

JULIANA MAROTTI

**DESCONTAMINAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DENTÁRIOS POR
MEIO DA TERAPIA FOTODINÂMICA**

São Paulo
2008

Juliana Marotti

**Descontaminação da superfície de implantes dentários por meio
da terapia fotodinâmica**

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

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientadora: Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos

São Paulo
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marotti J. Descontaminação da superfície de implantes dentários por meio da terapia fotodinâmica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, 19/01/2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Alfredo e Leonir**, pelo incentivo durante toda a vida, pela formação moral e principalmente pelo amor incondicional, que nortearam meu caminho. Em especial ao meu pai, também cirurgião-dentista formado por esta escola, que me ajudou (e ajuda) muito com a profissão.

Aos meus irmãos, **Tania e Daniel Victor**, pelo amor e carinho em todos esses anos de convívio tão íntimo e intenso.

Ao meu namorado, **Miki**, que dividiu comigo momentos de muita dificuldade, superação e alegria, desde o primeiro ano da Faculdade, nas aulas, laboratórios, cursos, até o dia de hoje, sempre me apoiando, compreensivo e, principalmente, com muita paciência.

Às minhas avós, **D. Albertina e D. Maria**, que com seus doces de laranja e bolinhos de chuva, adocicaram meu paladar e minha vida.

Aos meus **padrinhos, tios, tias, primos e cunhado** que são pessoas muito especiais na minha vida e sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **DEUS**, por permitir trilhar meu caminho, que embora tortuoso, me levou a conquistar todos os meus objetivos.

À minha querida e meiga orientadora, **Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos**, que sempre me apoiou em todas as dificuldades do Mestrado, me ensinou a ter paciência e (tentar) ser menos ansiosa. Por me tratar como uma filha (e acabei descobrindo que tenho muitas semelhanças com a filha dela!).

Ao **Prof. Dr. Glauco Fioranelli Vieira**, que foi quem me iniciou na vida acadêmica e por quem tenho grande estima.

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, quem muito admiro, pelas oportunidades, confiança, incentivo e ter me aberto as portas para o mundo do laser. É um exemplo de amor à profissão e à nossa querida Faculdade, que está cada dia melhor e da qual tenho muito orgulho!

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de Mestrado, em caráter provisório, e à FAPESP pela bolsa de Mestrado (processo 2008/51876-5) e auxílio pesquisa (processo 2007/58045-9), fundamentais para a qualidade e bom andamento deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, representada pela Magnífica Reitora Profa. Dra. Suely Vilela. À Faculdade de Odontologia, representada pelo seu diretor, Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo. À Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá, responsável pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, com área de concentração em Prótese Dentária, pelo trabalho desenvolvido e incentivo à publicação em periódicos.

À todos os docentes do Departamento de Prótese, em especial, ao Prof. Pedro Tortamano Neto, pela ajuda e incentivo contínuo; ao Prof. Mori, quem admiro muito por seu brilhantismo e excelência como protesista, professor e pessoa; ao Prof. Ivo, pelas oportunidades e carinho; ao Prof. Cláudio Sendyk, pelo incentivo e ajuda na Pós-Graduação; à Profa. Malu, pela amizade, transmissão de conhecimentos e sensibilidade com os idosos; e aos Profs. Atlas, Bruno, Stegun, Fernando, Maria Cecília e Carlos Gil pelos ensinamentos desde a época da Graduação.

Às professoras do IPEN, Denise Maria Zezell e Martha Simões Ribeiro, principalmente, pelos conhecimentos aprofundados em física do laser e pela amizade.

À Profa. Dra. Silvana Cai, quem muito me ajudou durante o Mestrado, sempre disponível para aconselhar, um verdadeiro amor de pessoa!!!

Aos técnicos de laboratório do ICB, João e Leo, que foram essenciais para a qualidade da pesquisa.

Ao Prof. Victor Arana, por quem tenho grande admiração e respeito muito, agradeço os conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Aos mestres de Aachen, na Alemanha, Prof. Dr. Norbert Gutknecht e Prof. Dr. Christian Apel, não somente pelos ensinamentos sobre laser, mas também pela hospitalidade durante minha estadia na Alemanha, aprendi muito sobre organização e postura profissional. Ao Prof. Dr. Lampert, que me ensinou sobre a importância de respeitar a hierarquia. Ao Leon Vanweersch, por quem tive grande afinidade, aprendi muito também sobre organização, pontualidade e eficácia. Todos eles foram muito importantes no meu desenvolvimento acadêmico e serei sempre grata por tudo.

Às Professoras do LELO e, acima de tudo, grandes amigas, Ana Cecília Corrêa Aranha e Patrícia Moreira de Freitas, que percorrem comigo a sinuosa

estrada do laser, com todas as suas encruzilhadas, pedras, bifurcações, mas pela qual sempre encontramos a saída!

Aos colegas do LELO: Vinícius, Marcella, Lisiane, Luciane, Sheila, Ricardinho, José Tannous, Pelino, Robles, Tanji, Daniel, Rosely, Bruno, Letícia, Maia, Tânia, Cláudia, Vivi, Ana Maria, Eva, Roberta, Aninha, Jú Goldman, Débora, Luana, Edgar, Simone e Amanda por compartilharem os conhecimentos do laser.

Às minhas amigas e companheiras do LELO e da Alemanha: Alyne, Dai, Leila, Karen e Vanessa. Um agradecimento especial para a minha amiga Marinão, que apesar de termos pouco contato na Graduação, revelou-se uma grande companheira na Pós, depois de compartilharmos o mesmo teto em Aachen. Adoro todas vocês!!!

Aos atuais e ex-funcionários do LELO: Lili, Gê, Patrícia, Haroldo e Joelma, pela dedicação e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Dentística: Miriam Lacalle Turbino, Margareth Oda, Márcia Martins Marques, José Luiz Lage-Marques, José Humberto Antoniazzi, Narciso Garone Neto e Rubens Corte Real de Carvalho pelos ensinamentos durante a Graduação, Estágio e Pós-Graduação.

Aos colegas da disciplina de Escultura Dental: Yuri, Angela, Washington, Celso, Lúcia, Maria Amélia e Ninoshka, por compartilharem momentos especiais durante essa época da minha vida.

Aos colegas da Pós-Graduação do Departamento de Prótese: Alessandra, Mônica, Lucy, Karin, Álvaro, Reinaldo, Cláudio, Danilo, Márcio, Flávia, Jun e Roger. Um agradecimento especial para o João, que me ajudou muito durante a parte experimental!!! À todos os colegas da Disciplina de Prótese Fixa, por compartilharem o conhecimento nessa nobre área.

À todos os funcionários do Departamento de Prótese, pela colaboração em diversos momentos, em especial à Val, Cora, Sandra e Regina.

Às funcionárias da Pós-Graduação: Cátia, Alessandra e Nair, pela eficácia, competência e paciência nos meus momentos de ansiedade.

Aos funcionários da Biblioteca da FOUSP, com quem tive grande contato em todos esses anos na minha busca pelo conhecimento e foram fundamentais para a edição dessa Dissertação, em especial a Sra. Glauci, que foi um anjo!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira, ou Carlinhos para os íntimos, titular do Instituto de Matemática e Estatística da USP, não somente pela enorme ajuda nas minhas análises estatísticas desde a Graduação, mas também por ser uma pessoa com um enorme coração!!!

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Campos, pelo apoio e ensinamentos.

Ao carinhoso Dr. Ayrton Zanesco, grande incentivador e entusiasta da Implantodontia, orientou-me nos meus primeiros passos.

Ao Dr. Paulo Sérgio Zaidan Maluf, hábil especialista em Implantodontia, também muito importante na minha formação na especialidade.

Aos meus amigos: Renata Acay, Alexandra, Cris, Grazi, Bárbara, Randal, Marina Sato, Plopes, Raquel e Fran, que de uma forma ou de outra, tiveram uma grande participação para que eu estivesse aqui hoje e compartilharam momentos muito importantes da minha vida, não somente a acadêmica.

Ao paciente voluntário, que compareceu todas as vezes necessárias e sempre colaborou com a pesquisa.

