado do desequilíbrio entre o biofilme peri-implantar e a resposta do hospedeiro às suas agressões (LINDHE; MEYLE; GROUP DOEWOP, 2008). Os principais patógenos peri-implantares são os mesmos responsáveis pela perda de inserção periodontal, caracterizando a peri-implantite como uma infecção anaeróbia mista (BOTERO; GONZALEZ; MERCADO; OLAVE *et al.*, 2005; MOMBELLI; DECAILLET, 2011). Apesar de ter agentes etiológicos semelhantes, a doença peri-implantar parece ter uma progressão mais acelerada devido as diferenças entre os tecidos periodontais e peri-implantares, que não possuem fibras colágenas perpendiculares à superfície do implante, dando acesso direto à inflamação ao tecido ósseo, além da ausência do ligamento periodontal, tendo portanto progressão mais rápida que a periodontite (TOLJANIC; WARD; GEWERTH; BANAKIS, 2001; NOVAES JR.; RAMOS; MUGLIA, 2014; MARTINS; SHIBLI JÁ; ABI-RACHED; MARCANTONIO, 2005).

A prevalência mundial da peri-implantite varia entre 28 a 40% dos indivíduos e de 12 a 43% dos sítios peri-implantares, sendo um problema crescente, visto que o número de

indivíduos que se beneficiam com a reabilitação de próteses implantossuportadas tende a aumentar e, em consequência, o número de implantes/pacientes acometidos pelas doenças peri-implantares (LINDHE; MEYLE, 2008).

A morfologia dos defeitos peri-implantares pode influenciar diretamente no resultado terapêutico pré-estabelecido. Schwarz *et al.*, 2007, por exemplo demonstrou que o tratamento realizado em defeitos peri-implantares circunferenciais, em humanos, resultaram na redução da profundidade de sondagem e no nível de inserção clínica em comparação à outros tipos de defeitos existentes. A caracterização dos defeitos peri-implantares foi realizada de acordo com a morfologia e profundidade do defeito e classificada da seguinte forma (MONJE *et al.*, 2019): classe I: defeito infraósseo (classe Ia: deiscência bucal, classe Ib: 2-3 paredes defeituosas e classe Ic: defeito circunferencial); classe II: defeito supracrestal / horizontal; classe III: defeito combinado (classe IIIa: deiscência bucal + perda óssea horizontal; classe IIIb: 2-3 defeitos nas paredes + perda óssea horizontal e classe IIIc: defeito circunferencial + perda óssea horizontal).

Atualmente não há tratamento padrão ouro para a peri-implantite. O tratamento da mucosite peri-implantar não difere da gengivite, sendo o controle do biofilme bacteriano profissional é suficiente para a resolução da inflamação; e tratamentos adjuvantes não aparentam ter benefício adicional (SALVI; RAMSEIER, 2015). A terapia mecânica não cirúrgica, no entanto, parece não ocasionar nenhum ganho clínico de inserção, nem reduções importantes na microbiota peri-implantar em estudos clínicos aleatorizados (RENVERT; SAMUELSSON; LINDAHL; PERSSON, 2009; PERSSON; SAMUELSSON; LINDAHL; RENVERT, 2010).

A exemplo da raspagem e alisamento radicular (WAERHAUG; HEALING, 1978) o desbridamento não cirúrgico dos implantes osseointegrados com curetas torna-se de difícil execução em consequência dos obstáculos como as espiras, e a própria rugosidade de superfície dos implantes (SUL; JOHANSSON; WENNERBERG; CHO *et al.*, 2005) A rugosidade de superfície, importante para a qualidade e rapidez da osseointegração (WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009) também contribui para maior acúmulo de biofilme (ELTER; HEUER; DEMLING, 2008; TEUGHEL; VAN ASSCHE; SLIEPEN; QUIRYNEN, 2006). O uso de antibióticos apresenta resolução da inflamação, com preenchimento ósseo do defeito e uma fina camada de tecido conjuntivo separando o implante do osso, não restaurando o contato osso-implante (WETZEL; VLASSIS; CAFFESSE; HAMMERLE; LANG, 1999; PERSSON; ARAUJO; BERGLUNDH; GRONDAHL; LINDHE, 1999).

Como a peri-implantite é uma doença de etiologia bacteriana, há diversos métodos de descontaminação descritos na literatura. Usualmente, adaptações feitas de métodos usados

previamente para o tratamento da doença periodontal, associados a descontaminação mecânica da superfície dos implantes e alguns adjuvantes são propostos e testados. Os métodos mais comuns são aplicação tópica de clorexidina 0.12% (WAAL; RAGHOEBAR; HUDDLESTON SLATER *et al.*, 2013; WAAL; RAGHOEBAR; HUDDLESTON SLATER; MEIJER, *et al.*, 2012) uso de antibióticos sistêmicos (HEITZ-MAYFIELD; SALVI; MOMBELLI; FADDY; LANG, 2012). O uso de antibióticos no entanto, e como já citado, não restaura o contato osso-implante (WETZEL; VLASSIS; CAFFESSE; HAMMERLE; LANG, 1999; PERSSON; ARAUJO; BERGLUNDH; GRONDAHL; LINDHE, 1999). Apesar dos inúmeros protocolos, há poucos dados sobre a regeneração óssea decorrente de cada método de descontaminação. O uso indiscriminado dos antibióticos sistêmicos ainda é uma grande preocupação devido a seleção e permanência de bactérias multirresistentes, nota-se uma desvantagem clínica e microbiológica assim como o risco de superinfecções pelo uso incorreto de sua utilização (LEVY; MARSHALL, 2004). Assim, outras alternativas como a Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem crescido exponencialmente na substituição dos antibióticos sistêmicos já utilizados (VERDUGO; LAKSMANA; URIBARRI, 2016; RAMS; DEGENER; VAN WINKELHOFF, 2014).

Nota-se, portanto, a necessidade do estabelecimento de um protocolo de tratamento que seja efetivo na descontaminação e recuperação do tecido de suporte perdido em razão da doença. Os tecidos recuperados devem idealmente apresentar reestabelecimento do contato osso implante próximo ao original (RENVERT; POLYZOIS; MAGUIRE, 2009) definido como a formação de novo osso em uma superfície de implante previamente contaminada. Os preceitos de regeneração tecidual guiada, especificamente a regeneração óssea guiada mostra-se interessante no contexto de reestabelecimento da estrutura tecidual perdida. A total descontaminação da superfície mostrou-se primordial para a ocorrência da re-osseointegração (PERSSON; ERICSSON; BERGLUNDH; LINDHE, 2001). O tratamento das lesões peri-implantares ainda não está bem estabelecido, inúmeras estratégias têm sido propostas, mas nenhuma apresenta resultados expressivos na resolução das lesões (ESPOSITO; GRUSOVIN; COULTHARD; WORTHINGTON, 2008). Sendo assim, não há na literatura um protocolo de tratamento específico ao qual se possa confiar para a resolução de casos de peri-implantite (ESPOSITO; GRUSOVIN; COULTHARD; WORTHINGTON, 2006). Os tratamentos mecânicos até então propostos não parecem mostrar diferença quanto à efetividade na re-osseointegração (SCHWARZ; SAHM; IGLHAUT; BECKER, 2011).

Para isso a descontaminação das superfícies e a remoção dos lipopolissacarídeos responsáveis pela agressão ao tecido do hospedeiro mostra-se fundamental (ESPOSITO;

GRUSOVIN; COULTHARD; WORTHINGTON, 2008). Um estudo demonstrou que recolocação de componentes estéreis em sítios com peri-implantite previamente instalada permitiu a re-osseointegração das peças de titânio, comprovando que a ausência do agente etiológico (biofilme) é primordial para a regeneração do tecido peri-implantar perdido (PERSSON; ERICSSON; BERGLUNDH; LINDHE, 2001). Na literatura existem relatos do uso da clorexidina como adjuvante ao tratamento mecânico da superfície dos implantes, porém sem alcançar otimização de resultados, apesar de sua eficácia em estudos *in vitro* (GOSAU; HAHNEL; SCHWARZ; GERLACH *et al.*, 2010; SAHM; BECKER; SANTEL; SCHWARZ, 2011).

O uso de consagrados condicionadores radiculares em periodontia como ácido cítrico (WIKESJO; CLAFFEY; NILVEUS; EGELBERG, 1991), EDTA (LASHO; O'LEARY; KAFRAWY, 1993) e tetraciclina (TERRANOVA; FRANZETTI; HIC, 1986) tem sido descrito para o tratamento da peri-implantite (PARK, 2012; HANISCH; TATAKIS; BOSKOVIC; ROHRER, 1997). A maior parte desses agentes são utilizados na superfície radicular devido às suas propriedades quelantes, de remoção da *smear layer* e exposição das fibras colágenas dentinárias (WIKESJO; BAKER, 1986), o uso em implantodontia justifica-se devido a propriedade de remoção de *debris* remanescentes da descontaminação mecânica. O cloridrato de tetraciclina, em particular, apresenta substantividade antimicrobiana, sendo usado, por vezes, como antimicrobiano local (STABHOLZ; KETTERING; APRECIO; ZIMMERMAN *et al.*, 1993; SACHDEVA; AGARWAL, 2011).

Recentemente, apontou-se a importância da não exposição precoce dos implantes nos resultados regenerativos (SCHWARZ; SAHM; MIHATOVIC; GOLUBOVIC *et al.*, 2011). Implantes expostos precocemente devido a deiscência do retalho ou fenestração durante o período de cicatrização demonstraram índices de contato osso-implante muito abaixo da média de implantes não expostos.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem como princípio a erradicação de células alvo através da utilização de um fotossensibilizador e uma fonte luminosa de comprimento de onda apropriado (WAINWRIGHT, 1998). Esta modalidade terapêutica foi desenvolvida para o tratamento de neoplasias, porém vários microrganismos, inclusive espécies encontradas na cavidade oral, podem ser eliminadas através dela (PACKER; BHATTI; BURNS; WILSON, 2000). Além disso, alguns fatores de virulência como lipopolissacarídeos e proteases podem ser reduzidos através da fotossensibilização (KOMERIK; WILSON; POOLE, 2000). Além disso, a TFDa mostrou eficácia na inativação de citocinas pró-inflamatórias, importantes na destruição

tecidual com a vantagem de não utilizar nenhum antibiótico sistêmico (BRAHAM; HERRON; STREET; DARVEAU, 2009).

A administração de um fotossensibilizador, que se une aos microrganismos alvo, permite diferenciar as células bacterianas dos tecidos do hospedeiro. Dessa forma, a técnica de fotossensibilização letal pode ser hábil em preencher o requisito mais importante de um agente terapêutico – a capacidade de destruir microrganismos responsáveis pela doença, sem causar danos aos tecidos do hospedeiro (QIN; LUAN; BI et al, 2008).

A TFDa tem um efeito bactericida local, extremamente rápido e atividade antimicrobiana seletiva, minimizando a destruição da microflora de outros sítios. Seu uso clínico tem demonstrado eficácia na melhora de parâmetros clínicos periodontais (BRAUN; DEHN; KRAUSE; JEPSEN, 2008; LULIC; LEIGGENER GOROG; SALVI; RAMSEIER *et al.*, 2009). O uso da TFDa no tratamento não cirúrgico da peri-implantite induzida mostrou-se igual ao tratamento cirúrgico sem o uso adjunto de outro agente descontaminante (HAYEK; ARAUJO; GIOSO, 2005). Quando associada ao tratamento cirúrgico com desbridamento mecânico e a Regeneração Óssea Guiada (ROG), demonstrou maior sucesso que apenas o desbridamento mecânico e ROG (MARTINS; SHIBLI; ABI-RACHED; MARCANTONIO, 2005). Em um estudo prévio, de nosso grupo, a terapia fotodinâmica antimicrobiana em um protocolo de aplicação única foi eficaz na redução bacteriana de lesões de peri-implantite induzida em cães, quando utilizada a solução de cloreto de fenotiazina 10mg/ml e a aplicação do laser diodo vermelho 10 segundos por sítio, demonstrando reduções importantes de bactérias dos complexos vermelho e laranja (RAMOS; SUAID; WIKESJÖ; SUSIN *et al.*, 2018). Em outro estudo realizado por nosso grupo, o uso da TFDa, com o mesmo fotossensibilizador e fonte luminosa, diferindo apenas no tempo de irradiação (30 segundos/sítio), confirmou uma maior redução dos complexos vermelho e laranja, quando comparado a tetraciclina. Neste mesmo estudo, notou-se que, apesar da descontaminação e resolução do processo inflamatório, verificado através de histomorfometria, outros fatores foram importantes no ganho ósseo e reosseointegração obtidas pelo tratamento. A ocorrência de exposição precoce do implante no pós cirúrgico foi fortemente correlacionada com a ausência de ganho ósseo e reosseointegração. Somado a isso notou-se uma variabilidade grande de morfologia dos defeitos, com um grande número de perdas ósseas horizontais, que constitui um grande desafio para a regeneração. Apesar desta variabilidade ser característica das lesões induzidas com progressão natural, grande ocorrência de defeitos horizontais se deu pelo reduzido tamanho dos animais utilizados neste trabalho (RAMOS; SUAID; WIKESJÖ ULF; SUSIN *et al.*, 2017)

O uso de matriz de fibrina autóloga, também conhecida como Fibrina rica em Plaquetas (PRF), tem sido estudada como tratamento adicional ao uso de enxerto ósseos na odontologia (CHOUKROUN; DISS; SIMONPIERI, 2006). Sua ação, ou plausibilidade biológica vem sendo estudada de forma intensa nos últimos anos (CHOUKROUN; DISS; SIMONPIERI, 2006; PANDA; DORAISWAMY; MALAIAPPAN; VARGHESE SS; DEL FABBRO, 2014). Quando utilizado juntamente com implantes osseointegrados, o PRF aumenta a densidade mineral óssea ao redor dos implantes (CHO; LEE; PARK; AHN, 2014). Somado a isso, os extratos de PRF apresentam quantidades significativas de leucócitos, que estimulam os mecanismos de defesa para infecção (DOHAN; CHOUKROUN; DISS, 2006). Em lesões infecciosas peri-implantares, o uso de PRF pode ser um importante fator adicional ao tratamento, funcionando tanto como fonte de fatores de crescimento, quanto de estímulo para a defesa do organismo, sendo uma opção potencial para se reduzir a exposição precoce de implantes e possivelmente a taxa de re-osseointegração.

A matriz de Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) na qual é incorporada uma grande quantidade de plaquetas durante a centrifugação do sangue, possui todos os componentes de uma amostra de sangue favorável para a regeneração e imunidade. O L-PRF tornou-se coadjuvante ao tratamento de várias técnicas regenerativas, pois acelera o processo de cicatrização devido a presença de fatores de crescimento e a principal vantagem é a relação custo-benefício, utilizando o próprio sangue do paciente diminuindo as reações autoimunes e transmissão de doenças.

O estudo dos efeitos biológicos do tratamento da peri-implantite são realizados em animais de médio porte, usualmente cães, e tem um padrão de doença bem estabelecido na literatura (BERGLUNDH; LINDHE; MARINELLO; ERICSSON; LILJENBERG, 1992; SENNERBY; PERSSON; BERGLUNDH; WENNERBERG; LINDHE, 2005). No entanto, o uso do cão como modelo animal tem entrado em desuso devido a recentes incidentes envolvendo canis criadores e sociedades de proteção animal. O uso de Minipigs tem sido reportado como um bom substituto ao modelo canino, apresentando lesões similares às encontradas em humanos (SCHWARZ; HERTEN; SAGER; BIELING et al., 2007). O modelo de peri-implantite experimental em suínos ainda se encontra pouco caracterizado (SINGH; ONEAL; BRENNAN; STRONG, 2003) quando comparado ao canino, poucos estudos foram feitos, porém o uso de Minipigs parece promissor para a substituição do uso de cães em estudos de prova de conceito em periodontia e implantodontia. A microbiota oral suína foi caracterizada em situações de saúde por meio da técnica de amplificação ribossomal (BECKER; DOERFER; GRAETZ; DE BUHR *et al.*, 2011). As características da microbiota peri-implantar em

situações de peri-implantite induzida demonstraram uma predominância de anaeróbios estritos, incluindo bactérias de pigmentação negra, quando analisados em cultura (HICKEY; O'NEAL; SCHEIDT; STRONG et al., 1991). No entanto o padrão de perda óssea ainda não foi estabelecido neste modelo, apesar da perda óssea ter sido comprovada quando a peri-implantite é induzida por ligaduras de seda (HICKEY; O'NEAL; SCHEIDT; STRONG et al., 1991; STUBINGER; BUCHER; KRONEN; SCHLOTTIG; VON RECHENBERG, 2016).

É incumbência, portanto, além de se caracterizar o padrão de perda óssea, caracterizar o perfil microbiológico e inflamatório característico da progressão da peri-implantite em modelo suíno. Somado a isso, analisar o efeito do tratamento na resolução da inflamação/infecção, e suas consequências na regeneração dos tecidos perdidos devido a peri-implantite.

*OBJETIVOS*

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil microbiológico, inflamatório e o padrão de perda óssea consequentes da doença peri-implantar induzidas com ligaduras em modelo suíno. Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada ao uso de L-PRF na descontaminação e reparo ósseo de defeitos peri-implantares induzidos em Minipigs.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil microbiológico de peri-implantite induzida por ligaduras em Minipigs através do método de Checkerboard;
- Caracterizar o perfil inflamatório de peri-implantite induzida por ligaduras em Minipigs através da análise de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) através de tecnologia Luminex  $\text{\textcircled{R}}$  Multiplex;
- Avaliar o padrão ósseo através da análise dos tipos de defeitos consequentes da indução de doença com ligaduras;
- Avaliar o efeito do uso combinado da TFDa e L-PRF, na descontaminação e reparo ósseo de defeitos peri-implantares através de análises clínicas de extensão do defeito, microtomografia computadorizada, e avaliação histomorfométrica.
- Avaliar o *score* inflamatório somado ou não à atividade osteoclástica através de análise qualitativa.