A todas as pessoas que, com as mais simples palavras ou gestos, me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

“Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre”

Charles Chaplin

Marotti J. Descontaminação da superfície de implantes dentários por meio da terapia fotodinâmica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

As lesões da periimplantite se não tratadas propriamente podem levar à reabsorção óssea e conseqüente perda do implante. Os implantes com superfície rugosa apresentam melhor resposta do tecido ósseo e melhor ancoragem, entretanto facilitam a formação de biofilme sobre sua superfície, dificultando o tratamento da periimplantite. Diversos métodos de limpeza da superfície do implante têm sido descritos, porém podem danificar sua superfície ou gerar resistência a longo prazo. A terapia fotodinâmica (PDT) surge como uma opção viável e de baixo custo para o tratamento da periimplantite. O objetivo deste estudo *in vitro* foi analisar a descontaminação bacteriana da superfície de implantes por meio da terapia fotodinâmica. 60 implantes dentários (TiUnite – Nobel) foram igualmente divididos (n=10) em 4 grupos e 2 subgrupos. Em G1 não houve descontaminação (controle negativo), enquanto em G2 realizou-se a descontaminação pelo método tradicional com gluconato de clorexidina a 0,12% (controle positivo). G3 (PDT – laser+corante) e G4 (sem corante) foram divididos em dois subgrupos cada, sendo que em G3a e G4a utilizou-se a PDT

por 3 minutos, G3b e G4b por 5 minutos. Após 5 minutos em contato com o corante azul de metileno a 0,01% (G3), os implantes foram irradiados (G3 e G4) com laser diodo de baixa potência (AsGaAl, 660 nm, 30 mW) por 3 ou 5 minutos (7,2 e 12 J). Após diluições seriadas, os meios de cultura foram mantidos em atmosfera de anaerobiose por uma semana, e então realizada a contagem das unidades formadoras de colônias para cada grupo. Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney mostraram haver diferença significativa ($p < 0,001$) entre G1 e os demais grupos, bem como G4 comparado com G2 e G3. Melhores resultados de descontaminação foram obtidos para G2 e G3, sem diferença estatisticamente significativa entre si. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a terapia fotodinâmica pode ser considerada um método eficaz para redução bacteriana em superfícies de implantes e que somente a irradiação laser, sem a associação do corante, foi menos eficiente ($p < 0,001$) que a PDT.

Palavras-Chave: Implante dentário, Lasers, Terapia Fotodinâmica, Descontaminação, Clorexidina, Azul de metileno.

Marotti J. Decontamination of dental implants surfaces by photodynamic therapy [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

If periimplantitis lesions are not properly treated, they can lead to bone resorption and loss of the implant. Implants with rough surface present better results and anchorage, however, they can facilitate biofilm formation on their surface, making the treatment of periimplantitis more difficult. Several surface debridement methods have been reported, however, some of them can injury the implant surface or create bacterial resistance in a long term follow-up. The photodynamic therapy (PDT) is a viable and low-cost option for treatment of periimplantitis. The aim of this *in vitro* study was to analyze the decontamination of implant surfaces by means of photodynamic therapy. 60 dental implants (TiUnite – Nobel) were equally distributed (n=10) into 4 groups and 2 subgroups. At G1 group there was no decontamination (negative control), while in G2 the decontamination was made through the conventional method with chlorhexidine gluconate 0.12% (positive control). G3 (PDT – laser+dye) and G4 (without dye) were divided in two subgroups each; while in G3a and G4a PDT was carried out for 3 minutes, G3b and G4b, was for 5 minutes. After five minutes in contact with methylene blue 0,01% dye (G3), the implants were irradiated (G3 and G4) with a diode low-power laser

(AsGaAl, 660 nm, 30 mW) for 3 or 5 minutes (7.2 and 12J). After the dilutions, the culture media were kept in anaerobiosis atmosphere for one week, and then the counting of bacteria colonies was done for each group. The statistical tests of Kruskal-Wallis and Mann-Whitney showed significant difference ($p < 0,001$) between G1 and other groups, as well as G4 compared with G2 and G3. Better results of decontamination were obtained in G2 and G3, with no statistical significance between them. The results of this study suggest that the photodynamic therapy can be considered an efficient method of bacteria reduction of implants surfaces, and only the laser irradiation, without dye association, was less efficient ($p < 0,001$) than PDT.

Keywords: Dental implantation, Lasers, Photodynamic therapy, Decontamination, Chlorhexidine, Methylene Blue.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
CO ₂	dióxido de carbono
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
λ	comprimento de onda
μm	micrometro
mL	mililitro
mm	milímetro
mW	mili Watt
nm	nanômetro
AsGaAl	arseneto de gálio e alumínio
Er,Cr:YSGG	granada de ítrio, escândio e gálio dopada com érbio e cromo
Er:YAG	granada de ítrio e alumínio dopada com érbio
fs	fentosegundo
g	grama
g/mol	grama por mol
h	hora
He-Ne	hélio e neônio
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado

Laser Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)

Nd:YAG granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio

ns nanosegundo

PDT Photodynamic Therapy (terapia fotodinâmica)

pH potencial hidrogeniônico

s segundo

TBO azul de orto-toluidina

UFC Unidades formadoras de colônias

W Watt

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Periimplantite	24
2.1.1 Tratamentos convencionais propostos	27
2.1.2 Superfície dos implantes dentários	34
2.3 Laser	41
2.3.1 Laser de alta potência	44
2.3.2 Laser de baixa potência	48
2.4 Terapia Fotodinâmica	56
2.5 Azul de metileno	65
3 PROPOSIÇÃO	69
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1 Grupos	70
4.2 Contaminação	71
4.3 Descontaminação	73
4.4 Análise da descontaminação	77
5 RESULTADOS	79
6 DISCUSSÃO	87

7 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICES.....	111
ANEXOS.....	118

1 INTRODUÇÃO

Vários fatores etiológicos estão associados com a perda do implante dental, como erro no planejamento e/ou ato cirúrgico, cargas oclusais prematuras e, principalmente, infecções periimplantares (KLOKKEVOLD; NEWMAN, 2000).

A periimplantite é uma doença infecciosa que afeta os tecidos periimplantares, como a gengiva e osso de suporte. É uma infecção local e relativamente superficial, causada por uma microflora específica bem conhecida que se estabelece na superfície do implante, cujos sinais e sintomas são muito parecidos com os da periodontite (ERICSSON et al., 1996; MOMBELLI; LANG, 1998). As lesões da periimplantite são caracterizadas por inflamação da gengiva, migração apical do epitélio juncional e exposição das roscas do implante ao ambiente oral, gerando bolsas periodontais. Se não tratada propriamente, pode levar à reabsorção óssea e conseqüente perda do implante (HAYEK et al., 2005; KELLER; BRAGGER; MOMBELLI, 1998).

Os implantes com tratamento de superfície apresentam melhor resposta do tecido ósseo e melhor ancoragem necessitando de maior torque para remoção (HENRY, 2000) por aumentar a área de contato osso/implante (ALBREKTSSON; SENNERBY, 2000; LAZZARA et al., 1999). Além disso, todo tratamento que aumente a rugosidade da superfície dos implantes aumenta também a camada de óxido de titânio, que é um dos fatores mais

importantes no processo de adesão e diferenciação celular (KELLER et al., 2003; LI et al., 2002; MALUF et al., 2007).

Visando acelerar o processo de osseointegração dos implantes, foram desenvolvidos diversos tipos de tratamentos da superfície dos implantes, que podem ser divididos em tratamentos por adição (eletroquímico, plasma de titânio) ou subtração (ataque ácido, jateamento abrasivo, irradiação com laser) e/ou associação entre as técnicas. Entretanto, as superfícies tratadas, por terem maior rugosidade e porosidades, permitem maior acúmulo de bactérias, dificultando a manutenção da saúde periimplantar (MALUF et al., 2007).

Diversos métodos de limpeza da superfície do implante têm sido descritos, objetivando evitar a perda dos implantes: solução de clorexidina, ácido cítrico, jateamento abrasivos, ultrassom, tratamentos mecânicos com curetas, entre outros. Todavia, alguns métodos de limpeza podem danificar a superfície do implante. A administração sistêmica de antibióticos é válida durante a fase do tratamento, mas pode gerar resistência a longo prazo (DÖRTBUDAK et al., 2001).

Um dos métodos atualmente utilizados é o uso de solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, mas com resultados ainda insatisfatórios (EMILSON, 1977; HAYEK et al., 2005; THOMAS et al., 2000). O gluconato de clorexidina é uma solução anti-séptica que combate, principalmente, bactérias Gram positivas (G+), sendo pouco eficaz contra Gram negativas (G-). Tem ação bactericida e bacteriostática (EMILSON, 1977; THOMAS et al.,

2000). Entretanto, seu uso contínuo ou em concentrações mais elevadas pode levar a um aumento da resistência bacteriana, devido à adaptação fisiológica da parede celular para prevenir a entrada do biocida, conforme citado por Thomas et al. (2000) em um estudo com *Pseudomonas aeruginosa*.