# *MATERIAIS E MÉTODOS*

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção e manejo dos animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto (2016.1.836.58.0).

Foram selecionados oito (8) Minipigs, machos, adultos jovens com idade aproximada de 18 meses e pesando entre 100 e 150 Kg, com maxila e mandíbula intactas, sem trauma oclusal generalizado, lesões virais ou fúngicas. Os animais foram comprados de um criadouro de Minipigs: Minipig Pesquisa e Desenvolvimento LTDA – ME, localizado em Campina do Monte Alegre-SP. Além disso, os animais apresentavam boa saúde geral sem nenhum envolvimento sistêmico relevante. Previamente ao início dos procedimentos, os Minipigs foram imunizados e receberam tratamento antiparasitário e profilaxia dental para remoção de biofilme bacteriano. Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia geral e condições assépticas. Os Minipigs foram pré-anestesiados com Zolazepam a 10% (Zoletil® -Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Brasil) na concentração de 0,10ml/Kg e Acepromazina (Acepran®-Vetnil-Comercio de Produtos Veterinários Ltda, Brasil) na concentração 2%. A manutenção da anestesia foi obtida através de anestésico volátil, e os animais foram submetidos à intubação traqueal com uma sonda para adaptação de um dispositivo e administração do gás de Isoflurano (Isoforine® - Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil), oxigênio diluído volátil-2V%. Adicionalmente, anestésias locais foram realizadas nas regiões dos pré-molares inferiores (P1, P2, P3, P4 e M1). Nos cuidados pós-operatórios, Cloridato de Tramadol - 50mg/ml (EMS, Brasil) foi usado na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, e Cetoprofeno - 20mg (Medley, Brasil) na dosagem de 1 comprimido/20 kg foi utilizado como anti-inflamatório.

Os animais receberam Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial Saude Animal Ltda, Paulinia, SP, Brazil), na dosagem de 1 comprimido/10 kg, por 10 dias, iniciando 24hs antes do procedimento, como terapia antibiótica na primeira e segunda etapa cirúrgica (exodontia e instalação dos implantes). Os animais foram mantidos com uma dieta leve por pelo menos 15 dias após os procedimentos cirúrgicos e a cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente. Dentro dos primeiros dias após as intervenções, acréscimos analgésicos foram realizados quando necessário. Todo o desenvolvimento do estudo tiveram acompanhamento e monitoramento por um veterinário qualificado e todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um pesquisador com experiência cirúrgica em animais de médio porte.

### 3.2 Descrição dos Grupos Experimentais

Neste estudo, cada animal recebeu 4 implantes por hemiarco, portanto 8 implantes por Minipig, totalizando 64 implantes ao final. Em decorrência de complicações da anestesia, foram perdidos 3 animais, um na primeira fase cirúrgica (exodontia) e os outros dois durante o protocolo de indução da doença a fim de verificar sua progressão. Os dados de 24 implantes referentes a estes animais foram excluídos das tabelas de dados, já que estes animais foram perdidos no início do projeto.

Ao início do tratamento, um animal perdeu 2 implantes por hemi-mandíbula, provavelmente pela evolução da doença peri-implantar. Seguiu-se a aleatorização nos 4 implantes restantes, e os dados anteriores também foram excluídos da tabela.

Portanto, restou ao final do projeto: 4 Minipigs, com 8 implantes cada e 1 minipig, com 4 implantes, totalizando 36 implantes. Cada grupo experimental ficou ao final do projeto com 9 implantes.

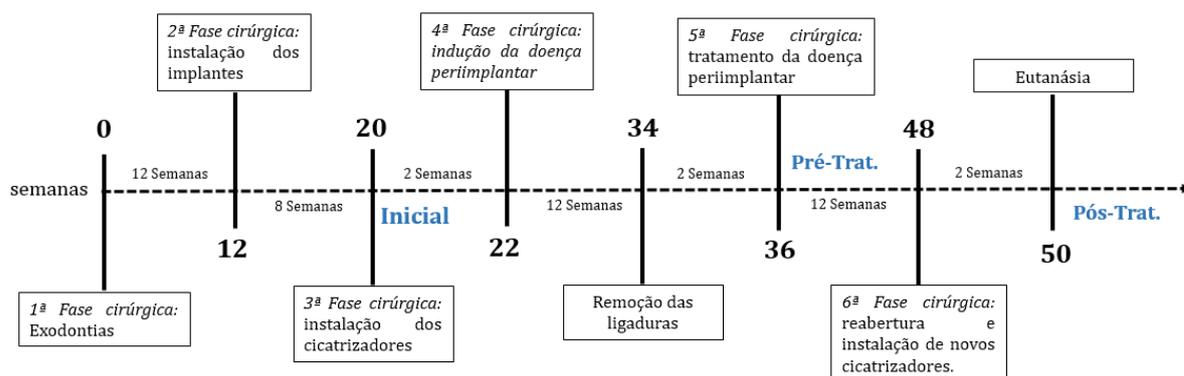
### 3.3 Delineamento experimental

Neste estudo modelo boca dividida, foram incluídos 8 Minipigs. Cada hemi arco mandibular de cada animal recebeu 4 implantes de titânio após as extrações de três dentes (P3, P4 e M1), totalizando 8 implantes por minipig e 64 implantes no total de todos os animais.

Após a fase de indução da doença peri-implantar, cada grupo experimental recebeu um tipo de tratamento, dentre os quatro tratamentos que foram descritos a seguir. A randomização (seed 133088242869237 randomization.com) foi realizada entre os 8 implantes de cada animal, resultando em 2 implantes para cada grupo de tratamento (tabela 1).

**Tabela 1.** Divisão de grupos planejados no início e final do estudo

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Total Implantes por animal</b>	<b>Total Implantes por grupo (inicial)</b>	<b>Total Implantes por grupo (final)</b>
C-	Sem tratamento	02	16	9
C+	Descontaminação mecânica	02	16	9
Teste 1	Descontaminação mecânica + TFDa	02	16	9
Teste 2	Descontaminação mecânica + TFDa+ L-PRF	02	16	9
<b>Total de implantes do estudo</b>			<b>64</b>	<b>36</b>



**Fig. 1** - Desenho Experimental proposto no estudo

### 3.4 Procedimento Experimentais

#### 3.4.1 Primeira Fase Cirúrgica: exodontias

Após adequação da cavidade bucal, assepsia com Digluconato de Clorexidina (Rioquímica, Brasil) a 2% (LEE; SUSIN *et al.*, 2013) e anestésias locais, foram realizadas incisões intra-sulculares (fig. 2A) e elevação de retalhos mucoperiosteais bilaterais do terceiro e quarto pré-molares e do primeiro molar mandibulares (SUSIN; STADLER *et al.*, 2019).

Os terceiros pré-molares foram seccionados ao meio, no sentido véstíbulo-lingual a partir da região de bifurcação, possibilitando a extração individual das raízes mesial e distal; os quartos pré-molares tiveram sua secção distal dividida mesio/distal de forma a separá-la em duas partes; o primeiro molar foi dividido véstíbulo/lingualmente e as secções restantes divididas mesio/distal de forma a dividir suas 4 raízes (fig. 2B).

Por fim, os retalhos foram posicionados e suturados (fig. 2C) com fio não absorvível de nylon 4.0 (J&J ETHICON, Brasil). Quinze dias após, os animais foram avaliados para assepsia da cavidade oral com Digluconato de Clorexidina 2% e remoção das suturas.

Nos cuidados pós-operatórios, Cloridrato de Tramadol (50mg/ml) foi administrado na dosagem de 3mg/kg, a cada 12 horas como terapia analgésica, e Cetoprofeno (20mg) na dosagem de 1 comprimido/20 kg foi utilizado como anti-inflamatório. Os animais receberam Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial Saude Animal Ltda, Paulínia, SP, Brazil), na dosagem de 1 comprimido/10 kg, por 10 dias como terapia antibiótica, iniciando 24hs antes do procedimento. Os animais foram mantidos com uma dieta leve por pelo menos 15 dias, e a cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente.

Nesta fase, os animais não apresentaram nenhum problema pós-operatório tal como deiscência de retalho ou infecção pós-operatória. Durante o procedimento cirúrgico um animal veio a óbito devido a complicações trans-operatórias decorrentes da pré-anestesia/anestesia. A

partir deste momento, contratamos um veterinário (com maior experiência no modelo) para acompanhar os experimentos/treinar o veterinário contratado pela Universidade.

A intubação dos animais nesta fase foi complexa, o que alongou o tempo cirúrgico. Para futuros projetos envolvendo uso do mesmo modelo, é mister a contratação/treinamento de equipe veterinária para o modelo suíno.



**Fig. 2** - Incisão intrasulcular (A); Odontosecção (B); retalho suturado (C)

#### 3.4.2 Segunda Fase Cirúrgica: instalação dos implantes.

Para a realização da segunda intervenção cirúrgica foram aguardados 12 semanas de período cicatricial inicial (fig. 3A)

Os procedimentos de sedação e anestesia foram repetidos sem demais intercorrências e incisões horizontais sobre a crista dos rebordos foram realizadas estendendo-se da distal do segundo pré-molar à região mesial do segundo molar (fig. 3B).

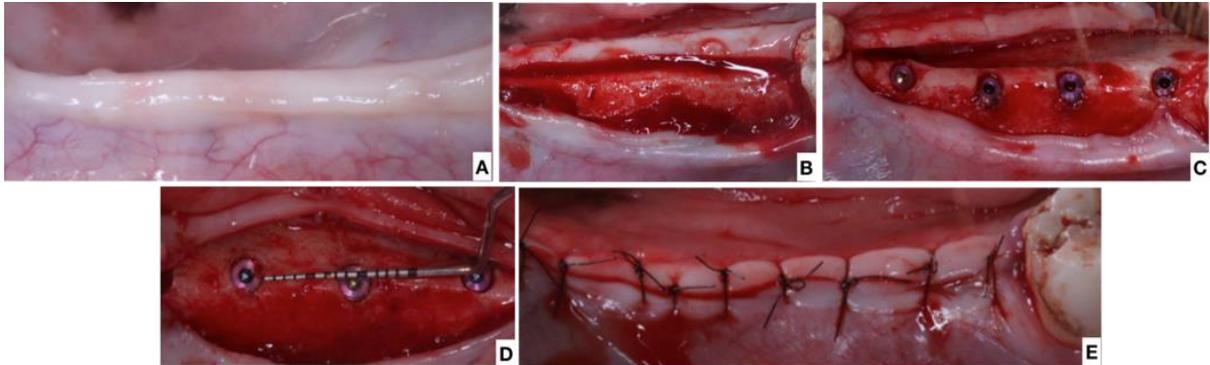
Após a elevação dos retalhos mucoperiosteais, quatro (4) implantes de 3.3 X 10.0 mm (Intra-Lock System®, São Paulo, Brasil) foram instalados em cada hemi-mandíbula, de cada animal (fig. 3C), totalizando 8 implantes por animal e 56 implantes no total (excluindo-se o animal que veio a óbito na fase 1).

Os implantes foram instalados ao nível da crista óssea com uma distância de 7,0 mm (fig. 3C e 3D) entre cada um deles (o espaço do rebordo foi de aproximadamente 45mm mesio/distal e vestibulo/lingual variou de 5 a 12 mm, em média).

Nesta fase não ocorreram fenestrações ósseas significativas. Quando ocorreram, mediam menos de 1 mm de altura e foram solucionadas com uma posição mais apical do implante, seguida de remoção óssea com cinzel de ação reversa até a cabeça do implante estar ao nível ósseo.

Após o posicionamento dos implantes os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de nylon 4-0 (fig. 3E). Nos cuidados pós-operatórios, Cloridato de Tramadol (50mg/ml) foi usado na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, e Cetoprofeno 20mg na dosagem de 1 comprimido/20 kg foi utilizado como anti-inflamatório. Os animais

receberam Stomorgyl na dosagem de 1 comprimido/10 kg, por 10 dias como terapia antibiótica, iniciando 24hs antes do procedimento

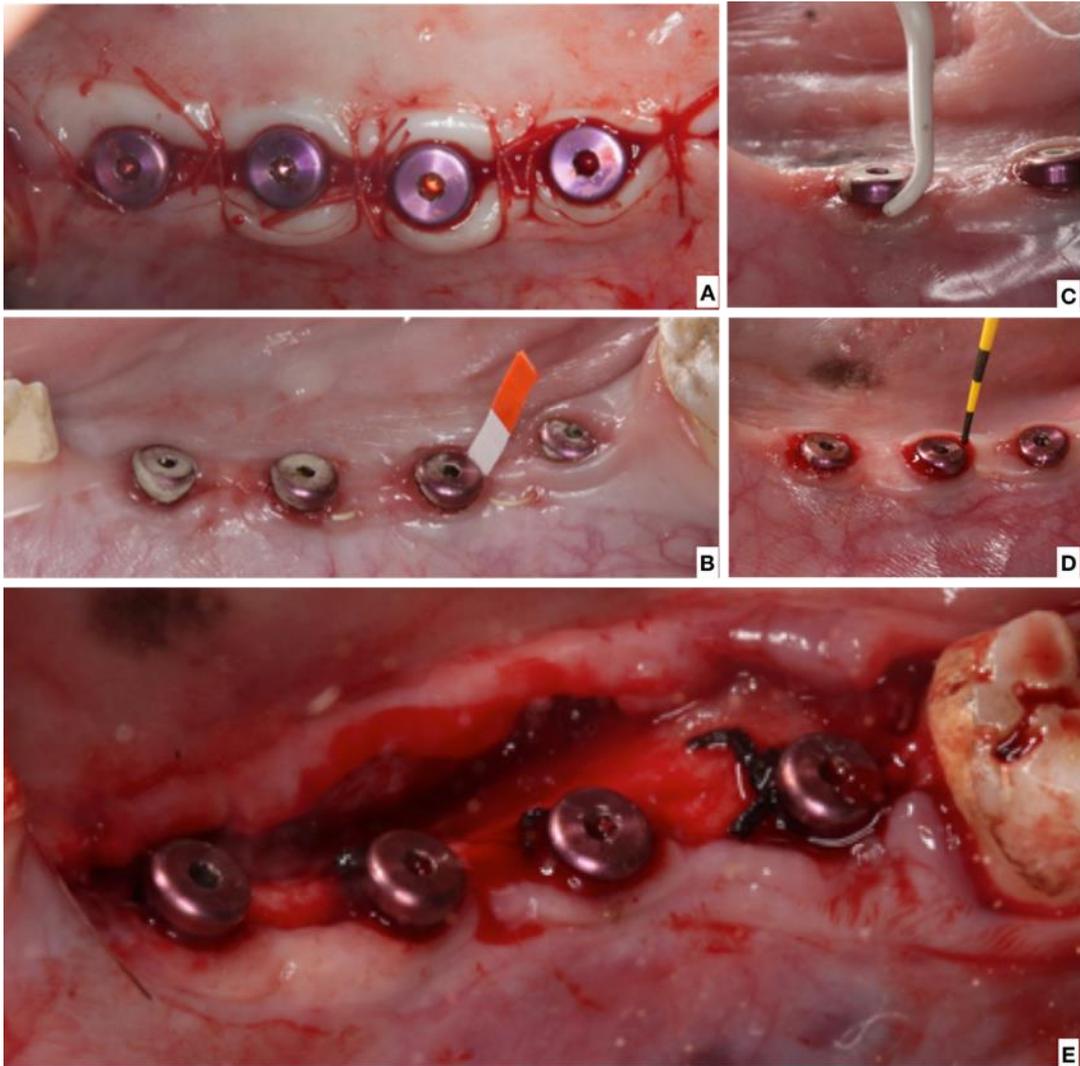


**Fig. 3** - (A) Aparência do rebordo 12 semanas após as exodontias; (B) Aspecto do rebordo alveolar após deflexão do retalho de espessura total; (C) Implantes instalados; (D) Distância interimplantar obtida após a instalação; (E) Pós operatório imediato.

#### 3.4.3 Terceira Fase Cirúrgica: instalação dos cicatrizadores (Inicial)

Após um período de 2 meses de espera para a osseointegração dos implantes, foram instalados cicatrizadores (fig. 4A). Duas semanas após a instalação dos cicatrizadores, foram realizadas as coletas (Inicial) de *periopapers*, um por sítio, pelo tempo de 1 minuto, total de 4 sítios por implante; *periopapers* contaminados com sangue foram descartados e recoletados (fig. 4B), de biofilme subgingival (fig. 4C) e sondagem (fig. 4D) com o fim de estabelecer os níveis de saúde (t0 – inicial).

Ligaduras intra-suculares (apicais a margem muco-peri-implantar) com fio de seda 3-0 (J&J ETHICON, Brasil), foram instaladas ao redor dos cicatrizadores (RAMOS *et al.*, 2017), associados (fig. 4E) a uma dieta pastosa para maior acúmulo de biofilme. Tecnicamente as ligaduras neste modelo experimental são mais difíceis de serem instaladas do que nos cães, principalmente pelos implantes se posicionarem bem mais distal à comissura labial do que nos cães. Nesta fase o uso de Stomorgyl como terapia antibiótica foi suspenso.