Uma nova técnica para descontaminação da superfície dos implantes é o tratamento com laser. Na Medicina e na Odontologia os lasers têm sido utilizados como meio de diagnóstico e tratamento de várias doenças, principalmente por seus efeitos contra microorganismos em preparos cavitários, na redução bacteriana intracanal e de bolsas periodontais. Os lasers mais utilizados em Odontologia para esse fim são os de alta potência (neodímio, érbio, diodo e CO₂), entretanto, podem causar um aumento de temperatura indesejável intrapulpar ou no ligamento periodontal, levando a reabsorções ósseas ou necrose pulpar, quando os parâmetros utilizados não são corretamente controlados. Outra desvantagem dos lasers de alta potência é o alto custo dos equipamentos (STUBINGER et al., 2005; YAMADA JR et al., 2004; YEH; JAIN; ANDREANA, 2005).

Por outro lado, os lasers de baixa potência não provocam efeito térmico significativo, não danificam a estrutura do implante e, quando associados a corantes, geralmente exógenos, podem produzir morte microbiana. Este processo é conhecido por Terapia Fotodinâmica ou PDT (*Photodynamic Therapy*) (YAMADA JR et al., 2004).

A PDT consiste na associação de um agente fotossensibilizante e uma fonte de luz objetivando-se a morte celular (utilizada em tratamento de tumores). O mecanismo de ação acontece quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato, como o oxigênio ou a água, o agente fotossensibilizante transfere a energia ao substrato ao retornar para seu estado natural, formando espécies de vida curta e altamente reativas, como o oxigênio singleto, que podem provocar sérios danos a microorganismos via oxidação irreversível de componentes celulares. Vários autores relatam danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular. A ação seletiva da PDT, por não afetar as células saudáveis, é uma das mais importantes características dessa terapia (DÖRTBUDAK et al., 2001; HAYEK et al., 2005; YAMADA JR et al., 2004).

Para este estudo foi escolhido o corante azul de metileno por suas propriedades de baixa toxicidade, potencial antimicrobiano, não apresenta interação medicamentosa, aplicação tópica ou intravenosa, solubilidade em água, lavável, não causa manchamento nos tecidos nem nos componentes protéticos, baixo custo e ter absorção na faixa do vermelho do espectro eletromagnético entre 600 e 660nm. Além disso, seu uso e benefícios estão amplamente divulgados na literatura, sendo utilizado na área médica há mais de 100 anos (TEICHERT et al., 2002; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001).

Apesar de estudos de PDT terem sido feitos objetivando a descontaminação da superfície de implantes, não há ainda um consenso na literatura sobre qual parâmetro de irradiação na PDT seria ideal para uma melhor descontaminação bacteriana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Periimplantite

Para o sucesso da reabilitação com implantes dentários é necessário, antes de tudo, que o implante esteja osseointegrado e assim o permaneça. Para isso, alguns fatores determinam o sucesso do tratamento: indicação, planejamento, condição sistêmica do paciente, qualidade e quantidade de osso na área que receberá o implante, tipo da superfície do implante, técnica e habilidade cirúrgica, higiene bucal e controles periódicos (GEORGE et al., 1994).

Assim como nos dentes naturais, não havendo manutenção de uma adequada higiene oral, os implantes dentários são acometidos por infecção bacteriana, a periimplantite. Enquanto a mucosa periimplantar difere da gengiva em relação à sua vascularização, conteúdo de colágeno e disposição das fibras do tecido conectivo, a resposta à inflamação é similar (BERGLUNDH et al., 1992). Mombelli e Lang (1998) descrevem a periimplantite como uma doença que afeta os tecidos periimplantares, como a gengiva e osso de suporte, sendo uma infecção local causada por uma microflora específica. Os sinais clínicos que se destacam são:

inflamação do tecido mole, sangramento, supuração à sondagem e perda óssea avançada (PERSSON et al., 2001).

Vale ressaltar a diferença entre “peri-mucosite” (ou “mucosite periimplantar”) e “periimplantite”. Enquanto a primeira refere-se a uma inflamação reversível dos tecidos moles ao redor dos implantes sem perda óssea, a segunda refere-se à inflamação irreversível dos tecidos de suporte periimplantar. Assim, a “peri-mucosite” corresponderia à gengivite, enquanto a “periimplantite”, à periodontite (RENVERT; ROOS-JANSKER; CLAFFEY, 2008).

O diagnóstico da periimplantite é um desafio clínico e está baseado nos tecidos ao redor do implante (MISCH, 1993; MOMBELLI, 1997; MOMBELLI; LANG, 1998). Os aspectos comumente monitorados são: dor, fixação rígida, profundidade à sondagem, índice de sangramento, avaliação radiográfica da perda óssea e som à percussão (MEFFERT; LANGER; FRITZ, 1992; MISCH, 1993; MOMBELLI, 1997; MOMBELLI; LANG, 1998). Os sinais da periimplantite variam desde sangramento à suave sondagem, bolsas periimplantares maiores que 4 mm, perda da crista óssea, até supuração, mobilidade e dor. Neste estágio da doença, pode ser muito tarde para iniciar o tratamento preventivo e/ou corretivo para restabelecimento do implante à função (NOROWSKI; BUMGARDNER, 2008).

Alguns autores relatam que a incidência da periimplantite pode variar de 0,3 a 10,3%, dependendo da metodologia de análise utilizada (BERGLUNDH; PERSSON; KLINGE, 2002; ESPOSITO et al., 1998; LANG et al., 2004). Entretanto, essa incidência tende a aumentar em virtude do maior número de usuários de próteses implanto-suportadas (JEPSEN et al., 1996).

Evidências recentes, em relação à dinâmica da colonização ao redor dos implantes, salientam a importância do controle da infecção anteriormente a instalação do implante no paciente parcialmente dentado (HEITZ-MAYFIELD, 2008). A microflora do sulco periimplantar é estabelecida de 30 minutos a duas semanas após colocação do implante e é praticamente a mesma em relação aos dentes adjacentes (FURST et al., 2007; QUIRYNEN et al., 2006). Mesmo em pacientes totalmente edêntulos com histórico de extração dentária recente, é possível encontrar os microorganismos provenientes de uma prévia periodontite, sugerindo que os patógenos periodontais podem ficar retidos por um período prolongado em sítios edentados, facilitando a recolonização e comprometendo a saúde dos tecidos após a instalação dos implantes (EMRANI; CHEE; SLOTS, 2008).

O acúmulo e desenvolvimento do biofilme na superfície do implante é a principal causa (aliada ou não a fatores agravantes, como carga oclusal excessiva) da periimplantite (LEONHARDT; DAHLEN; RENVERT, 2003; RENVERT; ROOS-JANSKER; CLAFFEY, 2008; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Essa rápida colonização do tecido periimplantar tem sido associada principalmente às bactérias Gram-negativas (MOMBELLI; LANG, 1998; PONTORIERO et al., 1994; QUIRYNEN et al., 2006), incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, causando a periimplantite. Por outro lado, bactérias Gram-positivas são predominantes em sítios periimplantares saudáveis (MOMBELLI; LANG, 1998). Curiosamente, alguns estudos identificaram bactérias presentes na periimplantite que não são comuns na cavidade oral como *S. aureus* (KRONSTROM, SVENSON et al., 2001; LEONHARDT; RENVERT;

DAHLEN, 1999). A identificação dos microorganismos presentes irá implicar na escolha da estratégia para o tratamento da periimplantite (HEITZ-MAYFIELD, 2008).

2.1.1 Tratamentos convencionais propostos

O tratamento da periimplantite inclui técnicas não-cirúrgicas, cirúrgicas ou a combinação de ambas, de acordo com as necessidades específicas de cada caso. Uma abordagem não-cirúrgica envolve a administração local ou sistêmica de antibióticos, tratamentos químicos (soluções anti-sépticas) e mecânicos (curetagem, raspagem, jateamento abrasivo), além da instrução de higienização. Não sendo suficientes tais medidas, é indicado tratamento por meio de acesso cirúrgico, com abertura de retalho, cujo objetivo é ter fácil acesso ao local da lesão para terapia de descontaminação (química e mecânica), reparação do defeito ósseo (regeneração óssea guiada) e de tecido mole (enxerto gengival) (FRANCIO et al., 2008; KLINGE; GUSTAFSSON; BERGLUNDH, 2002; KOTSOVILIS et al., 2008; LINDHE; MEYLE, 2008; MOMBELLI; LANG, 1998; NOROWSKI; BUMGARDNER, 2008; ROOS-JANSKER, RENVERT; EGELBERG, 2003; SALVI et al., 2007).

Um consenso foi proposto por Lang et al. (2004) com recomendações de procedimentos clínicos em relação à sobrevida e complicações dos

implantes dentários, que denominaram CIST (Terapia de Suporte Cumulativa e Interceptiva). Esse protocolo incluiu quatro modalidades de tratamento: A = raspagem mecânica e polimento; B = tratamento anti-séptico; C = tratamento antibiótico; D = cirurgia regenerativa ou ressectiva. Para o protocolo B indicou-se o uso de digluconato de clorexidina a 0,1% e 0,2%, bochechos por 30 segundos com 10 mL, aplicação de gel de clorexidina 0,2% ou irrigação com clorexidina 0,2%, duas vezes ao dia, de 3 a 4 semanas. O protocolo C incluiu ornidazol (1000 mg/dia) ou metronidazol (250 mg três vezes por dia) por 10 dias, ou uma combinação de amoxicilina (375 mg três vezes ao dia) com metronidazol (250 mg três vezes ao dia) por 10 dias. Foi adotado tratamento antibiótico local com uso de fibras de tetraciclina e microesferas de minociclina. No tratamento cirúrgico, utilizou-se apenas barreiras de membranas ou combinadas ao enxerto ósseo autógeno. O tratamento ressectivo pode ser considerado quando o defeito periimplantar não for apto a receber tratamento regenerativo. Em regiões que a profundidade de sondagem é menor ou igual a 3 mm, não havendo presença de biofilme e sangramento, o tratamento não é necessário, porém se o biofilme e sangramento estão presentes é preciso usar o protocolo A. Quando a profundidade de sondagem for de 4 a 5 mm, utiliza-se o protocolo A+B. O mesmo protocolo é empregado quando a profundidade de sondagem é maior que 5 mm, apresenta sangramento à sondagem e não há perda óssea. Quando a profundidade de sondagem for maior que 5 mm, existir sangramento à sondagem e a perda óssea for menor ou igual a 2 mm,

o protocolo sugerido é A+B+C, mas se a perda óssea for maior que 2 mm o protocolo indicado é A+B+C+D.

Renvert et al. (2008), em uma revisão sistemática da literatura, citaram 24 estudos sobre abordagens não-cirúrgicas para o tratamento da periimplantite e concluíram que tais medidas não foram efetivas. Esses resultados confirmam dados publicados pela 6ª Reunião da Academia Européia de Periodontia, em 2008, sobre consenso do tratamento da doença periimplantar (LINDHE; MEYLE, 2008). Sendo a principal causa da doença a presença de bactérias, é importante implementar medidas terapêuticas anti-infecção e que a terapia não-cirúrgica tem resultados imprevisíveis. Além disso, os autores reportaram que ainda são limitadas as evidências sobre a real efetividade da administração de antibióticos via sistêmica.

Objetivando avaliar o efeito de antibióticos sistêmicos para o tratamento da periimplantite, Ericsson et al. (1996) instalaram 30 implantes na mandíbula de cinco cães e, após indução da lesão por ligaduras, os animais foram separados em dois grupos onde ambos receberam doses de amoxicilina e metronidazol durante 21 dias, porém só no grupo teste foi realizado retalho para debridamento e aplicação de delmopinol. Os autores relataram que somente a antibioticoterapia não foi capaz de eliminar a lesão periimplantar. Além disso, observou-se que houve falha na re-osseointegração devido a uma estreita cápsula de tecido conjuntivo fibroso que se interpôs entre a superfície do implante e o osso neoformado. Este achado também foi descrito nos estudos de Persson et al. (1996, 1999, 2001).

Um estudo *in vivo* (MOMBELLI et al., 2001) avaliou a efetividade da administração local de tetraciclina para tratamento da periimplantite. Foram selecionados 25 pacientes, sendo que 30 implantes com evidência radiográfica de perda óssea circunferencial e profundidade à sondagem $\geq 5\text{mm}$ foram tratados por meio de inserção de fibras de tetraciclina hidrocloreto nas bolsas periimplantares e permaneceram *in situ* por 10 dias. Foi realizada uma análise microbiológica, radiográfica, índice de biofilme, grau de inflamação e profundidade à sondagem. Houve redução da profundidade à sondagem de 6,0 para 4,1 mm ($P < 0,001$), redução do índice de sangramento ($P < 0,001$), redução não significativa do defeito ósseo e redução bacteriana ($P < 0,001$). Os autores concluíram que a terapia teve efeito positivo em relação aos parâmetros clínicos e microbiológicos, desde que a lesão periimplantar não esteja em estado avançado.

Um estudo clínico avaliou por 12 meses a eficácia da administração de microesferas de minociclina hidrocloreto 1mg (Arestin®) em casos de periimplantite. Antes da utilização das microesferas, foi realizada instrução de higienização, raspagem com curetas de fibra de carbono, polimento com taça de borracha e aplicação de clorexidina gel a 0,2% duas vezes ao dia. Para detecção da presença de bactérias utilizou-se método de hibridização de DNA durante os 360 dias da terapia. Concluiu-se que houve eficácia a longo prazo somente sobre a espécie *A. actinomycetemcomitans* (PERSSON et al., 2006).

As esferas de minociclina foram novamente utilizadas em um estudo recente, no grupo controle houve aplicação tópica de gel de clorexidina a

0,2%. Em ambos os grupos realizou-se debridaç o mecânica prévia. O tratamento foi promovido no primeiro dia, após 30 e 90 dias. Os pacientes foram acompanhados após 10 dias, 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Os resultados mostraram que a minociclina foi significativamente melhor que a clorexidina em relação à profundidade   sondagem nos dias 30, 90 e 180, mas não houve diferença entre os grupos em relação   redução bacteriana. Concluiu-se que o uso das microesferas de minociclina são benéficas para o tratamento da periimplantite, entretanto a terapia deve ser repetida (RENVERT et al., 2008).

Outro antibiótico t pico analisado foi o AtridoxTM que libera a doxiciclina lentamente. A análise foi realizada, após debridamento mecânico e instrução de higienização, inicial e após 18 semanas por meio de  ndice de sangramento   sondagem e profundidade da bolsa periimplantar. Os pacientes que tiveram o medicamento adicionalmente ao tratamento convencional apresentaram menor profundidade da bolsa periimplantar, entretanto, observou-se maior  ndice de sangramento   sondagem ($p=0,001$). Os autores concl  ram que a aplicação do AtridoxTM apresentou benefícios significativos a curto prazo quando associada ao debridamento mecânico (BUCHTER et al., 2004).

Em uma revisão de literatura realizada por Roos-Jansaker et al. (2003) houve um consenso sobre a importância, na terapia inicial, das orientações de higiene bucal, raspagem supra e subgingival, ajustes oclusais e tratamento antimicrobiano t pico. A administração de antibióticos via sistêmica também é recomendada no tratamento da periimplantite, se

necessária. Para redução de bolsas profundas, que não foram resolvidas apenas com a terapia inicial, sugeriu-se raspagem em campo aberto com plastia óssea e reposicionamento apical do retalho. Também foram recomendados o alisamento da superfície do implante e sua desintoxicação química com agentes, que podem ser jato de carbonato de sódio abrasivo, ácido cítrico ou um agente antimicrobiano. O tratamento regenerativo foi sugerido em defeitos de duas ou três paredes, circunferenciais e de deiscência, associando o uso de membranas com enxertos ósseos.

No estudo de Mombelli e Lang (1998), os efeitos da irrigação com clorexidina a 0,12% não demonstraram eficácia em pacientes com periimplantite com profundidade de sondagem maior que 3 mm. O uso de agentes antimicrobianos sistêmicos combinados com irrigação de clorexidina 0,5% nos sítios de bolsas maiores que 3 mm se mostrou efetivo contra bactérias anaeróbias estritas, e houve uma diminuição imediata nos índices de sangramento. A instrumentação mecânica realizada com curetas plásticas, ou sistemas de jato de ar abrasivos, ou polimento com taças de borracha e pedra-pomes, foi o método que deixou a superfície mais polida. Somente após o processo inflamatório da periimplantite estar controlado deve ser realizada a melhora ou o restabelecimento da osseointegração com uso de procedimentos regenerativos. Os autores sugerem que os antibióticos e agentes anti-sépticos devem ser empregados para evitar nova infecção no local da regeneração. A regeneração tecidual guiada também foi utilizada para diminuir os defeitos ósseos, mas na presença de patógenos periodontais não houve sucesso. A incompleta descontaminação da

superfície foi vista como o maior obstáculo para o desenvolvimento de osso no local do implante exposto.

Testando a efetividade de um novo aparelho de ultrassom (sistema Vector®), Karring et al. (2005) trataram 11 pacientes, sendo que cada um possuía dois implantes acometido pela periimplantite. Em um implante foi realizado tratamento por meio de curetas de fibra de carbono, enquanto que no outro foi utilizado o sistema Vector®. Nova sessão de debridamento foi realizada após três meses. Após 3 e 6 meses de acompanhamento, notou-se pouca melhora no índice de biofilme ao redor de ambos os grupos ($p>0,1$). No sexto mês, quatro indivíduos do grupo teste e apenas um do grupo controle não apresentaram mais sangramento à sondagem. Não houve diferença entre os grupos em relação ao nível ósseo e profundidade à sondagem após 6 meses.