**Fig. 4** - (A) Cicatrizadores instalados (B) Coleta de periopapers (C) Coleta de biofilme (D) Sondagem clínica (E) Instalação de ligaduras

#### 3.4.4 Quarta Fase Cirúrgica: indução da doença peri-implantar

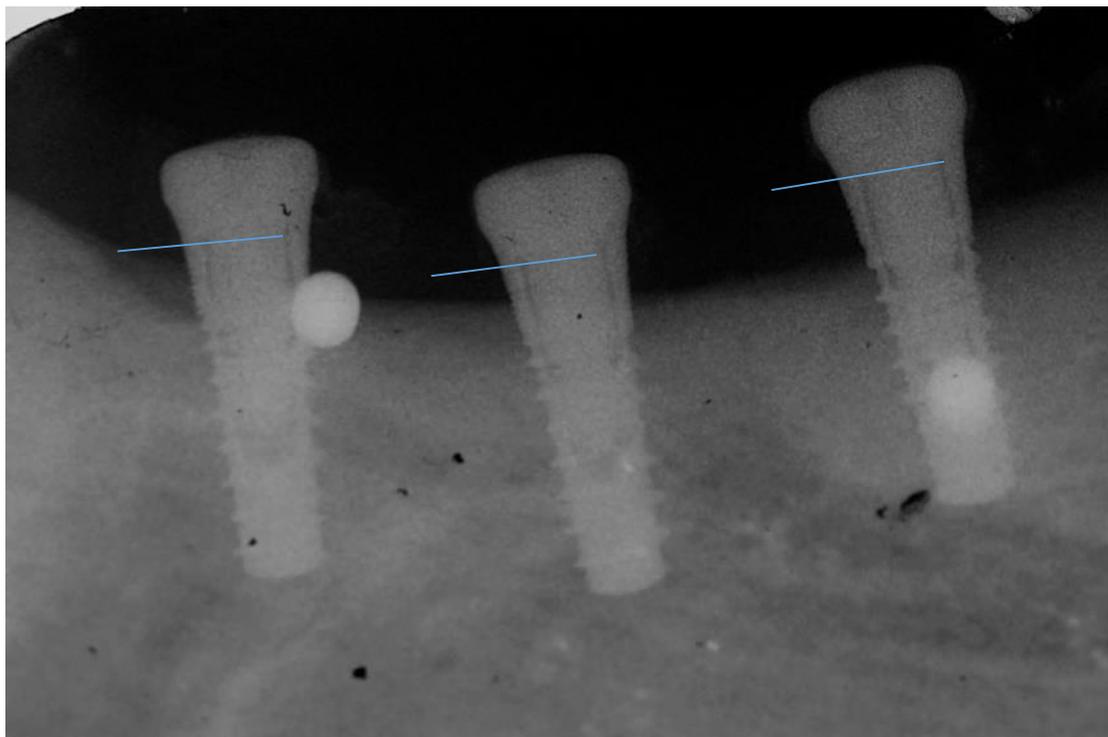
A peri-implantite experimental foi induzida ativamente por 6 semanas similar a metodologia do uso de ligaduras de metal, porém utilizando ligaduras com fio de seda como descritas na literatura de modelo canino, protocolo previamente publicado por outros autores em um estudo com Micropigs (SINGH; O'NEAL *et al.*, 1993), repetido com o uso de ligaduras de metal recentemente em Minipigs (RODRIGUEZ *et al.*, 2018), e que segue a extensa literatura existente com o modelo canino (KANTARCI; HASTURK *et al.*, 2015; NAMGOONG KIM *et al.*, 2015, RAMOS; SUAID *et al.*, 2017; RAMOS; SUAID *et al.*, 2018). Após o término do procedimento de indução da doença peri-implantar, nos cuidados pós-operatórios, Cloridato de Tramadol (50mg/ml) foi usado na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, sem nenhum tipo de intervenção antibiótica sistêmica.

Por terem diâmetro reduzido e grande distância interimplantar, esperava-se que os defeitos formados durante a indução da doença possuísem componentes infra-ósseos. No entanto, quando radiografias periapicais foram realizadas com o fim de apenas verificar a progressão da doença (fig. 5), foram realizadas coletas de biofilme submucoso (t1 – 6 semanas) e notou-se uma discreta perda óssea de menos de 3mm, ou 30% do comprimento total do implante e os pesquisadores decidiram permanecer com a ligadura por 6 semanas adicionais, totalizando 12 semanas de ligaduras e mais 2 semanas adicionais para aguardar o processo da inflamação crônica, completando ao final 14 semanas.

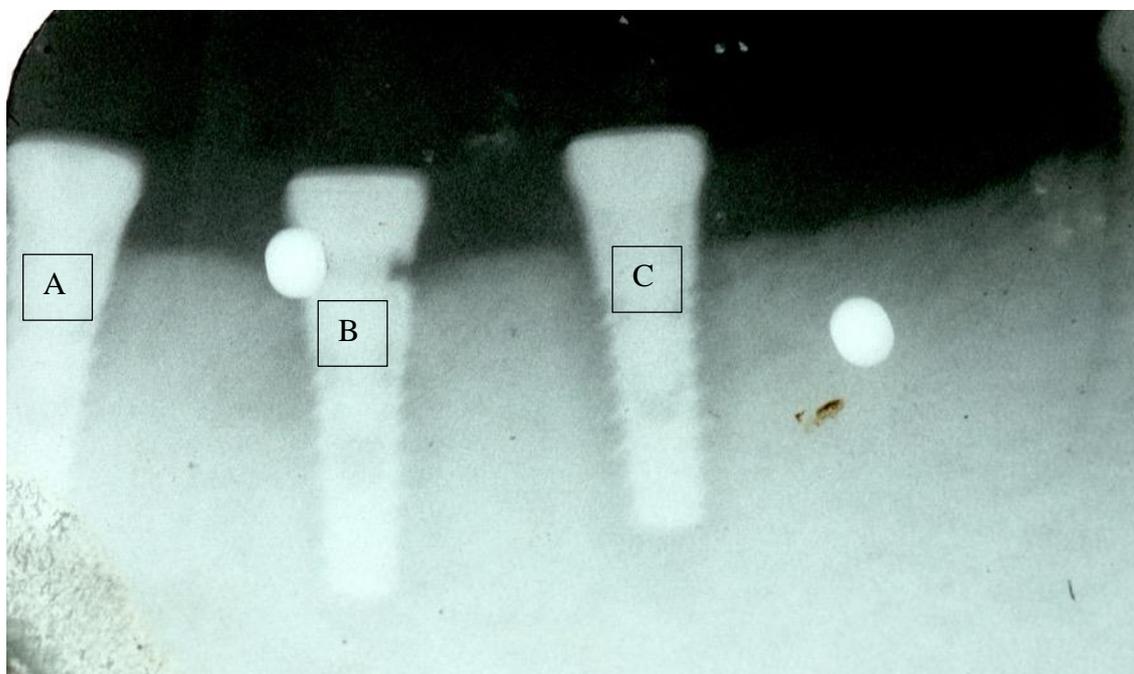
Após o período adicional, dois animais exibiram implantes com perda óssea extensa, chegando inclusive às proximidades do ápice do implante (fig. 6, implante C), além 4 perdas de implantes, enquanto outros três animais apresentaram aumento moderado (menores que 1mm de aumento) do tamanho dos defeitos e, ao final da indução obtivemos uma média de 3.15mm de defeito corono-apical, incluindo componentes infra e supraósseos.

Tendo em vista as duas perdas de animais ocorridas durante as anestésias para a verificação da perda óssea decorrente da indução da peri-implantite experimental, em decisão conjunta com o corpo veterinário participante do estudo, optou-se pela remoção das ligaduras e aguardou-se o desenvolvimento do processo crônico da doença para posterior tratamento. Esta decisão foi tomada visando evitar o prolongamento do estudo, o que significaria maior quantidade de anestésias dos animais incorrendo em maior risco de perdas adicionais de animais, o que inviabilizaria totalmente o estudo.

Durante a fase de tratamento os defeitos foram medidos transcirurgicamente e demonstraram ter, em média, pelo menos 3mm de extensão apico-coronal, o que equivale a 30% do implante.



**Fig. 5** - Radiografia periapical após a indução por 6 semanas. A linha azul demarca a plataforma do implante, nota-se uma perda óssea vertical/horizontal, porém ainda discreta, menor que 3mm



**Fig. 6** - Indução após 12 semanas de ligadura. Perda de 1 implante e extensa perda vertical em outros 3. Foto realizada de radiografia processada analogicamente

Após este período, foi realizada a remoção das ligaduras para posterior processo crônico da doença por 2 semanas adicionais totalizando 14 semanas de indução. Desta fase em diante (desde a instalação das ligaduras), nenhum antibiótico sistêmico foi utilizado.

#### 3.4.5 Quinta Fase Cirúrgica: tratamento da peri-implantite induzida (Pré-tratamento)

Após o período das fases da doença, aguda e crônica, os sítios se encontravam com inflamação abundante e sangramento, porém sem presença de supuração evidente (fig. 7A).

Foram realizadas as coletas (t5 – pré-tratamento) de *periopapers*, um por sítio, pelo tempo de 1 minuto, total de 4 sítios por implante; *periopapers* contaminados com sangue foram descartados e recoletados de biofilme subgingival e sondagem com o fim de estabelecer os níveis pós indução da doença peri-implantar.

Uma incisão intrasulcular foi realizada e um retalho total foi rebatido, evidenciando os defeitos circulares/horizontais (fig. 7 B). Após a remoção do tecido de granulação, os tratamentos foram realizados de acordo com a randomização (seed 133088242869237 randomization.com). As imagens referentes aos tratamentos se encontram na fig. 7 C-F.

##### 3.4.5.1 Descrição dos Grupos experimentais por tratamento:

- GRUPO (C-): sem tratamento, controle negativo;
- GRUPO (C+): descontaminação mecânica (raspagem e alisamento da superfície peri-implantar com curetas de titânio); controle positivo;
- GRUPO Teste 1: descontaminação mecânica (raspagem e alisamento da superfície peri-implantar com curetas de titânio) + TFDa;
- GRUPO Teste 2: descontaminação mecânica (raspagem e alisamento da superfície peri-implantar com curetas de titânio) + TFDa + L-PRF.

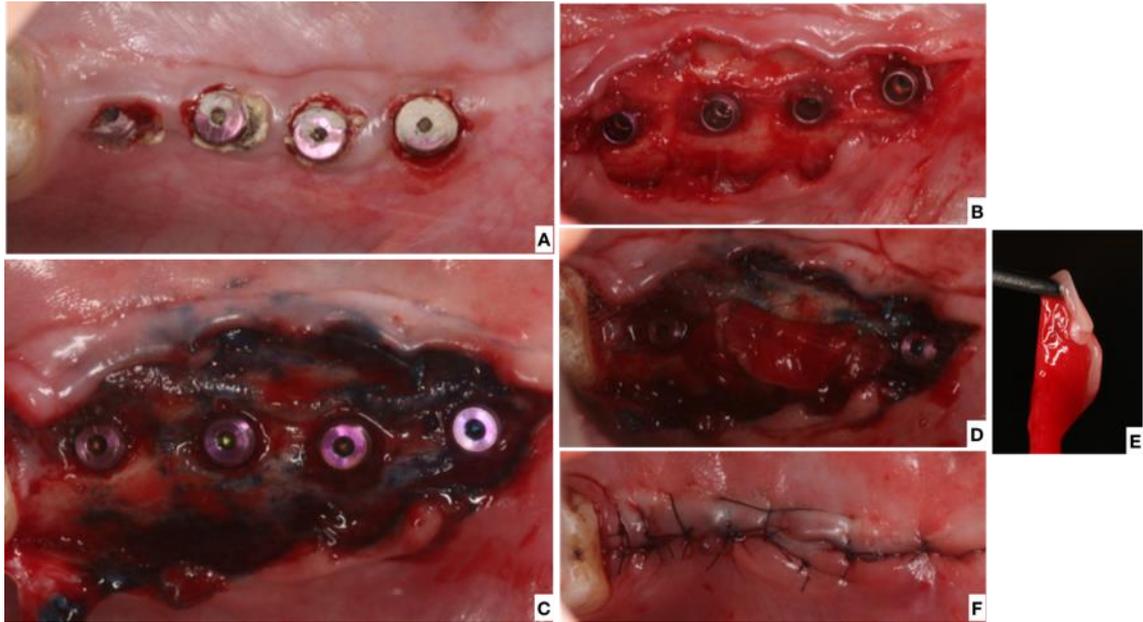
Cada animal apresentava 4 implantes em cada lado da mandíbula, totalizando 8 implantes. A aleatorização foi realizada por animal, sendo assim, dois implantes não receberam nenhum tratamento (GRUPO C-). Dois implantes receberam descontaminação mecânica com curetas (GRUPO C+). Dois implantes receberam descontaminação mecânica + TFDa (GRUPO Teste 1). Dois implantes receberam descontaminação mecânica + TFDa+ L-PRF (Grupo Teste 2).

O sistema de TFDa consiste em um laser de diodo de mão (HELBO minilaser 2075 F dent, HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria) com bateria recarregável. O comprimento de onda selecionado foi de 660nm com uma potência de 0.06

W/cm<sup>2</sup> por 60 segundos e fluência de 212.23 J/cm<sup>2</sup>. O corante utilizado foi uma solução comercial de cloreto de fenotiazina (HELBO Blue Photosensitizer<sup>®</sup>, HELBO Photodynamic Systems) confeccionada pelo mesmo fabricante do laser. O fotossensibilizador foi aplicado colocando-se a ponta do aplicador próxima à superfície apical do defeito ao redor do implante e depositado nesta região em toda a circunferência do implante. Após um tempo de pré-irradiação de 5 minutos e, em seguida, a superfície do implante foi lavada com soro fisiológico para a remoção dos excessos. Após, uma ponta de fibra óptica flexível com uma curva de 60 graus, 8,5 mm de comprimento e 0,06 mm de diâmetro acoplada ao laser foi utilizada para a aplicação da luz por mesial, distal, vestibular e lingual por 60 segundos em cada região totalizando 360 segundos por implante, com uma dose de 102 J/cm<sup>2</sup>.

Os implantes que receberam L-PRF tiveram seus defeitos preenchidos com L-PRF triturado e cobertos com uma membrana de L-PRF (fig. 7D), (ESKAN; GREENWELL *et al.*, 2014). Em seguida, todos os implantes tiveram os cicatrizadores trocados por parafusos de cobertura. Posteriormente, os retalhos foram reposicionados e suturados (fig. 7F). Todos os implantes ficaram submersos e totalmente recobertos com o retalho, de forma a anular/minimizar quaisquer influências do sítio não tratado nos demais sítios.

Após 3 meses, foi realizada a reabertura dos implantes, mensuração do defeito residual por meio de sonda milimetrada (como na fase de tratamento), instalação de cicatrizadores novos, estéreis. Esta medida foi feita para ser comparada com a medida trans-cirúrgica visto que em projetos anteriores, a comparação de medidas histológicas com medidas clínicas e microtomográficas produziu resultados estatísticos de interpretação dúbia, devido possivelmente à imprecisão da medida clínica frente às outras. Além de ser complexo, senão impossível, que a lâmina histológica seja feita exatamente onde a medida clínica foi realizada.



**Fig. 7 - (A)** Aspecto dos implantes antes do rebatimento do retalho; **(B)** retalho rebatido; **(C)** Aspecto da região após o uso da TFDa; **(D)** Membrana de L-PRF em posição; **(E)** Membrana de L-PRF após ser removida do tubo de ensaio; **(F)** Retalho suturado

#### *Preparo do L-PRF:*

Uma coleta de sangue de 10mL foi recolhida de cada minipig, sem o uso de anticoagulantes. As amostras foram acondicionada em Tubos de 10mL e imediatamente centrifugadas na L-PRF intra spin (Intra-lock, Florida – EUA) a 300rpm (aproximadamente 400g) por 10 minutos. Este processo formou um composto no tubo de ensaio contendo três camadas: Uma no topo, Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), um tampão de fibrina no meio do tubo (L-PRF) e um agregado de corpúsculos vermelhos na base do tubo. O L-PRF foi retirado, delicadamente, com uma pinça para o uso nos grupos experimentais. Ao final, os seguintes tratamentos foram aplicados aleatoriamente: - Grupo (C-) – Controle negativo: não recebeu nenhum tipo de tratamento, tendo a progressão da doença continuada e caracterizada durante todo o estudo. - Grupo (C+) - Controle positivo: recebeu apenas o procedimento de descontaminação com tratamento mecânico do biofilme. - Grupo Teste 1: recebeu tratamento com descontaminação mecânica somado ao protocolo de TFDa supracitado - Grupo Teste 2: recebeu tratamento com descontaminação mecânica somado ao protocolo de TFDa supracitado e o uso de L-PRF. Nos cuidados pós-operatórios, cloridrato de tramadol (50mg/ml) foi usado na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, e Cetoprofeno 20mg na dosagem de 1 comprimido/20 kg foi utilizado como anti-inflamatório. Os animais foram mantidos com uma dieta leve por pelo menos 15 dias, e a cicatrização das regiões operadas

foram acompanhadas periodicamente e os dentes remanescentes receberam controle de placa, inclusive com a utilização de pontas ultrassônicas.

#### 3.4.6 Sexta fase: reabertura e instalação de novos cicatrizadores

Logo após o período de cicatrização de 12 semanas após os tratamentos, uma reabertura foi realizada no intuito de medir novamente as dimensões do defeito pós-tratamentos. Em seguida às medições, novos cicatrizadores foram instalados em todos os implantes de ambos os grupos e deixados por 15 dias de cicatrização até o momento da eutanásia.

### 3.5 Eutanásia (Pós-tratamento)

Para a eutanásia os animais foram novamente sedados para as coletas (t7-pós-tratamento) de *periopapers*, um por sítio, pelo tempo de 1 minuto, total de 4 sítios por implante; *periopapers* contaminados com sangue foram descartados e recoletados e de biofilme subgingival. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por uma indução de anestesia profunda e subsequente overdose de Thiopental Sódico (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil) e Cloreto de potássio (Blau Farmacêutica S.A, Brasil). As hemi-mandíbulas foram dissecadas removidas e fixadas em formalina a 4% em pH 7 por dez dias.