Leonhardt, Dahlen e Renvert (2003) avaliaram a associação da técnica cirúrgica com tratamento antimicrobiano para tratamento da periimplantite. Foram selecionados nove pacientes parcialmente dentados diagnosticados com periimplantite, submetidos à cirurgia para exposição da superfície dos implantes que foram tratados com peróxido de hidrogênio a 10%. Receitou-se aos pacientes antibiótico via sistêmica de acordo com o tipo de bactéria presente em cada caso e bochecho com digluconato de clorexidina 0,2% duas vezes ao dia. O tratamento foi avaliado clinicamente, microbiologicamente e radiograficamente após 6 meses, 1 e 5 anos. Os resultados mostraram que foram perdidos 7 dos 26 implantes, apesar da significativa redução do índice de biofilme e sangramento. Quatro implantes

continuaram a perder osso, nove não se alteraram e seis tiveram ganho ósseo. Os autores concluíram que, apesar da terapia combinada de tratamento e retratamento, apenas 58% dos implantes obtiveram sucesso.

2.2 Superfícies dos implantes dentários

Em relação à superfície, os implantes podem ser classificados em: liso (sem tratamento de superfície) ou rugoso (com tratamento de superfície). Os implantes de superfície lisa são apenas usados, com a vantagem de dificultarem a colonização bacteriana. Pelo mesmo motivo, já os implantes com tratamento de superfície, por serem mais rugosos, ao mesmo tempo em que facilitam a adesão dos osteoblastos, otimizando o processo de osseointegração, permitem maior acúmulo de bactérias, viabilizando o desenvolvimento da periimplantite (MALUF et al., 2007).

Superfícies rugosas expostas ao meio bucal são mais propícias à adesão e à formação do biofilme e sua maturação, e superfícies com alta energia acumulam mais bactérias, por estabelecer ligações mais eficazes. A cinética de colonização e maturação é acelerada, aumentando o risco de patologias. Embora ambas variáveis devam ser consideradas, a rugosidade suplanta a energia livre de superfície. Com relação ao meio subgengival, com maiores facilidades para sobrevivência de microrganismos anaeróbios

estritos, a importância das características de superfície parece ser pequena. Porém, a influência da rugosidade e da energia livre das superfícies no aumento da retenção e acúmulo do biofilme supra-gengival é bem estabelecida, apesar de ser menos óbvia em pacientes com boa higiene oral. Nesse caso, após alguns dias de formação do biofilme sem interferências, superfícies rugosas abrigarão uma maior proporção de organismos móveis e espiroquetas (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995).

Dentre os implantes rugosos, os tratamentos de superfície podem ser divididos em: tratamento por adição (plasma de titânio, plasma de hidroxiapatita), subtração (ataque ácido, laser, jateamento de areia, zircônia e óxido de alumínio) ou a combinação entre eles (COELHO et al., 2008; LI et al., 2002; MALUF et al., 2007; WENNERBERG, 2003).

A topografia da superfície do implante, sua rugosidade e ainda a orientação e o formato das irregularidades da superfície, estão relacionadas à manutenção da osseointegração a longo prazo (KIM et al., 2003; ONG; CARNES; BESSHO, 2004). O aumento da rugosidade da superfície dos implantes facilita a retenção do coágulo, promove um aumento da área de contato com o tecido ósseo adjacente, aumenta a presença de tecido ósseo na interface e aumenta a molhabilidade da superfície, afetando diretamente a adsorção das proteínas depositadas na superfície. Além disso, facilita a aderência e locomoção das células, melhorando a interação biológica e biomecânica do implante com tecido ósseo (BUSER et al., 1991; DAVIS, 1998; LE GUEHENNEC et al., 2007; PIATTELLI et al., 1998; RAGHAVENDRA; WOOD; TAYLOR, 2005; TRISI; KEITH; ROCCO, 2005; WENNERBERG et al., 1995).

Segundo Kasemo e Lausmaa (1988), os metais para implantes têm sido selecionados com base em suas propriedades biomecânicas e físico-químicas. O aspecto de maior importância à resposta tecidual e à introdução de um material estranho no organismo, independentemente do metal, é a sua superfície, que entra em contato direto com os tecidos, podendo influenciar diretamente a sua biocompatibilidade. É a camada de óxidos da superfície que mantém contato com o tecido e não o metal propriamente dito. As células não se ligam diretamente ao implante, mas sim às glicoproteínas extracelulares que estão adsorvidas à superfície do óxido.

O corpo do implante é de titânio puro (99,75%) com pequenas quantidades de ferro (0,05%), oxigênio (0,10%), nitrogênio (0,03%), carbono (0,05%) e hidrogênio (0,012%). Durante a produção do implante e no processo de limpeza, uma camada de óxido imediatamente se desenvolve em sua superfície. Essa camada é de extrema importância, uma vez que determina suas propriedades das superfícies. A molécula biológica que se aproxima do implante encontra com um óxido de metal, e não com uma superfície metálica (JOHANSSON et al., 1989; ZHAO et al., 2005).

De acordo com Sykaras et al. (2000), o titânio interage com os fluidos biológicos por uma camada de óxido altamente estável, que forma a base da sua excelente biocompatibilidade. A camada de óxidos superficiais que recobre os implantes atua como fator determinante na interação entre osso e implante, e não o titânio propriamente dito (MEFFERT; LANGER; FRITZ, 1992). Quando a superfície do titânio é exposta ao ar, após a usinagem, a camada de óxido começa a se formar imediatamente até alcançar uma espessura

de 2 a 10 μ m em torno do primeiro segundo, conferindo a resistência à corrosão do titânio em contato com os tecidos. O titânio se tornou o material de escolha para a fabricação dos implantes endósseos em virtude da camada de óxido ter alta passividade (não se altera em condições fisiológicas), espessura controlada; rápida formação; habilidade em se reparar instantaneamente, se danificada, resistência ao ataque químico; e módulo de elasticidade compatível ao do osso (SYKARAS et al., 2000).

Durante a confecção de um implante de titânio, o metal passa por processos de fresagem com lubrificantes e refrigerantes, manipulação, contato com ar e preparo da superfície, incorporando contaminantes à camada mais externa da superfície do óxido. Comumente, pequenas quantidades de carbono, cálcio, cloro, enxofre, nitrogênio são encontradas nas superfícies dos implantes. Por não se conhecer bem a influência dessas pequenas quantidades de contaminantes sobre a osseointegração, é aconselhável manter um alto nível de limpeza da superfície dos implantes (KASEMO; LAUSMAA, 1988; MEIRA; ARGENTO; CAMPOS, 2001).

É consenso na literatura que a rugosidade superficial dos implantes dentários otimiza o processo de osseointegração, quando comparado aos implantes de superfície lisa, ao estimular a adesão e proliferação dos osteoblastos devido ao maior contato do coágulo com a superfície durante a fase inicial da reparação tecidual (LE GUEHENNEC et al., 2007; LINDHE; KARRING; LANG, 2005; PARENTE et al., 2007; SCHWARTZ; NASAZKY; BOYAN, 2005). Todavia, diversos estudos demonstram que o acúmulo do biofilme bacteriano na superfície rugosa de um implante exposto a cavidade bucal é

significativamente maior que nos implantes de superfície lisa (ELTER et al., 2008; LINDHE; KARRING; LANG, 2005; MOMBELLI; LANG, 1992; PARENTE et al., 2007; TEUGHELS et al., 2006).

Um estudo em cães avaliou a osseointegração de quatro diferentes tipos de superfície de implantes (lisa, tratada com spray de plasma e titânio, jato de areia + condicionamento ácido e spray de plasma de titânio associada a uma perfuração mimetizando a furca) após indução da periimplantite. Todos os implantes foram submetidos à aplicação tópica diária de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia com metronidazol por 10 dias e debridamento local. Os implantes com superfície tratada por jato de areia + condicionamento ácido obtiveram maior sucesso na osseointegração (75,7%), seguido pelos grupos com superfície tratadas com plasma de titânio (68,1%) e superfície lisa (61,8%). O grupo com superfície tratada com spray de plasma de titânio associada à perfuração não participou das análises devido à perda e infecção dos implantes. Os autores concluíram que apesar das superfícies tratadas apresentarem maior porcentagem de osseointegração, não houve diferença significativa entre os grupos para todos os tipos de superfície (WETZEL et al., 1999).

Zitzmann et al. (2002) avaliaram a influência do tipo de superfície (lisa ou tratada, por condicionamento ácido) do pilar protético de implantes sobre a formação do biofilme em cães. Após seis meses da instalação do biofilme, as biópsias foram obtidas para análise de medidas morfo e histométricas. Os resultados mostraram que não houve influência do tipo de superfície do pilar protético em relação ao tamanho, localização e

composição do biofilme formado, confirmando os resultados obtidos por Quirynen et al. (1993).