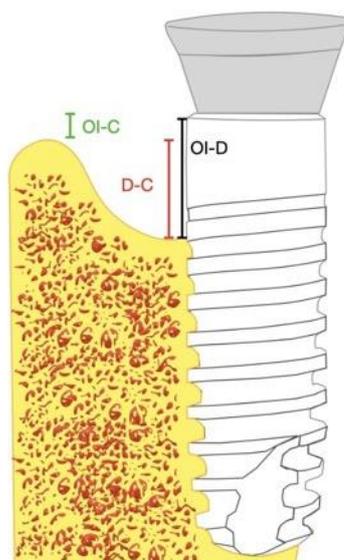
### 3.6 Metodologia Laboratorial

#### 3.6.1 Análise Histomorfométrica

Após a inclusão em resina, 36 peças foram seccionadas no sentido vestibulo-lingual e mesio-distal pela técnica de secção de tecidos duros (DONATH & BREUNER, 1982). Assim, metade das peças dos implantes de cada grupo foram seccionadas vestibulo-lingualmente, e metade mesio-distalmente. As lâminas foram preparadas com uma espessura média de 50 a 80µm para análise histomorfométrica após serem coradas com *Stevenel's blue* e *Vermelho de Alizarina*.

Secções histológicas longitudinais, quadro a quadro, em aumento de 4x de cada implante foram capturadas através de uma câmara de vídeo (DP73, Olympus America) acoplada a um microscópio automatizado (BX51, Olympus America). As imagens foram analisadas em um programa (cellSens<sup>®</sup> Dimension 1.11 Digital Imaging Software, Olympus America) através de um examinador sem conhecimento dos grupos experimentais. Todas as medidas foram realizadas nas faces mesiais e distais dos cortes mesio-distais dos implantes.

As medidas quantitativas das lâminas histológicas (36 implantes, e 9 implantes para cada grupo) foram realizadas como ilustrado na fig. 8 exemplares das imagens podem ser vistos nas fig. 9, 10.



**Fig. 8** - Ilustração do método utilizado para a realização das medidas lineares para histomorfometria

### 3.6.2 Análise Microtomográfica Computadorizada

Para esta análise, as peças permaneceram intactas após a fixação. Todas as medições foram realizadas por um examinador cego ao estudo e devidamente calibrado aos parâmetros de análise. O aparelho utilizado é um microtomógrafo computadorizado de alta resolução (modelo 1172, SkyScan – Bélgica). Todos os implantes foram analisados e todas as medidas foram realizadas no perímetro de 1,5 mm de diâmetro ao redor dos implantes (incluindo a região determinada pelas roscas dos implantes) tendo como marcação inicial (ponto de partida) o ombro do implante. As medidas realizadas foram: volume total da área ( $\text{mm}^3$ ); porcentagem (%) do volume ósseo neoformado; volume ( $\text{mm}^3$ ) do osso neoformado; área total ( $\text{mm}^2$ ); área ( $\text{mm}^2$ ) do osso neoformado; densidade óssea total (%); densidade mineral óssea (%); contato osso-implante (mm): avaliado somente no perímetro determinado pelas extremidades das roscas a partir do ombro do implante até uma extremidade final que será determinada padronizada após a verificação a partir do maior defeito ósseo após as induções.

### 3.6.3 Análise Microbiológica

A cada tubo de Eppendorf, contendo a amostra de biofilme dentário coletado, recebeu 0,15ml de 0.5 M NaOH. As suspensões foram fervidas em banho-maria por 5 min e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 ml de 5 M de acetato de amônia. Ao fim deste processo as células bacterianas se encontram lisadas e o DNA suspenso na solução. Cada suspensão de placa contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot” (Immuntics, Cambridge, MA, USA) e o DNA concentrado na membrana de nylon (15 X 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA). A membrana foi removida do aparato e o DNA depositado, então fixado na mesma por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. As duas últimas canaletas do “Minislot” abrigaram os controles, contendo uma mistura das espécies de microorganismos investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações,  $10^5$  e  $10^6$  células bacterianas (HAFFAJEE *et al.*, 1997).

#### 3.6.3.1 Hibridização das membranas com as sondas de DNA

Após fixação do DNA, as membranas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 hora numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6.5) e 0.5 mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immuntics, Cambridge, MA, USA) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às 45 canaletas do “Miniblotter”.

#### 3.6.3.2 Sondas de DNA

As sondas de DNA, específicas para 36 espécies, foram confeccionadas usando o “random primer digoxigenin labeling Kit” (boehringer mannheim), como descrito por (FEINBERG AND VOGELSTEIN 1983). Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação com diferentes tipos de doenças e saúde peri-implantar (SHIBLI; MELO *et al.*, 2008). Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de  $10^4$  de células bacterianas. As concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas assemelhasse. Cada canaleta do “Miniblotter 45” recebeu 130l de uma determinada sonda, contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6.5), 0.2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/ml de sonda de DNA). A hibridização foi feita perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais.

O aparato, contendo as membranas, foi acondicionado em um saco plástico para evitar a desidratação. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu a 42°C, durante um período mínimo de 20 horas.

### 3.6.3.3 Detecção das espécies

Após hibridização, as membranas foram removidas do “Miniblotter” e lavadas por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 20 minutos, a 65°C, numa solução adstringente (0.1 X SSC, 0.1% SDS), para remoção das sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora numa solução contendo 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0, e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenin conjugado à Fosfatase Alcalina (Boehringer Mannheim), numa diluição de 1/25.000 (Engler-Blum, Meier, Frank, & Muller, 1993), seguido de lavagem das membranas com uma solução de 0.1 M Ácido Maleico, 3 M NaCl, 0.2 M NaOH, 0.3% Tween 20, pH 8.0, 2 vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0.1 M Tris HCl, 0.1 NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5. As membranas foram então incubadas em uma solução detectora, Lumi Phos 530 (Lumigen, Southfield, MI, USA), por 45 minutos a 37°C, e colocadas num cassete sob um filme radiográfico (KodaK X-OMAT) por aproximadamente 40 minutos, para posterior revelação.

Após a realização do *checkerboard DNA-RNA hybridization*, os níveis de cada espécie bacteriana testada foram calculados pela transformação dos escores obtidos na leitura dos filmes radiográficos em valores absolutos: escore 1=10.000 células, escore 2= 100.000 células; escore 3 = 500.000 células; escore 4= 1.000.000 células; e escore 5 = 10.000.000 células. Em cada animal, foi calculada a média das contagens de cada espécie bacteriana ( $\times 10^5$ ) presente. Foi calculada, então, a contagem média de cada espécie nos diferentes grupos (Grupo C-, C+, Teste 1, Teste 2) e tempos experimentais (baseline, pré-tratamento e pós tratamento).

As amostras microbiológicas foram analisadas pelo método DNA-DNA Checkerboard, no laboratório da Universidade de Guarulhos (UNG) em lugar da análise por pirosequenciamento. O método Checkerboard foi preferido por reduzir os custos e pela possibilidade de uma análise mais abrangente (RAMOS *et al.*, 2018) e semiquantitativa da microbiota (40 espécies ao mesmo tempo). No entanto, esta foi a primeira vez em que o método foi utilizado em modelo suíno. Todas as bactérias constantes na análise Checkerboard foram detectadas ou antes, ou depois da indução de doença sendo, portanto, uma forma válida de detecção e avaliação da quantitativa da microbiota neste modelo. A partir dessa análise pôde-se obter um perfil microbiológico quantitativo da doença peri-implantar, em todas as suas fases.

### 3.6.4 Análise Imunoinflamatória

As amostras foram processadas para análise de níveis creviculares das seguintes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Para a análise de citocinas inflamatórias os periopapers serão eluídos em solução contendo solução salina tamponada (PBS, Gibco), inibidor de protease e detergente para quebra de ligações de proteína (Tween-20, BioRad) e mantidos sob agitação por 30 min. Em seguida, a proteína total de cada amostra será mensurada pelo método DC protein assay, utilizando-se um kit comercial (BioRad) e a leitura da placa será feita em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 750 nm. Em seguida, os níveis das citocinas inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1, IL-1 $\beta$  e TNF- $\delta$  serão dosadas através da tecnologia Luminex 100/200 (Luminex® 100/200™ System, Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando kit comercial.

### 3.6.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando testes bicaudais e nível de significância de 5% pelo Software Graphpad Prisma 8. Os testes de distribuição de normalidade dos dados foram realizados conforme cada análise descrita no trabalho. Foi realizado cegamento do terceiro operador que realizou a estatística, alterando a nomenclatura dos grupos para: A, B, C e D aleatoriamente.

## *RESULTADOS*

---

## 4 RESULTADOS

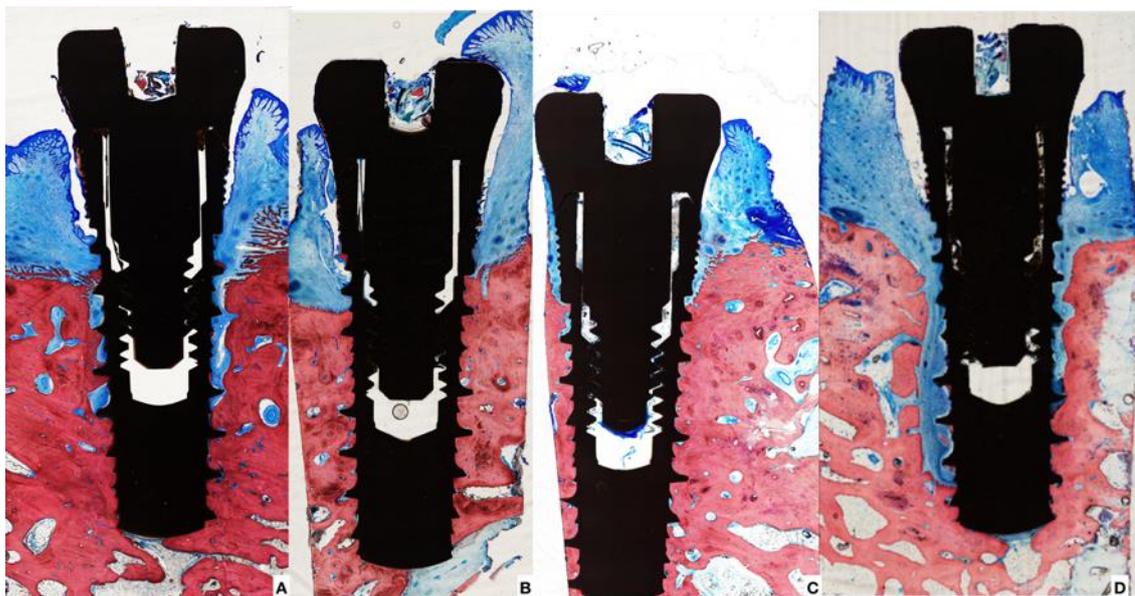
## 4.1 Análise Histomorfométrica

A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Os testes one-way ANOVA ou Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação dos grupos, de acordo com a distribuição dos dados das amostras. Não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos da peri-implantite propostos neste trabalho (tabela 2). Os padrões de perda óssea mostraram-se de acordo com Stubinger; Drechsler *et al.*, 2016.

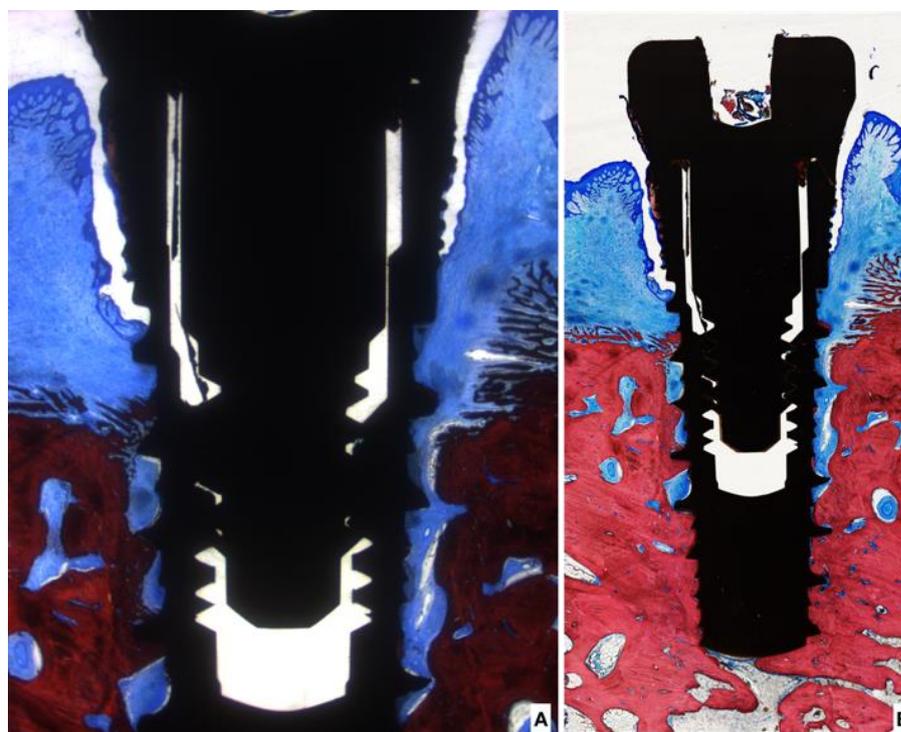
**Tabela 2.** Medidas lineares histomorfométricas de acordo com os parâmetros (OI-CO; OI-D; C-D) ilustrados na figura 8

P= 0.05 **		(C-) (n=9)	(C+) (n=9)	Teste 1 (n=9)	Teste 2 (n=9)	P
Ombro implante - Crista óssea (OI-CO)	Média	62,4	129,3	106,3	62,99	0.8060
	DP	165,8	249,8	291,7	178,9	
	MESIAL	Mediana	3,71	4,098	3,358	
Ombro implante - Crista óssea (OI-CO)	Média	61,27	215,5	4,27	114,3	0.9840
	DP	162,5	420,8	1,288	330,7	
	DISTAL	Mediana	4,298	4,372	4,203	
Ombro implante - Defeito (OI-D)	Média	142,3	264,8	129,7	180,2	0.9708
	DP	387,8	552,9	351,6	523	
	MESIAL	Mediana	5,139	5,212	5,228	
Ombro implante - Defeito (OI-D)	Média	154,6	289,9	5,296	186,2	0.8546
	DP	422,7	591,7	0,7805	542,5	
	DISTAL	Mediana	5,307	5,002	5,349	
Defeito - Crista (D-C)	Média	79,9	136,6	22,86	117,7	0.7239
	DP	222,1	342,2	58,62	343,9	
	MESIAL	Mediana	1,476	1,555	1,913	
Defeito - Crista (D-C)	Média	93,66	74,79	1,077	72,22	0.4632
	DP	260	210,9	0,9511	211,7	
	DISTAL	Mediana	1,382	1,818	1,167	

\*Medidas realizadas em software cellSens<sup>®</sup> Dimension 1.11 Digital Imaging Software, Olympus America



**Fig. 9** - Imagens histológicas por grupo, realizadas no laboratório de microscopia da Adams School of Dentistry (UNC - Chapel Hill)



**Fig. 10** - (A) Imagem capturada em 1.6x no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP; (B) Imagem capturada por meio de escaneamento automático da lâmina em 10x, no laboratório de histologia da Adams School of Dentistry. O

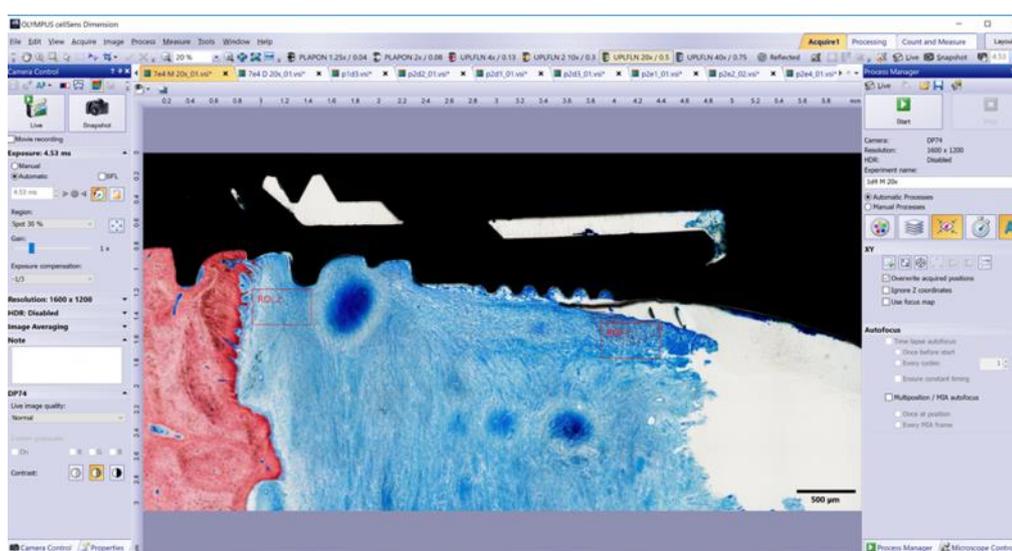
escaneamento quadro a quadro possibilitou *zoom in* e *zoom out* na imagem, e o balanço de branco automático quadro a quadro possibilita melhor qualidade de imagem.

O *score* inflamatório (SUSIN; FINGER STADLER *et al.*, 2019) analisa a inflamação tecidual – avaliada por meio de densidade de células com características inflamatórias- em 4 níveis:

- 0- sem inflamação;
- 1- inflamação existente, porém, restrita;
- 2- inflamação moderada, menor que 50% da região de interesse;
- 3- inflamação profusa, com mais de 50% da região de interesse.

Foi proposta uma modificação do *score* inflamatório original (SUSIN; FINGER STADLER *et al.*, 2019) para este modelo específico de doença.

A modificação que foi realizada para este projeto foi: Utilização de duas regiões de interesse (fig. 11), uma a nível de sulco e outra a nível ósseo, com o *score* adicional dicotômico de atividade osteoclástica/presença de osso novo que, somado a presença ou não de inflamação de tecido mole próximo ao osso, pode fornecer *insights* importantes sobre o resultado histológico dos tratamentos e a biologia do reparo, mesmo que os dados clínicos não demonstrem diferença entre os grupos de tratamento. Os *scores* foram realizados também por um segundo examinador, independente, calibrado.