Diferentes tipos de superfície de implantes podem influenciar na composição e atividade do biofilme, conforme um estudo de Groessner-Schreiber et al. (2004). Amostras de titânio puro, revestida com TiN ou ZrN foram submetidas por 60 horas ao meio bucal e analisado o número, tipo e atividade de bactérias. Menor número de bactérias foi encontrado na superfície revestida com ZrN. Entretanto, a atividade bacteriana foi menor nos grupos revestidos em relação ao titânio puro. Resultados semelhantes foram encontrados por Scarano et al. (2003) e Groessner-Schreiber et al. (2001).

A adesão e comportamento dos osteoblastos também são influenciados pelo tipo de superfície do implante, conforme relatado por Qu et al. (2007). Foram analisadas superfícies SLA, SLA modificada, por condicionamento ácido hidrofóbico e por condicionamento ácido hidrofílico. Não houve diferença na adesão celular entre as superfícies, entretanto, foi observada maior proliferação celular nas superfícies SLA e por condicionamento ácido hidrofóbica. Após dois de incubação, houve maior formação celular na superfície SLA modificada, bem como maior expressão de fatores de crescimento ósseo (fosfatase alcalina, colágeno tipo I, etc.). Segundo os autores, uma possível explicação pelas propriedades osteogênicas da superfície SLA modificada com maior energia de superfície é a adsorção das proteínas plasmáticas, que têm a capacidade de indução da osteogênese.

Alguns estudos avaliaram a alteração da superfície de implantes irradiados com lasers de alta potência (BERARDI et al., 2008; BEREZNAI et al., 2003; BRAGA et al., 2007; MALUF et al., 2007; VASANTHAN et al., 2008). Objetivando avaliar a descontaminação e o aumento da camada de óxido de titânio na superfície de implantes, Bereznai et al. (2003) utilizaram o laser de alta potência KrF excimer com pulsos ultracurtos de 0,5 fs, seguido de pulsos de ns para polimento da superfície. Os resultados mostraram que houve menor contaminação e formação de uma maior camada de óxido de titânio na superfície do implante. Resultados semelhantes foram observados por Braga et al. (2007) e Maluf et al. (2007), que relataram ter observado aumento considerável da camada de óxido de titânio na superfície dos implantes após irradiação com laser de alta potência, além de gerar uma superfície mais resistente e homogênea, resultado este também confirmado por Berardi et al. (2008) em um estudo recente.

2.3 Laser

Laser é um acrônimo em inglês que significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. O laser é um dispositivo que produz radiação eletromagnética com características especiais que a diferem da luz comum: ela é monocromática (único comprimento de onda), coerente (possui relações de fase bem definidas), e colimada (propaga-se como um feixe). Os lasers utilizados na clínica diária têm comprimento de onda entre o vermelho e infravermelho próximo, portanto, na faixa não-ionizante do espectro eletromagnético. Assim, o laser não tem a capacidade de provocar mutações celulares e, conseqüentemente, o desenvolvimento de neoplasias (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Em 1916, Albert Einstein lançou os fundamentos do laser, a partir da lei de Max Planck. A teoria ficou esquecida até o final da Segunda Guerra Mundial. Em 1953, Charles Hard Townes, James P. Gordon e Herbert J. Zeiger produziam o primeiro maser, um dispositivo similar ao laser, mas produz microondas em vez de luz visível. O maser de Townes não tinha capacidade de emitir as ondas de forma contínua. Nikolai Basov e Aleksander Prokhorov, da União Soviética, trabalharam de forma independente em um oscilador quantum e resolveram o problema da emissão contínua utilizando duas

fontes de energia com níveis diferentes (GROSS; HERRMANN, 2007; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Quando esta radiação tem frequência visível, chama-se laser. O efeito físico por trás de seu funcionamento é a emissão estimulada, descoberta por Albert Einstein, como condição necessária ao equilíbrio térmico da radiação com a matéria. Einstein descobriu, através de considerações teóricas, que não apenas um átomo absorve um fóton (a partícula de luz) incidente e o reemite ao acaso após certo tempo (emissão espontânea), mas que também este mesmo átomo deve reemitir seu fóton absorvido se um segundo fóton interage com ele. O fóton reemitido tem a mesma frequência do fóton que o estimulou e, igualmente importante, tem a mesma fase. 43 anos mais tarde, Theodore H. Maiman, físico americano, criou o primeiro laser de rubi (693 nm) para uso comercial, determinando um grande passo para a utilização do laser e pioneirismo na associação entre a ciência básica e a clínica (BRUGNERA JR; VILLA; GENOVESE, 1991; GROSS; HERRMANN, 2007; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004; TOWNES, 2007).

Um laser funciona desde que se consiga excitar um número mínimo de átomos de determinado material para um nível de energia superior, de modo a se obter uma inversão de população (quando existem mais átomos excitados do que átomos no estado fundamental). Quando isso ocorre, a emissão espontânea de fótons, que acontece naturalmente a todo tempo, é amplificada pelos átomos vizinhos, que vão emitir fótons estimulados pelos primeiros (BRUGNERA JR; VILLA; GENOVESE, 1991).

Estes fótons, por sua vez, estimulam a emissão de outros, num efeito cascata. Para que tudo isso funcione, entretanto, é necessária uma realimentação, ou seja, sempre manter fótons emitidos estimuladamente interagindo com os átomos. Isso é obtido com uma cavidade óptica, uma região do espaço em que se confina luz por algum tempo com o uso de espelhos altamente refletivos e convenientemente alinhados (BRUGNERA JR; VILLA; GENOVESE, 1991; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

O laser, como qualquer outra luz, quando incide sobre um objeto, pode sofrer reflexão, transmissão, espalhamento ou absorção, sendo esta última a mais importante para ação dos efeitos biológicos no tecido. Essas interações da luz com o tecido podem acontecer concomitantemente, sendo que a proporção que cada uma delas ocorrerá irá depender do tecido alvo, sua composição, modo de irradiação e das características e parâmetros da luz incidente. Assim, para que o ângulo de incidência e o de reflexão seja igual a zero, é necessário que a irradiação seja perpendicular ao tecido alvo, a fim de que a absorção da luz pelo tecido seja a máxima possível (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Em Odontologia, os lasers são utilizados nas diversas especialidades como terapia complementar ao tratamento convencional. De uma forma geral, os lasers em Odontologia são divididos em lasers de alta e baixa potência. A escolha do tipo de laser irá depender essencialmente da patologia apresentada e do modo de absorção desejado. Não existe, assim, o laser ideal, porém o mais indicado para cada situação clínica (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004; MAROTTI; ARANHA; EDUARDO, 2007).

2.3.1 Laser de alta potência

Os lasers de alta potência, também conhecidos como lasers em alta intensidade ou lasers cirúrgicos, são principalmente utilizados em cirurgias, descontaminação bacteriana, hemostasia, prevenção, ablação do tecido ósseo e dental. Em Implantodontia, são utilizados no tratamento da periimplantite, na cirurgia de reabertura no segundo estágio cirúrgico e para modificação da superfície do implante objetivando aumento da adesão celular e da camada de óxido de titânio (DEPPE; HORCH; NEFF, 2007; HEINRICH et al., 2008; KREISLER; GOTZ; DUSCHNER, 2002; MALUF et al., 2007; ROMANOS; NENTWIG, 2008; ROMANOS et al., 2006; SHIBLI et al., 2004; STABHOLZ et al., 2003).

Kreisler, Gotz e Duschner (2002) estudaram as potenciais alterações em diversas superfícies de implantes (jateado de areia, condicionamento ácido, spray de plasma de titânio e revestida por hidroxiapatita) com os lasers em alta intensidade mais utilizados na Odontologia (Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂ e AsGaAl) em diversas potências. A análise por MEV constatou que os lasers YAG provocaram derretimento, rachaduras e crateras nas diversas superfícies de implantes. O laser de CO₂ provocou alterações superficiais nas superfícies com condicionamento ácido, revestida por hidroxiapatita e por spray de plasma de titânio. O laser de AsGaAl foi o único que não danificou as superfícies. Os resultados deste estudo indicaram que os lasers de Nd:YAG

e Ho:YAG não são apropriados para uso em descontaminação da superfície de implantes, independentemente da potência utilizada. Os lasers de CO₂ e Er:YAG devem ter a potência controlada para evitar danos às superfícies. Fatores relevantes incluem não somente a potência do laser, como também o modo de irradiação. O laser de AsGaAl mostrou-se ser o mais seguro para evitar danos às diferentes superfícies de implantes.