**Fig. 11** - Print screen de tela ilustrando a metodologia utilizada para o *score* inflamatório modificado: ROI 1- região analisada a nível de sulco; ROI 2- região analisada ao nível ósseo.

Os resultados apresentados demonstram que houve detecção de inflamação somada a atividade osteoclástica sem presença de novo osso em 39%, 13%, 22% e 17% dos sítios do

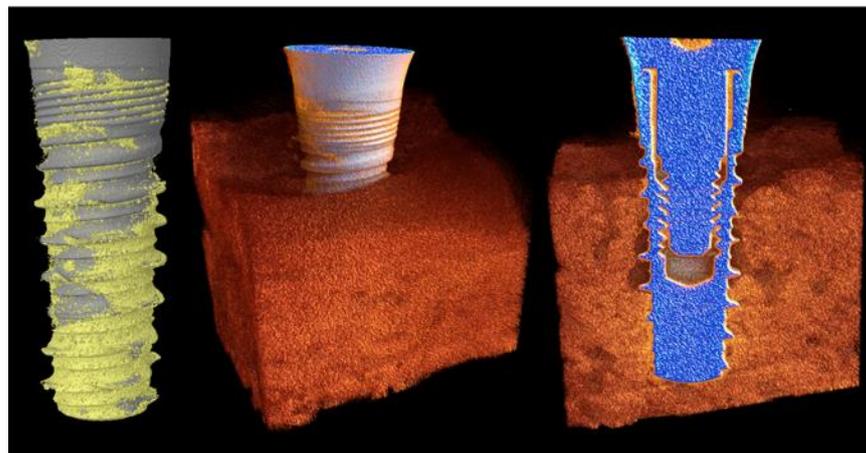
grupo C-, C+, Teste 1 e Teste 2, respectivamente e pode representar presença de atividade de doença duas vezes maior no grupo controle negativo. Esta análise qualitativa nos mostra possibilidade de atividade osteoclástica e não a atividade em si, para tanto seria necessária uma análise imunohistoquímica específica ou colorações histológicas que não foram realizadas neste estudo.

#### 4.2 Análise Microtomográfica Computadorizada

As medidas volumétricas das peças submetidas a análise microtomográfica encontram-se nas tabelas 3 e 4.

As análises estatísticas foram realizadas usando testes bicaudais e nível de significância de 5% pelo Software Graphpad Prisma 8. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Os testes one-way ANOVA ou Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação dos grupos, de acordo à distribuição dos dados das amostras.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre os grupos experimentais em termos de mineralização óssea e contato osso-implante. A região de interesse desta análise foi determinada a partir do maior defeito encontrado clinicamente, durante o tratamento.



**Fig. 12** - Reconstruções microtomográficas, da esquerda para direita: superfície de contato tecido mineral e implante, reconstrução do bloco, e corte sagital do bloco tridimensional

As medidas lineares (distância entre o osso e o ombro do implante, componente infra ósseo residual, estimativa de ganho ósseo comparada as medidas clínicas), também foram analisados e se encontram na tabela 4, as medidas lineares realizadas no Micro-CT foram as mesmas realizadas na análise histomorfométrica (fig. 8). Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos.

**Tabela 3.** Resultados Microtomográficos da comparação intergrupos dos dados lineares (em micrômetros -  $\mu\text{m}$ )

P= 0.05 **		(C-)	(C+)	Teste 1	Teste 1	<i>p</i>
		(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=9)	
MESIAL	Média	4035	2971	3528	4489	0.1558
	DP	1209	764,4	981,5	2214	
	Mediana	3752	2977	3692	3762	
DISTAL	Média	4114	3043	3657	4737	0.1840
	DP	1142	807,3	1174	2501	
	Mediana	3871	3354	3474	3464	
LINGUAL	Média	4590	2917	3791	3717	0.1868
	DP	1941	594,4	1161	2022	
	Mediana	4218	2957	3742	2869	
VESTIBULAR	Média	4335	3304	3724	5114	0.0606
	DP	1795	602,1	1079	1726	
	Mediana	3960	3215	3642	4744	

\*\* A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Os testes one-way ANOVA ou Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação dos grupos, de acordo à distribuição dos dados das amostras, assumindo um nível de significância de 5%. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre grupos

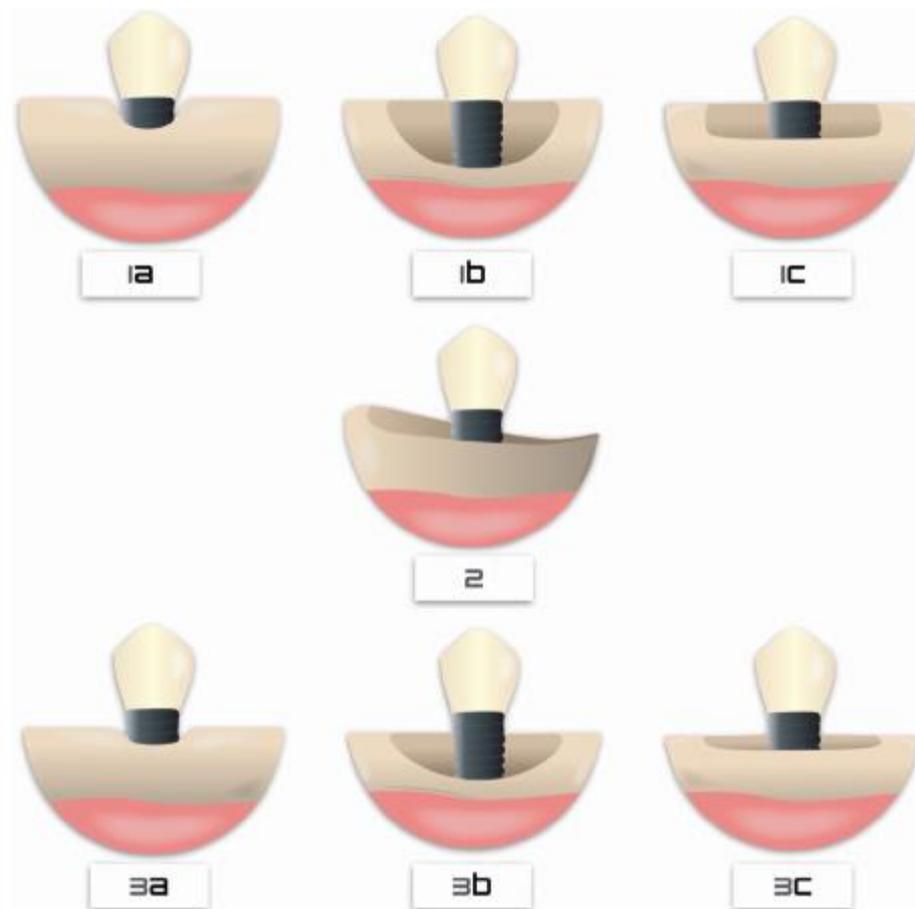
**Tabela 4.** Resultados Microtomográficos da comparação entre grupos dos dados lineares (em micrômetros -  $\mu\text{m}$ )

Grupos		(C-) (n=9)	(C+) (n=9)	Teste 1 (n=9)	Teste 2 (n=9)	<i>p</i>
Superfície de Contato Osso-Implante - BIC ( $\text{mm}^2$ )	Média	213.8	214.3	212.9	213.7	0.7841
	DP	72.35	1.522	74.72	48.3	
	Mediana	200.1	214.4	216.5	199.8	
Volume Tecidual- TV ( $\text{mm}^3$ )	Média	19.15	20.45	18.82	19.05	0.5057
	DP	6.962	0.148	4.186	4.604	
	Mediana	20.38	20.44	20.3	20.38	
Volume ósseo - BV ( $\text{mm}^3$ )	Média	7.189	8.233	7.028	6.459	0.6040
	DP	3.645	1.382	3.022	2.815	
	Mediana	7.982	7.756	8.057	6.274	
Percent bone volume - BV/TV (%)	Média	32.29	40.27	36	33.07	0.5296
	DP	15.1	6.825	12.28	10.79	
	Mediana	37.15	38	39.54	29.39	
Densidade de superfície ossea - BS/TV (1/mm)	Média	20.82	25.91	22.75	22.04	0.4859
	DP	12.76	1.811	4.791	4.297	
	Mediana	23.46	25.42	23.61	19.87	
Porosidade - PO (%)	Média	66.71	59.72	64	66.93	0.5288
	DP	15.1	6.833	12.28	10.79	
	Mediana	60.85	62	60.46	70.61	
Espessura Trabecular - Tb.Th (mm)	Média	0.05077	0.0552	0.05496	0.05527	0.4831
	DP	0.01111	0.003308	0.006105	0.004943	
	Mediana	0.05112	0.05549	0.05458	0.0559	
Número de trabéculas - Tb.N (1/mm)	Média	6.236	7.049	6.444	5.911	0.6163
	DP	2.76	1.116	1.645	1.562	
	Mediana	6.767	6.829	6.945	5.345	
Separação trabecular - Tb.Sp (mm)	Média	0.1086	0.1013	0.1147	0.1109	0.4274
	DP	0.02507	0.008137	0.01381	0.01755	
	Mediana	0.1054	0.1029	0.1114	0.1078	
Densidade conjuntiva - Conn.Dn ( $\text{mm}^3$ )	Média	1461	1733	1504	1461	0.3439
	DP	580.8	108.3	340.7	281.8	
	Mediana	1487	1741	1550	1419	

\*\* A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Os testes one-way ANOVA ou Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação dos grupos, de acordo à distribuição dos dados das amostras, assumindo um nível de significância de 5%. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre grupos.

#### 4.2.1 Classificação dos defeitos peri-implantares

Segundo Monje *et al.*, 2019, a classificação dos defeitos peri-implantares podem ser representadas de acordo com as imagens abaixo (fig. 13). Através de uma análise qualitativa obtivemos os resultados da Tabela 3. Os três tipos de defeitos mais encontrados segundo a classificação do autor citado, foram defeitos Classe IIIb: 2-3 defeitos nas paredes + perda óssea horizontal com grau moderado (fig. 14A), Classe Ib: 2-3 paredes defeituosas com grau leve (fig. 14B) e Classe II defeito supracrestal / horizontal com grau moderado (fig. 14C), nessa seguinte ordem. Com os resultados apresentados podemos associar que o tipo de defeito influencia diretamente o reparo ósseo, ou seja, defeitos peri-implantares circunferenciais resultam na redução da profundidade de sondagem em comparação à outros tipos de defeitos existentes e já os defeitos que possuem perda horizontal permitem dificuldade maior na redução da profundidade de sondagem. Os tratamentos propostos não apresentaram ganhos ósseos relevantes, que justifica que o tipo de defeito inicial classifica o quanto o prognóstico é favorável ou não (SCHWARZ *et al.*, 2007).



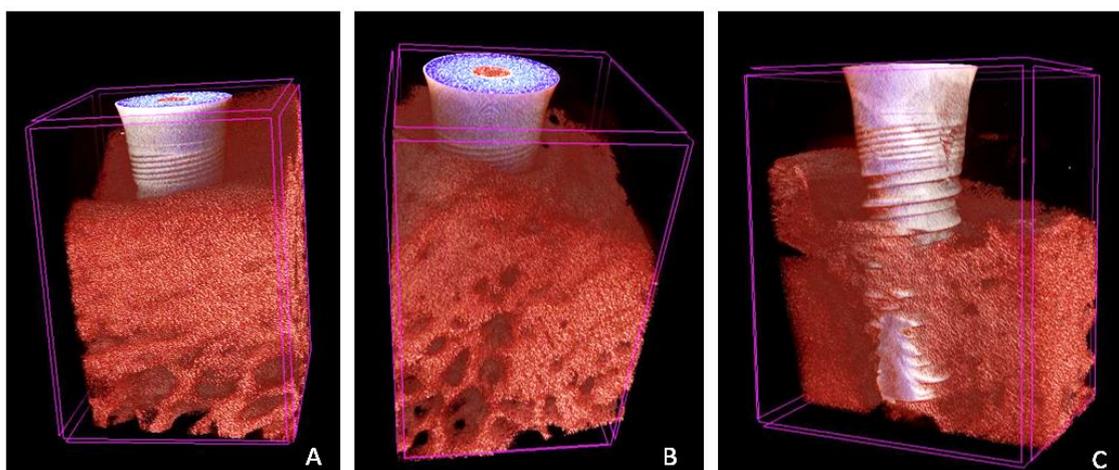
**Fig. 13** – Imagem retirada do artigo do estudo citado (MONJE *et al.*, 2019) representando a classificação dos defeitos peri-implantares

**Tabela 5.** Classificação de defeitos infra-ósseos encontrados de acordo com Monje et al, 2019 (n=48, referente as amostras analisadas com o Micro-ct)

Class. Defeito	Quant. Implante	Grau S	Grau M	Grau A
CL – I	0	0	0	0
CL – Ia	1	1	0	0
CL – Ib	14	10	4	0
CL – Ic	6	3	3	0
CL – II	10	3	7	0
CL – III	0	0	0	0
CL – IIIa	1	1	0	0
CL – IIIb	16	5	10	1
CL – IIIc	0	0	0	0
Total	48	23	24	1

Legenda:

- Classe I: Defeito infraósseo
- Classe Ia: Deiscência bucal
- Classe Ib: 2-3 paredes defeituosas
- Classe Ic: defeito circunferencial
- Classe II: defeito supracrestal / horizontal
- Classe III: Defeito combinado
- Classe IIIa: Deiscência bucal + perda óssea horizontal
- Classe IIIb: 2-3 defeitos nas paredes + perda óssea horizontal
- Classe IIIc: defeito circunferencial + perda óssea horizontal
- Grau S: Leve: 3-4 mm / <25% do comprimento do implante
- Grau M: Moderado 4-5 mm /  $\geq 25\%$  -50% do comprimento do implante
- Grau A: Avançado: > 6 mm / > 50% do comprimento do implante



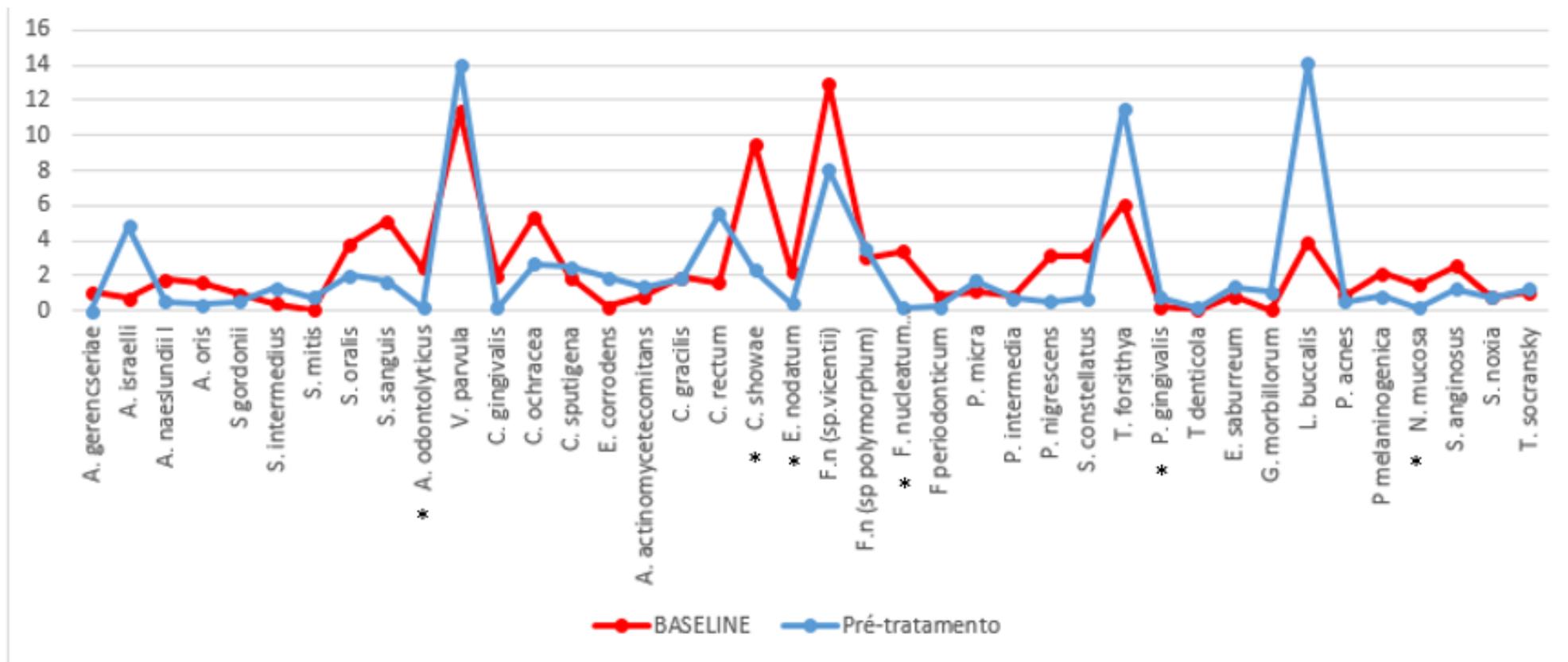
**Fig. 14** – (A) Defeito Cl IIIb – M; (B) Defeito Cl Ib – S; (C) Defeito Cl II – M

### 4.3 Análise Microbiológica

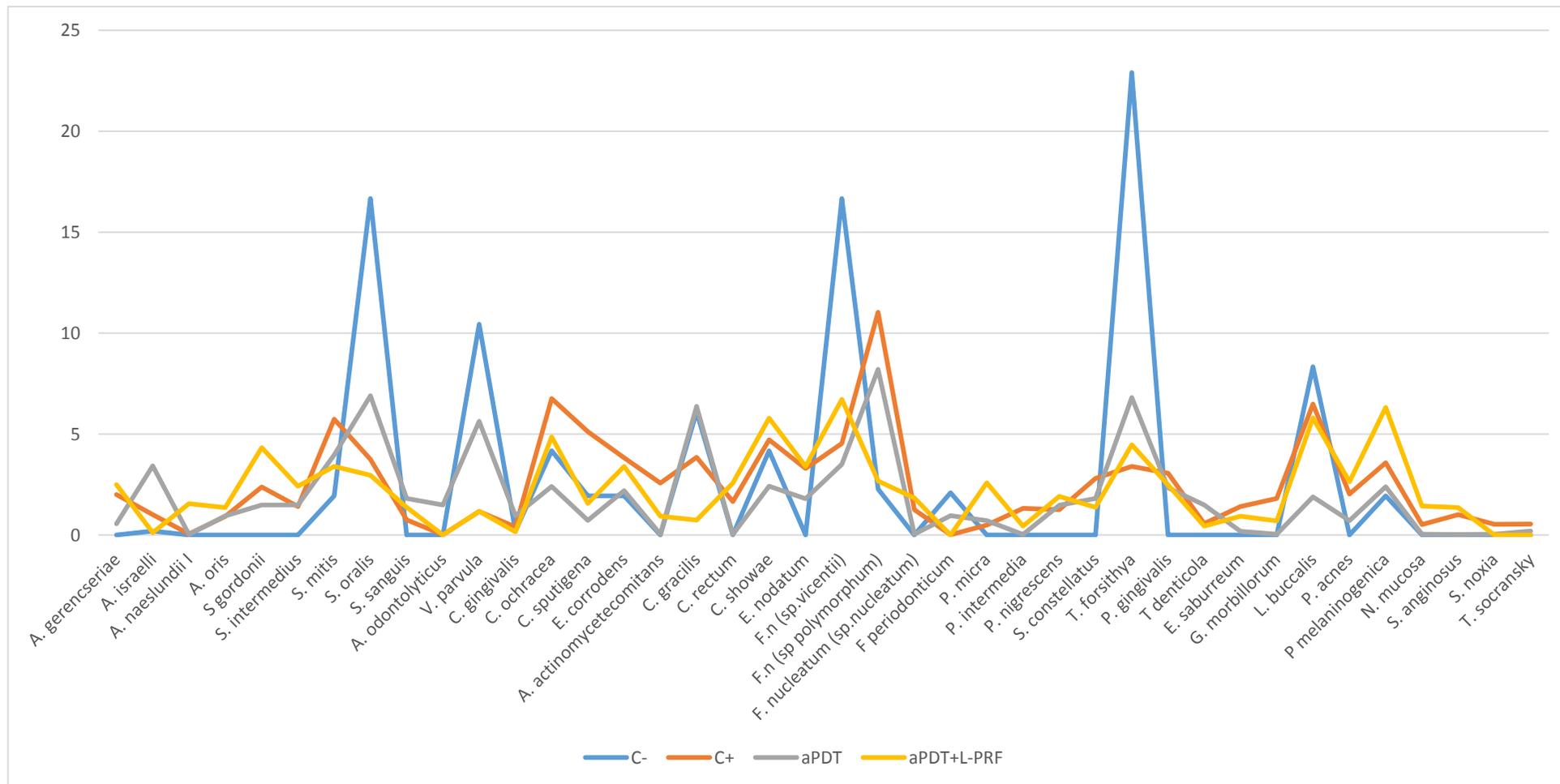
Após a indução, houve aumento estatisticamente significativo na detecção das bactérias *A. odontolyticus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nucleatum*, *N. mucosa* e *C. gingivalis* quando comparado ao baseline. A indução por ligaduras, portanto, foi suficiente para provocar aumento da detecção de bactérias, causando alterações microbiológicas no ambiente peri-implantar (fig. 15). As análises estatísticas foram realizadas usando testes bicaudais e nível de significância de 5% pelo Software Graphpad Prisma 8. Os dados das coletas de 36 implantes, independente do grupo experimental a ser incluído, foram obtidos a partir das médias de contagem total ( $\times 10^5$ ) das 40 espécies nos períodos experimentais citados, baseline e pré-tratamento. Após análise da distribuição de normalidade dos dados, foi utilizado o teste t pareado ou teste de Wilcoxon para a análise estatística.

Quando comparados, inicial e pré-tratamento, houve uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de bactérias, especialmente do grupo vermelho, denotando sucesso no protocolo de indução de doença peri-implantar no modelo experimental testado. Para comparação intergrupos pós-tratamento, foram realizados testes bicaudais e nível de significância de 5%, seguidos. A análise da distribuição de normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, e os testes Anova (*post hoc* de Tukey) e Kruskal-Wallis foram realizados (teste *post hoc* de Dunn), mostrando diferenças significantes no tempo final entre os grupos C- e C+, havendo redução significativa para as bactérias *S. constellatus* e *C. sputigena* após o tratamento, os demais grupos não mostraram diferenças significantes (fig. 16).

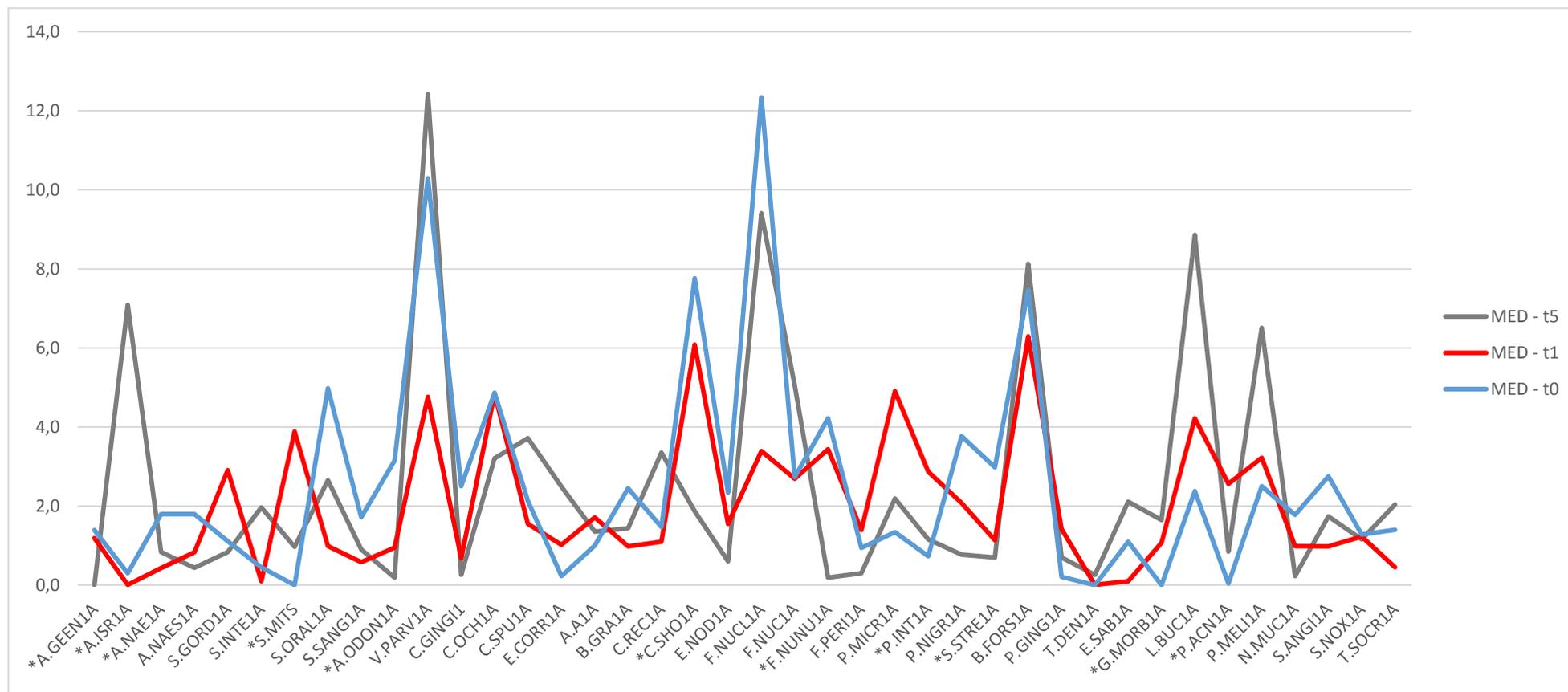
Foram realizadas comparações bacterianas dos tempos experimentais: t0(inicial), t1(6 semanas) e t5 (pré-tratamento). Os testes estatísticos foram realizados a partir da distribuição de normalidade dos dados. O teste de Friedman foi aplicado para todas as amostras utilizando um nível de significância de 5%. Houve um aumento estatisticamente significantes das bactérias *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii I*, *S. Mitis*, *A. odontolyticus*, *C. showae*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *G. morbillorum* e *P. acnes* (fig. 17). A caracterização do perfil microbiológico da doença peri-implantar pôde ser demonstrada através do aumento da detecção de bactérias em representando a evolução da doença peri-implantar. O *post hoc* Dunn foi realizado e houve uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos t0-t5 (c-d) para as bactérias *A. odontolyticus* ( $p= 0,002$ ) e *C. showae* ( $p=0,02$ ), sendo que c e d são estatisticamente significantes entre si.



**Fig. 15** - Representação gráfica bacteriana antes e após a indução da doença peri-implantar



**Fig. 16** - Representação gráfica dos níveis bacterianos pós-tratamento



**Fig. 17** - Representação gráfica bacteriana dos tempos experimentais: t0(inicial), t1(6 semanas) e t5 (pré-tratamento). \*Os testes estatísticos foram realizados a partir da distribuição de normalidade dos dados. O teste de Friedman foi aplicado para todas as amostras utilizando um nível de significância de 5%. O post-hoc Dunn's foi realizado para comparar a diferença entre os tempos t0-t5 (A-B) para as bactérias #A,ODON1A ( $p=0,002$ ) e #C.SHO1a ( $p=0,02$ ), sendo que A e B são estatisticamente significantes.

#### 4.4 Análise Imunoinflamatório

As análises estatísticas foram realizadas usando testes bicaudais e nível de significância de 5% pelo Software Graphpad Prisma 8. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Na análise intragrupos, o teste ANOVA (*post hoc* de Tukey) e Friedman (*post hoc* Dunn) foram realizados seguindo a normalidade dos dados. Foi possível encontrar diferenças significantes (valor de  $p$  na tabela 6) para as citocinas IL-1 $\beta$  (grupo C-) e IL-8 (grupos C+ e Teste 2), além da citocina IL-8, que demonstrou diferenças significantes entre os níveis iniciais pré-indução e pós-indução e entre os níveis pré-indução e pós-tratamento para o grupo Teste 2. Os demais grupos não obtiveram diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais.

Na comparação entre grupos, foram detectadas diferenças significantes através dos testes one-way ANOVA de medidas repetidas (*post hoc* Tukey) e Kruska-Wallis (*post hoc* Dunn), de acordo com a distribuição de normalidade dos dados, apenas para a citocina IL-8, entre os grupos Teste 2 e Teste 1, Teste 2 e C+, e Teste 2 e C- na coleta feita na indução da doença (tabela 7). A representação gráfica das detecções das citocinas se encontram na figura 18.

Quando analisamos apenas o efeito da indução da doença e comparamos os tempos baseline e pré-tratamento, há diferença significantes para a citocina IL-1 $\beta$  (tabela 8).

**Tabela 6** - Comparação da análise Imunoinflamatória intragrupos

		C- (n=9)				C+(n=9)				Teste 1 (n=9)				Teste 2 (n=9)			
		0	5	7	p	0	5	7	P	0	5	7	p	0	5	7	p
IL-1alfa	M(SD)	1.59 (1.20) a	2.87 (1.29) a	3.42 (1.70) a	0,0 207	0.97 (0.93) a	2.99 (1.46) b	4.09 (1.32) b	NS	1.09 (1.74) a	4.31 (3.18) a	3.12 (1.32) a	N	1.59 (1.79) a	1.79 (1.54) a	4.20 (4.02) a	NS
	MED(Q1-Q3)	1.67 (0.35- 2.74)	3.3 (1.42- 3.89)	3.78 (2.29- 4.69)		0.65 (0.46- 0.96)	2.83 (1.88 - 4.18)	4.31(2.8 7- 4.61)		0.35 (0.02- 2.90)	3.01(2.25 -6.33)	2.65 (2.25- 4.66)		0.70(0.3 3-2.65)	1.54(0.5 4-2.71)	3.07(1.89 -4.01)	
IL-1beta	M(SD)	4.5 (2.52) a	1.44 (0.35) a	1.85 (1.08) a	NS	6.63 (5.20)	1.83 (2.51)	4.95 (2.25)	NS	5.85 (6.78)	2.3(2.3)	3.13(3.3)	N	9.58 (12.97) a	0.57 (0.32) b	4.52 (2.82) a	NS
	MED(Q1-Q3)	4(2.09- 7.18)	1.33(1.1 5-1.83)	1.5 (1.03-3.1)		6.36(2.6 1-7.05)	0.66(0.23 -4.03)	3.13(0.9 4-5.46)		3.89(0.9 4-12.75)	1.77(0.38 -4.05)	2.38(0.65 -4.7)		5.16(2.5 4-12.35)	0.56(0.2 4-0.83)	4.07(2.29 -6.4)	
IL-6	M(SD)	0.06 (0.04)	0.07 (0.01)	0.06 (0.01)	NS	0.09 (0.06)	0.07 (0.03)	0.07 (0.03)	NS	0.07 (0.06)	0.19 (0.14)	0.06 (0.03)	N	0.07 (0.03)	0.07 (0.02)	0.07 (0.04)	NS
	MED(Q1-Q3)	0.05(0.0 2-0.11)	0.06(0.0 6-0.08)	0.07(0.03 -0.07)		0.07(0.0 6-0.13)	0.07(0.05 -0.1)	0.07(0.0 5-0.09)		0.06(0.0 2-0.13)	0.12(0.08 -0.36)	0.05(0.03 -0.08)		0.07(0.0 4-0.09)	0.07(0.0 4-0.09)	0.07(0.05 -0.1)	
IL-8	M(SD)	9.39 (7.77)	28.19 (19.4)	13.43 (7.70)	NS	7.85 (8.91)a	8.19 (6.69)a	12.74 (7.47)a	0,0 242	6.45 (10.59)	13.16 (8.53)	16.73 (13.03)	N	7.59 (7.21) a	2.06(2.1 2) a b	13.73 (4.76) a c	0,0 089
	MED(Q1-Q3)	7.28(4.9 9-12.96)	33.7(6.6 4-44.24)	11.95(6.7 2-20.85)		6.84(1.2 4-8.41)	6.43(3.30 -13.97)	15.43(5. 4-16.87)		1.78(0.2 2-17.36)	13.36(4.7 1-18.56)	17.32(2.1 8-29.06)		3.84(2.2 4-13.49)	0.86(0.3 6-3.66)	12.26(11. 4-14.23)	
TNF alfa	M(SD)	0.03 (0.03)	0.06 (0.01)	0.03 (0.02)	NS	0.05 (0.05)	0.14 (0.17)	0.06 (0.05)	NS	0.07 (0.05)	0.6 (0.79)	0.14 (0.25)	N	0.23 (0.37)	0.10 (0.10)	0.06 (0.08)	NS
	MED(Q1-Q3)	0.01(0- 0.05)	0.06(0.0 5-0.08)	0.03(0.01 -0.06)		0.03(0.0 1-0.09)	0.07(0.03 -0.28)	0.04(0.0 2-0.11)		0.08(0.0 1-0.11)	0.26(0.04 -1.74)	0.07(0.03 -0.07)		0.05(0.0 1-0.26)	0.05(0.0 2-0.23)	0.03(0.02 -0.08)	

\*\*Testes não paramétricos KRUSKAL-WALIS com post hoc dunn. Teste paramétricos ANOVA com post hoc de TUKEY.