Romanos et al. (2006) analisaram a adesão de osteoblastos em discos de titânio após irradiação com laser de alta potência. Foram irradiadas diferentes superfícies de implantes (usinada, revestida por hidroxiapatita, jateada por areia e jateada por spray de plasma de titânio) com o laser de CO₂ e Er,Cr:YSGG. Como grupo controle, examinou-se discos não-irradiados. Cultivou-se cultura de osteoblastos nos discos de titânio, que foram examinados através de MEV. Os resultados mostraram que os osteoblastos cresceram em todas as superfícies de implantes, entretanto, maturação das células só pôde ser observada nos grupos irradiados com laser.

Deppe, Horch e Neff (2007) compararam, *in vivo*, em defeitos periimplantares, a eficácia do laser de CO₂ em relação à terapia convencional, com o uso concomitante de beta-tricálcio-fosfato após acompanhamento durante cinco anos. O estudo incluiu 32 pacientes, totalizando 73 implantes. No grupo laser, 22 implantes foram irradiados após abertura de retalho; desses, em 17 implantes foi necessário enxerto ósseo. No grupo controle, após abertura de retalho, realizou-se a descontaminação pelo método convencional. Após quatro meses, não se observou diferença significativa na distância do ombro do implante à crista óssea. No decorrer

do tempo observou-se diferença estatística significativa entre os grupos, sendo mais favorável o grupo laser, entretanto, essa diferença desapareceu ao término do estudo. Os autores concluíram que o laser foi capaz de acelerar o processo de reparação da periimplantite, entretanto, não houve diferença em relação ao grupo controle em uma análise a longo prazo.

Romanos e Nentwig (2008) avaliaram o efeito do laser de CO₂ na descontaminação de defeitos ósseos periimplantares em 15 pacientes. Após irradiação com o laser, o defeito ósseo foi preenchido com enxerto ósseo (BioOss) e coberto com membrana colágena. Em um período de observação de 27 meses, praticamente todos os defeitos ósseos foram preenchidos. Os autores concluíram que a associação da técnica de enxerto com laser de CO₂ para descontaminação pode ser um método efetivo no tratamento da periimplantite. Shibli et al. (2004), em contrapartida, não obtiveram sucesso na descontaminação *in vitro* de implantes perdidos por periimplantite com o laser de CO₂. Entretanto, os autores relataram que o laser de CO₂ não prejudicou a superfície do implante após a irradiação, resultados esses confirmados em estudos anteriores (KATO; KUSAKARI; HOSHINO, 1998; KREISLER; GOTZ; DUSCHNER, 2002; OYSTER; PARKER; GHER, 1995).

Heinrich et al. (2008) estudaram a adesão celular em superfície de implantes irradiados com o laser de alta potência KrF excimer. Analisou-se a adesão de fibroblastos em orifícios feitos com o laser na superfície polida dos implantes dentais por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores observaram que os fibroblastos se aderiram principalmente à

região do orifício no implante realizado com laser e, além disso, formaram pontes dentro da perfuração, cobrindo completamente o orifício realizado, formando uma barreira biológica mais efetiva contra as bactérias. Entretanto, os autores salientam que deve haver um diâmetro mínimo (50 μ m) do orifício para que as células possam ocupá-lo totalmente.

Recentemente, foi relatado um caso clínico onde se utilizou o laser Er,Cr:YSGG para tratamento da periimplantite com acompanhamento de 18 meses (AZZEH, 2008). O paciente do sexo masculino, 28 anos, não-fumante, apresentou-se com queixa de retração gengival ao redor do implante instalado na região do elemento 21. Após análise clínica e radiográfica, observou-se retração gengival de 2 mm, com bolsa periimplantar de 7 mm à sondagem, grau 1 de mobilidade, osso mesio e distalmente. Utilizou-se o laser Er,Cr:YSGG, em diferentes parâmetros de irradiação, para abrir o retalho, remoção do tecido de granulação, perfuração óssea e limpeza da superfície do implante. Para regeneração, associou-se enxerto ósseo e membrana reabsorvível. O paciente foi avaliado após 3, 6, 12 e 18 meses. Em até 12 meses de acompanhamento não houve complicações, com profundidade à sondagem de 3 a 5 mm, regressão de 1 mm da retração gengival, sem sangramento ou mobilidade do implante e com boa formação óssea. Foi observada pequena coleção purulenta em 12 meses. Em 18 meses de pós-operatório, a profundidade à sondagem era de 2 mm, a retração gengival diminuiu 1 mm, sem mobilidade do implante, sangramento e pus, e houve uma melhor formação óssea. Os resultados foram considerados satisfatórios pelo paciente e pelo clínico. O autor concluiu que

o laser Er,Cr:YSGG possibilitou uma cirurgia de tratamento da periimplantite sem complicações, com confiabilidade e excelente satisfação por parte do clínico e do paciente.

2.3.2 Laser de baixa potência

O laser de baixa potência é conhecido também como laser em baixa intensidade, laser terapêutico, soft laser e laser biomodulador. Os lasers de baixa potência utilizados em Odontologia disponíveis no mercado estão na faixa do vermelho (630 a 700 nm) ou do infravermelho próximo (700 a 904 nm) do espectro eletromagnético, que são os comprimentos de onda mais utilizados. A escolha do comprimento de onda do laser (vermelho ou infravermelho) irá depender da estrutura celular que se deseja atingir. O laser vermelho, por ter maior afinidade por pigmentos e menor profundidade de penetração no tecido, é mais indicado no tratamento de lesões superficiais (pele e mucosa), enquanto o laser infravermelho, devido à maior profundidade de penetração, pode interagir com estruturas mais profundas (nervo e músculo) (KARU, 1989a; KARU, 1989b; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Os lasers de baixa potência não causam aumento significativo da temperatura, portanto, não têm a capacidade de descontaminação ou ablação dos tecidos, ao contrário dos lasers de alta potência. Assim, os lasers

de baixa potência têm a função principal de biomodulação, analgesia e modulação do processo inflamatório por meio de efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotomecânicos nas células do tecido irradiado (KARU 1989b; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Na literatura, algumas hipóteses explicam a indução dos efeitos celulares promovidos pelos lasers na faixa do vermelho e do infravermelho (BREITBART et al., 1996; GROSSMAN et al., 1998; KARU, 1989b; LABBE et al., 1990; LUBART et al., 1997; OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS, 1981; POLO et al. 1999; SCHINDL et al., 2000; SMITH, 1991). Basicamente, dois tipos de reação ocorrem em fotobiologia: reações primárias induzidas pela luz (Figura 2.1) e reações secundárias (Figura 2.2) que ocorrem na ausência de luz (SCHINDL et al., 2000). Quatro teorias diferentes explicam as reações primárias:

1. A absorção da luz pelas enzimas mitocondriais resulta em aquecimento local gerado pelo aumento de vibração molecular (OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS, 1981);
2. Efeitos estimulatórios e inibitórios induzidos pela luz laser é resultado respectivamente da absorção da luz por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, resultando em alterações na transferência de elétrons para seus pares reduzidos localizados na mitocôndria (KARU, 1989b; LABBE et al., 1990)

3. Porfirinas endógenas foto-induzem oxigênios singletos (GROSSMAN et al., 1998; POLO et al., 1999); e
4. A luz laser ativa diretamente os canais de Ca^{2+} da membrana celular através de modificações fotofísicas induzindo a entrada de Ca^{2+} intracelular e proliferação celular (SMITH, 1991; BREITBART et al., 1996; LUBART et al., 1997).