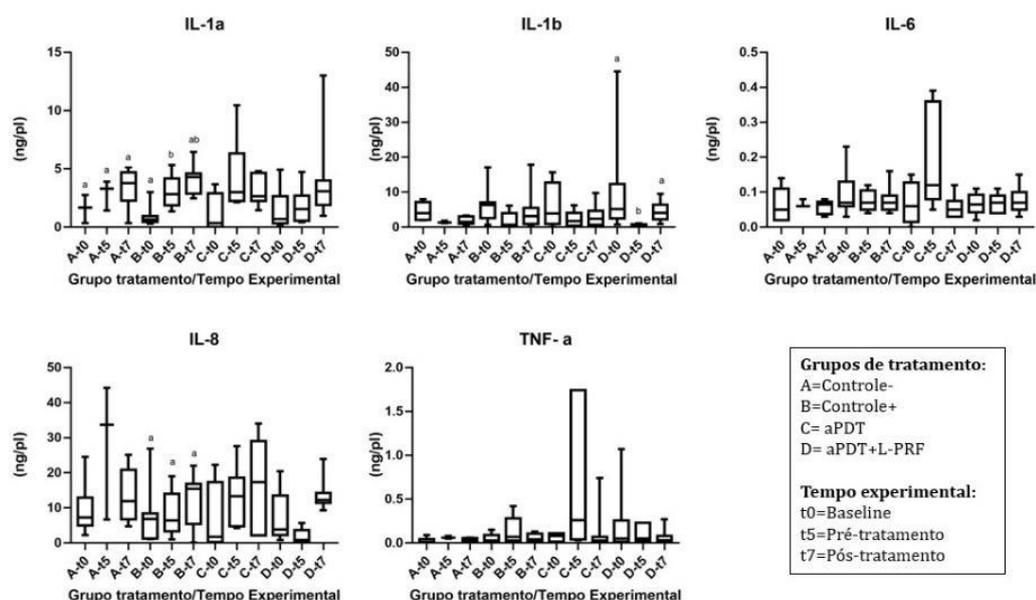
\*\*a e b são diferentes entre si

**Tabela 7.** Comparação da análise Imunoinflamatória intergrupos

Tratamentos	Baseline					P valor	Pré-tratamento					P valor	Pós-tratamento				
	A n=9	B n=9	C n=9	D n=9	A n=9		B n=9	C n=9	D n=9	A n=9	B n=9		C n=9	D n=9	P valor		
IL-1alfa	M(SD)	1.59 (1.20)	0.97 (0.93)	1.09 (1.74)	1.59 (1.79)	NS	2.87 (1.29)	2.99 (1.46)	4.31 (3.18)	1.79(1.54)	NS	3.42 (1.70)	4.09 (1.32)	3.12(1.32)	4.20(4.02)	NS	
	MED(Q1-Q3)	1.67 (0.35-2.74)	0.65 (0.46-0.96)	0.35 (0.02-2.90)	0.70(0.33-2.65)		3.3 (1.42-3.89)	2.83 (1.88 -4.18)	3.01(2.25-6.33)	1.54(0.54-2.71)		3.78 (2.29-4.69)	4.31(2.87-4.61)	2.65 (2.25-4.66)	3.07(1.89-4.01)		
IL-1beta	M(SD)	4.5(2.52)	6.63(5.20)	5.85(6.78)	9.58(12.97)	NS	1.44 (0.35)	1.83(2.51)	2.3(2.3)	0.57(0.32)	NS	1.85(1.08)	4.95(2.25)	3.13(3.3)	4.52(2.82)	NS	
	MED(Q1-Q3)	4(2.09-7.18)	6.36(2.61-7.05)	3.89(0.94-12.75)	5.16(2.54-12.35)		1.33(1.15-1.83)	0.66(0.23-4.03)	1.77(0.38-4.05)	0.56(0.24-0.83)		1.5(1.03-3.1)	3.13(0.94-5.46)	2.38(0.65-4.7)	4.07(2.29-6.4)		
IL-6	M(SD)	0.06(0.04)	0.09(0.06)	0.07(0.06)	0.07(0.03)	NS	0.07(0.01)	0.07(0.03)	0.19(0.14)	0.07(0.02)	NS	0.06(0.01)	0.07(0.03)	0.06(0.03)	0.07(0.04)	NS	
	MED(Q1-Q3)	0.05(0.02-0.11)	0.07(0.06-0.13)	0.06(0.02-0.13)	0.07(0.04-0.09)		0.06(0.06-0.08)	0.07(0.05-0.1)	0.12(0.08-0.36)	0.07(0.04-0.09)		0.07(0.03-0.07)	0.07(0.05-0.09)	0.05(0.03-0.08)	0.07(0.05-0.1)		
IL-8	M(SD)	9.39(7.77)	7.85(8.91)a	6.45(10.59)	7.59 (7.21) a	NS	28.19(19.4) a	8.19(6.69) b	13.16(8.53) abcd	2.06(2.12) bcd	0,0041	13.43(7.70)	12.74(7.47)	16.73(13.03)	13.73(4.76)	NS	
	MED(Q1-Q3)	7.28(4.99-12.96)	6.84(1.24-8.41)	1.78(0.22-17.36)	3.84(2.24-13.49)		33.7(6.64-44.24)	6.43(3.30-13.97)	13.36(4.71-18.56)	0.86(0.36-3.66)		11.95(6.72-20.85)	15.43(5.4-16.87)	17.32(2.18-29.06)	12.26(11.4-14.23)		
TNF alfa	M(SD)	0.03(0.03)	0.05(0.05)	0.07(0.05)	0.23(0.37)	NS	0.06(0.01)	0.14(0.17)	0.6(0.79)	0.10(0.10)	NS	0.03(0.02)	0.06(0.05)	0.14(0.25)	0.06(0.08)	NS	
	MED(Q1-Q3)	0.01(0-0.05)	0.03(0.01-0.09)	0.08(0.01-0.11)	0.05(0.01-0.26)		0.06(0.05-0.08)	0.07(0.03-0.28)	0.26(0.04-1.74)	0.05(0.02-0.23)		0.03(0.01-0.06)	0.04(0.02-0.11)	0.07(0.03-0.07)	0.03(0.02-0.08)		

\*\*Testes não parametricos KRUSKAL-WALIS com post hoc dunn. Teste paramétricos ANOVA com post hoc de TUKEY.

\*\*a e b são diferentes entre si



#### Análise Imunoenzimática – Comparação intragrupos

\*\*Testes paramétricos ANOVA com post hoc de TUKEY

\*\*Testes não paramétricos Friedman com post hoc dunn

\*\*Letras diferentes sinalizam diferenças estatisticamente significantes

**Figura 18.** Box-plot representativos dos níveis detectados de citocinas por tempo/grupo (\*\*a e b são diferentes entre si)

**Tabela 8.** Comparação dos dados de todos os grupos e avaliação de citocinas pós indução em pg/ $\mu$ L

Citocina	Baseline n= 36	Pré-tratamento n=36	<i>P</i> valor
<i>IL-1 alfa</i>	1,33 $\pm$ 1,44	2,95 $\pm$ 2,20	NS
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	7,57 $\pm$ 9,09	1,54 $\pm$ 1,77	< 0,05
<i>IL-6</i>	0,07 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,09	NS
<i>IL-8</i>	7,82 $\pm$ 8,35	10,42 $\pm$ 11,89	NS
<i>TNF alfa</i>	0,15 $\pm$ 0,27	0,19 $\pm$ 0,37	NS

*DISCUSSÃO*

---

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo é pioneiro em descrever por meio de análise microbiológica, microtomográfica, histomorfométrica e imunológica a progressão da doença peri-implantar induzida em modelo suíno. Até a presente data, poucos estudos têm descrito este modelo.

Uma técnica descrita em um único estudo, porém, pouco utilizada é a de fabricar defeitos e contaminá-los com bactérias específicas (TAKASAKI; AOKI *et al.*, 2007), no entanto a infecção obtida não corresponde à mesma complexidade da indução natural visto que se baseia em apenas em um modelo de infecção com as bactérias específicas inoculadas. A doença peri-implantar tem demonstrado uma complexidade que ultrapassa uma simples infecção por duas espécies bacterianas.

Recentemente um estudo a fim de comparar tratamentos em defeitos periodontais em micropigs, induziu doença periodontal com uma técnica mista envolvendo fabricação de defeitos infra-ósseos e instalação de ligaduras (LIU; ZHENG *et al.*, 2008), no entanto este estudo também não provê dados sobre a composição da infecção causada pela ligadura, impossibilitando uma comparação direta. O modelo de indução e progressão natural utiliza as ligaduras como “dispositivos acumuladores de biofilme bacteriano” e não como “mantenedores de defeitos” por inflamação crônica ou reação de corpo estranho.

O presente estudo foi desenhado com a expectativa de que a doença induzida nos Minipigs produzisse maiores quantidades de defeitos infra-ósseos devido a largura do rebordo pós exodontia destes animais. No entanto, defeitos supraósseos (Tipo 2) se mostraram mais frequentes, o que representou um desafio ainda maior para a cicatrização e regeneração, motivo pelo qual pode-se explicar a ausência de diferenças significantes nos desfechos histológicos, mesmo com diferenças significantes nos desfechos microbiológicos, especialmente no grupo controle negativo.

Rodriguez, Koticha *et al.* (2018) atingiram médias de perda óssea em seu grupo controle (fase ativa de indução com ligaduras metálicas) que variaram entre 1,84mm e 2,44mm, acompanhadas de um desvio padrão similar à média. Defeitos com essa extensão podem ser pouco desafiadores em termos regenerativos, principalmente em se tratando de animais que demonstram capacidade de reparo maior que os humanos, assim como ocorre com cães (WIKESJO AND NILVEUS, 1991; WIKESJO; SELVIG *et al.*, 1991; WIKESJO; KEAN *et al.* 1994; WIKESJO; RAZI *et al.*, 1998) e animais menores (KANTARCI; HASTURK *et al.* 2015; SCHWARZ; SCULEAN *et al.*, 2015). Por este motivo, ao se induzir doença peri-implantar,

faz-se necessária uma perda óssea de 25 a 30%, pelo menos (ERICSSON; PERSSON *et al.*, 1996, ZITZMANN; BERGLUNDH *et al.*, 2004; SCHWARZ; SAHM *et al.*, 2011).

O tipo de defeito e por consequência, quantidade de paredes ósseas disponíveis para a cessão de células repovoantes, é de suma importância ao potencial regenerativo pós tratamento, quando comparados, os tipos de defeitos encontrados no presente estudo com publicações que sugeriram uma classificação de defeitos peri-implantares e profundidade (SCHWARTZ *et al.*, 2007; MONJE *et al.*, 2019), podemos observar que o prognóstico do reparo ósseo está totalmente associado ao tipo de defeito pré-existente. Os defeitos infra-ósseos por apresentam maior capacidade de reparo por serem defeitos contidos e com fontes celulares para repopulação abundante. A predominância de defeitos supraósseos no presente estudo pode ter uma grande influência na ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no que se refere ao tratamento, mesmo com diferenças marcantes na descontaminação. Com isso, a descontaminação das superfícies e a remoção dos lipopolissacarídeos responsáveis pela agressão ao tecido do hospedeiro mostra-se fundamental (ESPOSITO; GRUSOVIN; COULTHARD; WORTHINGTON, 2008). Um estudo comprovou que a ausência do agente etiológico (biofilme) é primordial para a regeneração do tecido peri-implantar através da recolocação de componentes estéreis em sítios com peri-implantite previamente instalada permitindo a re-osseointegração das peças de titânio (PERSSON; ERICSSON; BERGLUNDH; LINDHE, 2001).

Neste estudo não foi proposto o uso de antibióticos sistêmicos afim de colaborar para redução e/ou eliminação de bactérias. Como anteriormente já dito, a utilização de antibióticos sistêmicos pode apresentar resolução da inflamação, com preenchimento ósseo do defeito e uma fina camada de tecido conjuntivo separando o implante do osso, não restaurando o contato osso-implante (WETZEL *et al.*, 1999; PERSSON *et al.*, 1999), somado a isso o uso indiscriminado pode aumentar o risco de resistência bacteriana. Podemos elucidar a valia de redução bacteriana sem qualquer interferência medicamentosa, e ainda enaltecer o uso da descontaminação com TFDa que mostrou eficácia na inativação de citocinas pró-inflamatórias, importantes na destruição tecidual (BRAHAM *et al.*, 2009).

A análise em três dimensões, no caso deste tipo de modelo, foi complexa em estabelecer uma região de interesse padrão que atinja todos os blocos experimentais sem que haja ruído nos dados estatísticos, principalmente se o objetivo for mensurar contato osso-implante. Os implantes desenvolveram tipos de defeitos e profundidades diferentes, a região de interesse microtomográfica foi determinada a partir do maior defeito encontrado clinicamente, durante o tratamento. No entanto, esta análise possibilita realizar medidas lineares em sítios que não

seriam alcançados pelas lâminas histológicas (Vestibular e Lingual) por questões técnicas. Por não apresentarem diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais em termos de mineralização óssea e contato osso-implante, esta análise foi utilizada para complementação de dados combinados com as outras análises presentes neste estudo, afim de melhorar o desfecho dos resultados finais.

Não há literatura a utilização da técnica de hibridização DNA-DNA Checkerboard (SOCRANSKY; HAFFAJEE *et al.*, 1998) em modelo suíno, estudos anteriores utilizaram análise de espectrometria de massa no gene 16s de DNA recombinante (BECKER; DORFER *et al.* 2011), o estudo em questão realizou *swab* de algodão na mucosa oral de Micropigs (uma amostra por animal), até o momento, estudos microbiológicos avaliando a peri-implantite induzida em modelo suíno utilizaram apenas avaliação de microbiota cultivável, sendo anterior a descrição de técnicas de hibridização de DNA ou de DNA recombinante e descrevendo apenas a presença de alguns microorganismos antes e depois da indução (HICKEY, O'NEAL *et al.* 1991).

Estudos clínicos com técnicas mais avançadas demonstram que, apesar de em menor número, inúmeras bactérias consideradas periodontopatogênicas e “peri-implantopatogênicas” estão presentes em grande parte de implantes e dentes clinicamente saudáveis (SHIBLI; MELO *et al.* 2008). De forma sucinta, a mera presença, sem uma comparação ao menos semiquantitativa de uma bactéria pode não indicar potencial patogênico da mesma para a doença, o que é amplamente explicado na hipótese do biofilme específico (LOESCHE, *et al.*, 1985). Por este motivo métodos de cultivo são pouco utilizados atualmente para avaliação de microbiota.

A detecção de algumas espécies microbianas apresentando diferenças estatisticamente significantes entre os tempos inicial, indução e instalação da doença peri-implantar foi de grande valia para o estudo, apresentando uma caracterização microbiológica da doença peri-implantar. Sendo assim, um futuro desenho experimental visando comparar diferentes técnicas de detecção microbiológica para a avaliação da doença peri-implantar induzida pode trazer ainda, melhores respostas sobre nossos resultados.

A análise da microbiota por meio da hibridização DNA-DNA Checkerboard é uma técnica relativamente custeável que se mostrou válida em estudos anteriores utilizando modelo canino, razão pela qual a escolhemos em detrimento à outras técnicas para este estudo (RAMOS; SUAID *et al.*, 2018). Apesar de o DNA-DNA Checkerboard incluir 40 espécies bacterianas, estas podem não ser as únicas espécies presentes na saúde e doença peri-implantar

deste modelo, sendo, portanto, válido um estudo posterior envolvendo pirosequenciamento para análise e delineamento apenas da microbiota.

Uma recente revisão sistemática incluindo 19 artigos clínicos em humanos concluiu que citocinas pró inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 têm potencial como ferramenta diagnóstica adicional para diferenciar mucosite de peri-implantite (GHASSIB; CHEN *et al.* 2019). Até a presente data não foram encontrados estudos descrevendo a evolução e desfecho de tratamento de doença peri-implantar induzida em modelo suíno com a comparação de citocinas pró, nem anti-inflamatórias. Os resultados obtidos neste estudo demonstram algo divergente de estudos em humanos.

Segundo Fonseca e colaboradores (2014) índices aumentados de IL-1 $\beta$  estão relacionados à presença de peri-implantite, e nossos resultados em modelo suíno induzido foram consistentes com o curso da doença em humanos. De maneira geral, as quantidades detectadas de IL-1 $\beta$  mostraram uma tendência de redução no período final da indução da doença. Em modelo experimental suíno, não há outro estudo que tenha feito este tipo de análise, assim como em outros animais maiores; em modelo murino, não há análise de citocinas no fluido crevicular, no entanto, recente publicação demonstrou um aumento de mRNA para IL-1 $\beta$  em sítios de peri-implantite induzida em camundongos (YU; HU *et al.* 2018).

Em relação aos tratamentos, o controle negativo do estudo apresentou comportamento similar aos outros grupos, exceto pela citocina IL-1 $\beta$ . Este comportamento não condizente com as expectativas dos resultados pode ser devido à inclusão do implante do grupo controle negativo no retalho a ser descolado para o tratamento. O simples descolamento do retalho, mesmo que com cautela, pode ter algum efeito positivo na remoção de tecido inflamado. Para contornar esta limitação, seria necessária a inclusão do controle apenas em implantes localizados em extremidades (mesial ou distal), mesmo que com prejuízos à randomização.

A ausência de diferença significantes é explicada principalmente pelo pequeno número de amostra devida, principalmente, a perda de animais. Nosso desenho experimental inicial, incluía coleta de fluido em todas as etapas da indução (juntamente com as radiografias, realizadas apenas para confirmação de perda óssea), estas coletas se tornaram impraticáveis devido a inflamação tecidual e constante contaminação de periopapers como consequência. Quando analisamos apenas o efeito da indução da doença e comparamos os tempos inicial e pré-tratamento, há diferença significantes apenas para IL-1 $\beta$ . O desvio padrão das análises de fluido é frequentemente alto e necessitaria de um número de amostra maior para que alguma diferença fosse detectada. Uma possibilidade seria a análise de expressão genica através de biópsias, caso o desfecho final seja a avaliação da indução da doença.

Uma das limitações do modelo de doença experimental induzida é que o desfecho tanto histológico, quanto microtomográfico e clínico, é mensurado em termos de doença (a diferença está entre sítios menos doentes) pois as medidas realizadas estão focadas nas perdas. Outro fator limitante deste tipo de modelo é que, por ser um modelo de indução natural (MARINELLO; BERGLUNDH *et al.*, 1995, PERSSON; ARAUJO *et al.*, 1999; PERSSON; ERICSSON *et al.* 2001; ZITZMANN; BERGLUNDH *et al.*, 2004), a padronização dos tamanhos dos defeitos é difícil, se não impossível (SCHWARZ; HERTEN *et al.* 2007, SCHWARZ; SAHM *et al.*, 2010). A indução e progressão natural impossibilita o controle do tamanho, largura e presença ou ausência de defeitos infraósseos ou supraósseos, mesmo com tempo de induções iguais.

Neste projeto optamos por duas fases para evitarmos perdas de implantes por falha no tempo de osseointegração e trauma pela oclusão do animal, isto, no entanto, pode ser solucionado com remoção em altura dos dentes superiores (ajuste oclusal), tal medida removeria uma sedação do protocolo experimental, além de reduzir o tempo experimental em, pelo menos, 2 meses. Com a experiência adquirida neste estudo, a quantidade de sedações nos animais pode ser reduzida esperando-se um tempo maior para a checagem da indução com raio-x periapical para 10 semanas pós instalação de ligaduras, além de instalação de implantes em fase única, com cicatrizadores.

*CONCLUSÃO*

---

## 6. CONCLUSÃO

O estudo teve sucesso em promover a indução da doença peri-implantar em modelo suíno causando um *shift* de uma microbiota preponderante compatível com saúde inicialmente, para uma patogênica ao final da indução, com grandes quantidades de bactérias do complexo vermelho.

A análise histomorfométrica quantitativa de inflamação demonstrou que o grupo controle negativo apresentou scores aumentados com indícios que podem denotar reabsorção óssea progressiva devido à falta de tratamento, não sendo possível detectar ganhos ósseos significantes nas amostras na comparação dos dados lineares, tanto com o uso da microtomografia quanto com a avaliação histomorfométrica.

A análise microtomográfica nos permitiu confirmar que obtivemos êxito na indução da doença peri-implantar em Minipigs, mesmo que a maioria de defeitos ósseos encontrados foram com perda óssea horizontal combinados com defeitos infraósseos, fator contribuinte para o planejamento e tratamento das doenças peri-implantares.

Na análise imunoinflamatória concluímos que houve diferenças significantes para as citocinas IL-1 $\beta$  (grupo C-) e IL-8 (grupos C+ Teste 2), além da citocina IL-8, que demonstrou diferenças significantes entre os níveis iniciais pré indução e pós indução e entre os níveis pré indução e pós tratamento para o grupo Teste 2.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- BECKER, S. T.; DOERFER, C.; GRAETZ, C.; DE BUHR, W. *et al.* A pilot study: microbiological conditions of the oral cavity in Minipigs for peri-implantitis models. **Laboratory Animals**, 45, n. 3, p.179-183, 2011.
- BERGLUNDH, T.; LINDHE, J.; MARINELLO, C.; ERICSSON, I. *et al.* Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, 3, n. 1, p.1-8, 1992.
- BOTERO, J. E.; GONZALEZ, A. M.; MERCADO, R. A.; OLAVE, G. *et al.* Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. **Journal Of Periodontology**; 76, n. 9, p. 1490-1495, 2005.
- BRAHAM, P.; HERRON, C.; STREET, C.; DARVEAU, R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. **J Periodontol**, 80, n. 11, p. 1790-1798, 2009.
- BRAUN, A.; DEHN, C.; KRAUSE, F.; JEPSEN, S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, 35, n. 10, p. 877-884, 2008.
- BRANEMARK, P. I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B. O. *et al.* Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg**, 3, n. 2, p. 81-100, 1969.
- BRANEMARK, P. I.; HANSSON, B. O.; ADELL, R. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconstr Surg Suppl**, 16, p.1-132, 1977.
- CHO, S. A.; LEE, B. K.; PARK, S. H.; AHN, J. J. The bone integration effects of platelet-rich fibrin by removal torque of titanium screw in rabbit tibia. **Platelets**, 25, n. 8, p. 562-566.
- CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 101, n. 3, p. 299-303, 2006.
- CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A. *et al.* Platelet-Rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 101, n. 3, p.56-60, 2006.
- COELHO, P. G.; BONFANTE, E. A.; PESSOA, R. S. *et al.* Characterization of five different implant surfaces and their effect on osseointegration: a study in dogs. **J Periodontol**, 82, n. 5, p. 742-750, 2011.
- DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 101, n. 3, p.51-55, 2006.

DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 101, n. 3, p. 45-50, 2006.

DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 101, n.3, p. 37-44, 2006.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; DISS, A.; ODIN, G.; DOGLIOLI, P. *et al.* In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 108, n. 3, p. 341-352, 2009.

DONATH, K. & BREUNER, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. **J Oral Pathol**, 11, n. 4, p. 318-326, 1982.

DEGIDI, M.; IEZZI, G.; SCARANO, A.; PIATTELLI A. Immediately loaded titanium implant with a tissue-stabilizing/maintaining design ('beyond platform switch') retrieved from man after 4 weeks: a histological and histomorphometrical evaluation. A case report. **Clin Oral Implants Res**, 19, n.3, p. 276-282, 2008.

DE WAAL, Y. C.; RAGHOEBAR, G. M.; HUDDLESTON SLATER, J. J.; MEIJER, H. J. *et al.* Implant decontamination during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of clinical periodontology**, 40, n. 2, p.186-195, 2013.

ELTER, C.; HEUER, W.; DEMLING, A. *et al.* Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. **The International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants**, 23, n. 2, p. 327-334, 2008.

ERICSSON, I.; PERSSON, L. G.; BERGLUNDH, T.; EDLUND, T. *et al.* The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. **Clinical oral implants research**, 7, p. 320-328, 1996.

ESKAN, M. A.; GREENWELL, H.; HILL, M.; MORTON, D. Platelet-rich plasma-assisted guided bone regeneration for ridge augmentation: a randomized, controlled clinical trial. **J Periodontol**, 85, n. 5, p. 661-668, 2014.

ESPOSITO, M.; GRUSOVIN, M. G.; COULTHARD, P.; WORTHINGTON, H. V. Interventions for replacing missing teeth: treatment of perimplantitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 18, n. 1, p: 1-51, 2006.

ESPOSITO, M.; GRUSOVIN, M. G.; COULTHARD, P.; WORTHINGTON, H. V. The efficacy of interventions to treat peri-implantitis: a Cochrane systematic review of randomised controlled clinical trials. **European Journal of Oral Implantology**, 1, n. 2, p. 111-125, 2008.

FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal Biochem**, 132, n. 1, p. 6-13, 1983.

GOSAU, M.; HAHNEL, S.; SCHWARZ, F.; GERLACH, T. *et al.* Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. **Clinical Oral Implants Research**, 21, n. 8, p.866-872, 2010.

KILKENNY, C.; BROWNE, W.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M. *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. **The Journal Of Physiology**, 160, n. 7, p. 1577-1579, 2010.

HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., DIBART, S., SMITH, C. *et al.* Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. **J Clin Periodontol**, 24, n.10, p. 767-776, 1997.

HANISCH, O.; TATAKIS, D. N.; BOSKOVIC, M. M.; ROHRER, M. D. *et al.* Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2. **The International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants**, 12, n. 5, p. 604-610, 1997.

HAYEK, R. R. A.; ARAUJO, N. S.; GIOSO, M. A. *et al.* Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. **Journal Of Periodontology**, 76, n.8, p. 1275-1278, 2005.

HEITZ-MAYFIELD, L. J.; SALVI, G. E.; MOMBELLI, A.; FADDY, M. *et al.* Implant Complication Research G. Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. **Clinical Oral Implants Research**, 23, n. 2, p. 205-210, 2012.

HICKEY, J. S.; O'NEAL, R. B.; SCHEIDT, M. J.; STRONG, S. L. *et al.* Microbiologic characterization of ligature-induced peri-implantitis in the microswine model. **Journal Of Periodontology**, 76, p. 548-553, 1991.

JAVED, F.; AL-HEZAIMI, K.; SALAMEH, Z.; ALMAS, K. *et al.* Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Cytokine**, 53, n. 1, p. 8-12, 2011.

KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T. E. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. **Periodontol**, 68, n. 1, p. 66-82, 2015.

KOMERIK, N.; WILSON, M.; POOLE, S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. **Photochemistry and Photobiology**, 72, n.5, p. 676-680, 2000.

LEE, J.; SUSIN, C.; RODRIGUEZ, N. A. *et al.* Sinus augmentation using rhBMP-2/ACS in a mini-pig model: relative efficacy of autogenous fresh particulate iliac bone grafts. **Clinical Oral Implants Research**, 24, n. 5, p. 497-504, 2013.

LEVY, S. B. & MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med**, 10, n. 12, p. 122-129, 2004.

LI, J. Y.; WANG, H. L. Biomarkers associated with periimplant diseases. **Implant Dentistry**, 23, n. 5, p. 607-611, 2014.

- LINDHE, J.; MEYLE, J. *et al.* Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, 35, p. 282-285, 2008.
- LIU, Y.; ZHENG, Y.; DING, G.; FANG, D. *et al.* Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. **Stem Cells**, 26, n. 4, p. 1065-1073, 2008.
- LOESCHE, W.; SYED, S. A.; SCHMIDT, E.; MORRISON, E. C. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. **J Periodontol**, 56, p.447-56, 1985
- LULIC, M.; LEIGGENER GOROG, I.; SALVI, G. E., RAMSEIER, C. A. *et al.* One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, 36, n. 8, p. 661-666 2009.
- LASHO, D. J.; O'LEARY, T. J.; KAFRAWY, A. H. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. **Journal Of Periodontology**, 54, n. 4, p. 210-220, 1983.
- MARTINS, M. C.; SHIBLI, J. A.; ABI-RACHED, R. S. G.; MARCANTONIO, E. Progression of experimental chronic peri-implantitis in dogs: **Clinical and Radiographic Evaluation. Journal of Periodontology**, 76, n. 8, p.1367-1373, 2005.
- MONJE, A.; PONS, R.; INSUA, A.; NART, J. Wang H. *et al.* Morphology and severity of peri-implantitis bone defects. **Clin Implant Dent Relat Res**, 21, n. 4, p.1-9, 2009.
- MOMBELLI, A.; DECAILLET, F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. **J Clin Periodontol**, 38, n.11, p. 203-213.
- NAMGOONG, H.; KIM, M.; KU, Y.; RHYU, I. *et al.* Bone reconstruction after surgical treatment of experimental peri-implantitis defects at a sandblasted/acid-etched hydroxyapatite-coated implant: an experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, 42, n. 10. p. 960-966, 2015.
- NOVAES JR, A. B.; RAMOS, U. D.; MUGLIA, V, A. Peri-implantite: etiologia e tratamento. Uma revisão crítica. **ImplantNews**,72, n. 1, p. 505-508, 2014.
- PACKER, S.; BHATTI, M.; BURNS, T.; WILSON, M. Inactivation of proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* using light-activated agents. **Laser Med Sci**, 15, n.1, p. 24-30, 2000.
- PARK, J. B. Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone and tetracycline: a case report. **Gerodontology**, 29, n. 2, p. 145-149, 2012.
- PERSSON, L, G.; ARAUJO, M. G.; BERGLUNDH, T.; GRONDAHL, K.; LINDHE J. Resolution of peri-implantitis following treatment. An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, 10, n. 3, p. 195-203, 1999.
- PERSSON, L. G.; ERICSSON, I.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Osseointegration following treatment of peri-implantitis and replacement of implant components - An experimental study in the dog. **Journal of Clinical Periodontology**, 28, n.3, p. 258-263, 2001.

PERSSON, G. R.; SAMUELSSON, E.; LINDAHL, C.; RENVERT, S. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results. **Journal of clinical periodontology**, 37, n. 6, p. 563-573, 2010.

QIN, Y.; LUAN, X.; BI, L. *et al.* Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. **Lasers Med Sci**, 23, n. 1, p. 49-54, 2008.

RAMOS, U. D.; SUAID, F. A.; WIKESJÖ ULF, M. E.; SUSIN, C. *et al.* Comparison between two antimicrobial protocols with or without guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis. A histomorphometric study in dogs. **Clin Oral Impl Res**, 28, n.11, p.1-8, 2017.

RAMOS, U. D.; SUAID, F.; WIKESJÖ U. M. E.; SUSIN, C. *et al.* Microbiologic effect of two topical anti-infective treatments on ligature-induced peri-implantitis: a pilot study in dogs. **Journal Of Periodontology**, v. 89, n.8, p. 995-1002, 2018.

RAMS, T. E.; DEGENER, J. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. **Clin Oral Implants Res**, 25, n. 1, p. 82-90, 2014.

RENVERT, S.; POLYZOIS, I.; MAGUIRE, R. Re-osseointegration on previously contaminated surfaces: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, 20, n.4, p. 216-227, 2009.

RENVERT, S.; SAMUELSSON, E.; LINDAHL, C.; PERSSON, G. R. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. **Journal Of Clinical Periodontology**, 36, n.7, p. 604-609, 2009.

RODRIGUEZ, J. C.; KOTICHA, T.; EUBANKS, D. L.; RUDEK, I. Influence of microtextured implant surface on peri-implantitis and its treatment: A preclinical trial. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, 33, n. 1, p. 51-57, 2018.

SACHDEVA, S.; AGARWAL, V. Evaluation of commercially available biodegradable tetracycline fiber therapy in chronic periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, 15, n. 2, p. 130-134, 2011.

SAHM, N.; BECKER, J.; SANTEL, T.; SCHWARZ, F. Non-surgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine: a prospective, randomized, controlled clinical study. **Journal Of Clinical Periodontology**, 38, n. 9, p. 872-878, 2011.

SALVI, G. E.; RAMSEIER, C. A. Efficacy of patient-administered mechanical and/or chemical plaque control protocols in the management of peri-implant mucositis. A systematic review. **Journal Of Clinical Periodontology**, 42, n. 16, p. 187-201, 2015.

SEVERINO, V. O.; NAPIMOGA, M. H.; DE LIMA PEREIRA, S. A. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Archives Of Oral Biology**, 56, n. 8, p. 823-828, 2011.

SCHWARZ, F.; SAHM, N.; IGLHAUT, G.; BECKER, J. Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy

of peri-implantitis: a randomized controlled clinical study. **Journal Of Clinical Periodontology**, 38, n. 3, p. 276-284, 2011.

SCHWARZ, F.; SAHM, N.; MIHATOVIC, I.; GOLUBOVIC, V.; BECKER, J. Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis. **Journal Of Clinical Periodontology**, 38, n.10, p. 939-949, 2010.

SCHWARZ, F.; HERTEN, M.; SAGER, M.; BIELING, K. *et al.* Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. **Clinical Oral Implants Research**, 18, n. 2, p. 161-170, 2007.

SENNERBY, L.; PERSSON, L. G.; BERGLUNDH, T.; WENNERBERG, A.; LINDHE, J. Implant stability during initiation and resolution of experimental periimplantitis: an experimental study in the dog. **Clinical Implant Dentistry And Related Research**, 7, n.3, p. 136-140, 2005.

SHIBLI, J. A.; MELO, L.; FERRARI, D. S.; FIGUEIREDO, L. C. *et al.* Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. **Clin Oral Implants Res**, 19, p. 975-982, 2008.

SINGH, G.; ONEAL, R. B.; BRENNAN, W. A.; STRONG, S. L. *et al.* Surgical-treatment of induced peri-implantitis in the micro pig - clinical and histological analysis. **Journal Of Periodontology**, 64, n.10, p. 984-989, 1993.

STABHOLZ, A.; KETTERING, J.; APRECIO, R.; ZIMMERMAN, G. *et al.* Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. **Journal Of Clinical Periodontology**, 20, n. 8, p.557-562, 1993.

STABHOLZ, A.; KETTERING, J.; APRECIO, R.; ZIMMERMAN, G. *et al.* Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. **Journal Of Periodontology**, 64, n. 2, p. 137-141, 1993.

STUBINGER, S.; BUCHER, R.; KRONEN, P.; SCHLOTTIG, F. *et al.* Ligature-Induced Peri-Implantitis in Minipigs Revisited. **Periodontics and Prosthodontics**, v. 2, p. 1-5, 2016.

SUL, Y. T.; JOHANSSON, C.; WENNERBERG, A.; CHO, L. R. *et al.* Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. **The International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants**, 20, n.3, p.349-359, 2005.

SUSIN, C.; STADLER, A. F.; FIORINI, T.; RABELO, M. S. *et al.* Safety and efficacy of a novel anodized abutment on soft tissue healing in Yucatan Minipigs. **Clin Implant Dent Relat Res**, 1, p. 34-43, 2019.

TAKASAKI, A. A.; AOKI, A.; MIZUTANI, K.; SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; WANG, C. Y. *et al.* Application antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and Peri-implant diseases. **Periodontology**, 51, p. 109-140, 2009.

TERRANOVA, V. P.; FRANZETTI, L. C.; HIC, S. *et al.* A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. **J Periodontal Res**, 21, n. 4, p. 330-337, 1986.

TEUGHEL, W.; VAN ASSCHE, N.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clinical Oral Implants Research**, 17, n. 2, p. 68-81, 2006.

TOLJANIC, J. A.; WARD, C. B.; GEWERTH, M. E.; BANAKIS, M. L. A longitudinal clinical comparison of plaque-induced inflammation between gingival and peri-implant soft tissues in the maxilla. **Journal of Periodontology**, 72, n. 9, p. 1139-1145, 2001.

WAERHAUG, J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. **Journal of Periodontology**, 49, n. 3, p. 119-134, 1978.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WETZEL, A. C.; VLASSIS, J.; CAFFESSE, R. G.; HAMMERLE, C. H.; LANG, N. P. Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, 10, n. 2, p. 111-119, 1999.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bondfAWe integration: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, 20, n. 4, p. 172-184, 2009.

WIKESJO, U. M.; BAKER, P. J.; CHRISTERSSON, L. A. *et al.* A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. **J Periodontal Res**, 21, p. 322-329, 1986.

WIKESJO, U. M.; CLAFFEY, N.; NILVEUS, R; EGELBERG, J. Periodontal repair in dogs: effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. **Journal Of Periodontology**, 62, n.3, p. 180-184, 1991.

WOHLFAHRT, J. C.; AASS, A, M, GRANFELDT F, LYGSTADAAS SP. Sulcus fluid bone marker levels and the outcome of surgical treatment of peri-implantitis. **Journal Of Clinical Periodontology**, 41, n. 4, p. 424-431, 2014.

ZITZMANN, N. U.; BERGLUNDH, T.; ERICSSON, I.; LINDHE, J. Spontaneous progression of experimentally induced periimplantitis. **Journal Of Clinical Periodontology**, 39, n.2, p. 182-187, 2004.

*ANEXOS*

---

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética do uso de animais.

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto</small> <b>CEUA</b> <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>		<b>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</b> <b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>	
<b>CERTIFICADO CEUA – FORP/USP</b>			
<p>Certificamos que o projeto intitulado "Comparação do efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na descontaminação de implantes, associados ou não ao uso de L-PRF em defeitos peri-implantares induzidos em minipigs", Protocolo nº 2016.1.836.58.0, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 5.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 17/01/2017.</p>			
Vigência do Projeto	17/01/2017 a 16/01/2019		
Espécie/Linhagem	Suíno / Minipig BR-10		
Nº de animais	9		
Peso/Idade	30-40kg / 1 ano		
Sexo	Macho		
Origem	Minipig Comércio e Desenvolvimento, Campina do Monte Alegre, SP, Brasil		
Ribeirão Preto, 17 de janeiro de 2017.			
 <b>Prof. Dr. Michel Reis Messora</b> Coordenador da CEUA – FORP/USP			
CEUA - FORP/USP			