REAÇÕES PRIMÁRIAS

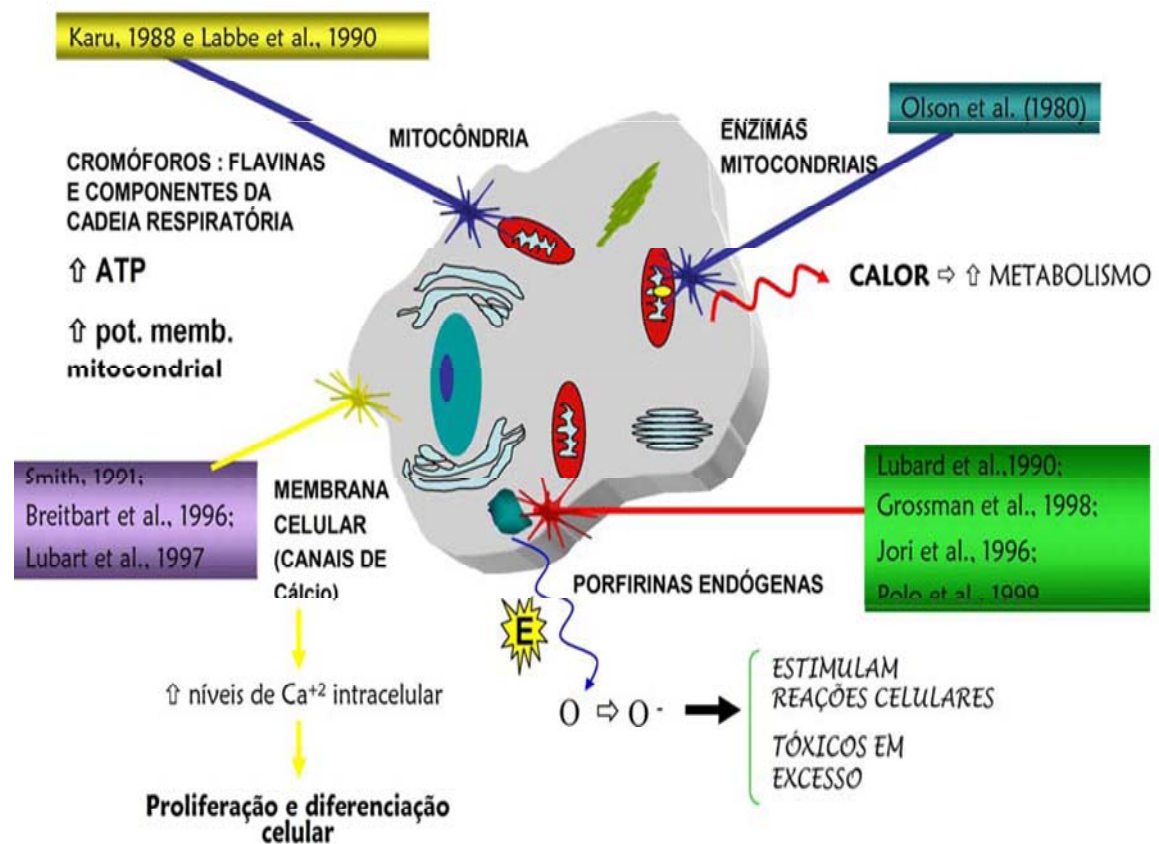


Figura 2.1 – Esquema das teorias que explicam as reações primárias que ocorrem na célula por estímulo da fototerapia. Cortesia de Meneguzzo (2007)

Muito provavelmente dois ou mais desses modelos podem acontecer simultaneamente no tecido irradiado, contribuindo para os efeitos biológicos observados (SCHINDL et al., 2000).

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

REAÇÕES SECUNDÁRIAS

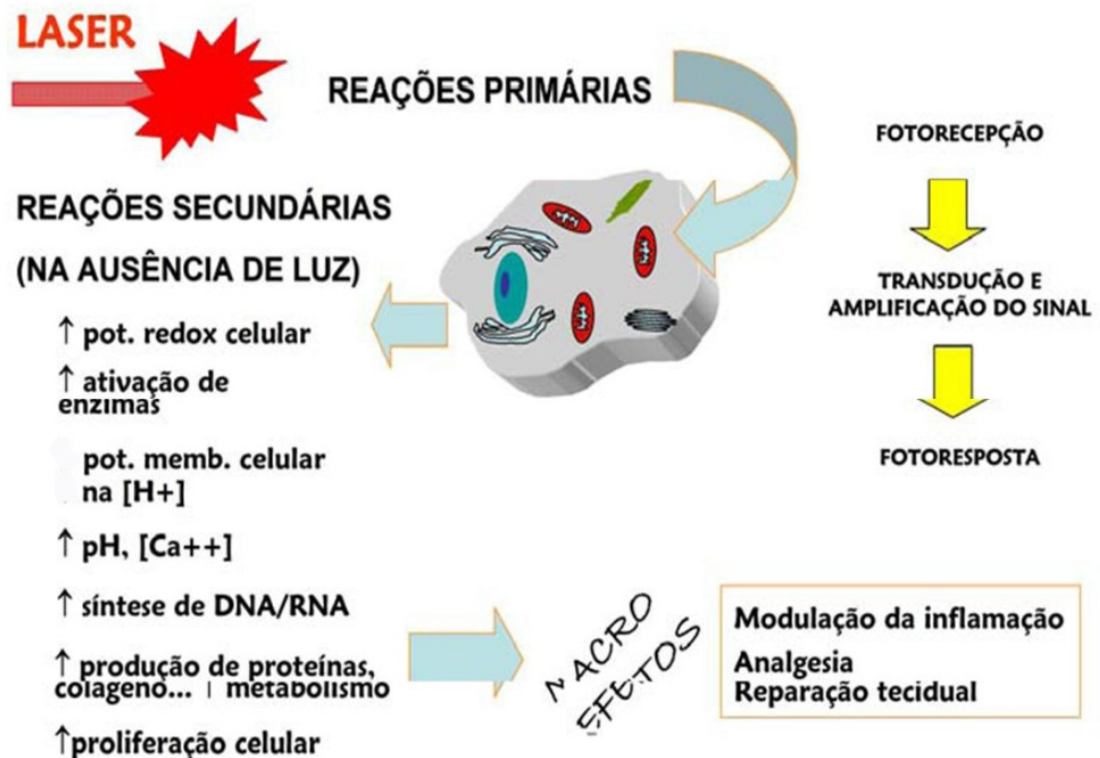


Figura 2.2 – Esquema das reações secundárias a partir do estímulo da fototerapia. Cortesia de Meneguzzo (2007)

Alguns dos mecanismos secundários relatados na literatura são: aumento de metabolismo celular, proliferação e síntese de colágeno, síntese protéica, aumento no potencial de ação de células nervosas, estímulo da formação de DNA e RNA no núcleo celular, efeitos sobre o sistema imunológico pela ativação de linfócitos, formação de capilares estimulada pela liberação de fatores de crescimento e aumento na atividade de leucócitos (ANDERS et al., 1993; BISHT et al., 1994; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006; LOEVSCHELL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; MARQUES et al., 2004; MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Entretanto, para que o laser tenha efeito e seja absorvido, é necessário que a célula esteja em déficit nutricional. A absorção nos tecidos é captada pelos cromóforos naturais, tais como hemoglobina, melanina e citocromos da cadeia respiratória nas mitocôndrias. Após as reações secundárias, é possível observar clinicamente então, os macro-efeitos: modulação da inflamação, redução da sintomatologia dolorosa e aceleração do processo de reparação tecidual (KARU, 1989b).

Clinicamente, a laserterapia é utilizada no tratamento de parestesia, paralisia, nevralgia, afta, mucosite, herpes labial, queilite angular, hipersensibilidade dentinária, alveolite, pericoronarite, gengivite e periodontite, xerostomia, disfunção temporomandibular, edema, pós-operatório de tecido mole, bioestimulação óssea, entre outros. Contudo, para sucesso do tratamento clínico, a laserterapia é geralmente utilizada como coadjuvante, associada às terapias convencionais (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Os estudos com laser de baixa potência são relativamente recentes. Somente na década de 60, Javan, Bennett e Herriott, desenvolveram o primeiro laser de baixa potência, o laser de He-Ne. Em 1971, Endre Master, da Hungria, foi o primeiro a publicar a utilização do laser de baixa potência na bioestimulação tecidual. Era o início de uma nova modalidade terapêutica que logo se popularizou na Europa Oriental e União Soviética (BASFORD, 1989). Desde então, os benefícios do laser de baixa potência têm sido estudados em diferentes países, inclusive o Brasil. É consenso na literatura o benefício que os lasers de baixa potência promovem aos tecidos. O que se busca no momento é um consenso em relação aos parâmetros ideais de irradiação para cada patologia (MENEGUZZO, 2007).

Diversos estudos relatam os benefícios dos lasers de baixa potência em Implantodontia, promovendo aceleração da reparação óssea, formação de um osso mais vascularizado e de melhor qualidade, aumento da taxa de osseointegração, maior adesão celular à superfície do implante e proliferação de fibroblastos, redução do edema e da dor no pós-operatório, aceleração do processo de reparação do tecido mole (quando aplicado sobre as suturas) e melhora do quadro de parestesias, iatrogenias comuns durante o ato cirúrgico de instalação dos implantes dentais (DÖRTBUDAK; HAAS; MAILATH- POKORNY, 2002; JAKSE et al., 2007; KHADRA et al., 2004; KHADRA, 2005; KHADRA et al., 2005a; KHADRA et al., 2005b; KIM et al., 2007; LOPES et al., 2007).

Dörtbudak et al. (2002) analisaram os efeitos do laser vermelho de baixa potência em osteócitos e na reabsorção óssea após instalação de

implantes em macacos. Após instalação do implante, a região foi irradiada unilateralmente com laser com comprimento de onda de 690 nm, 100 mW de potência e 6 J de energia. Após cinco dias, o osso foi retirado em bloco e analisado histomorfologicamente. No grupo irradiado, a porcentagem de osteócitos viáveis foi de 41,7%, enquanto no grupo controle foi de apenas 34,4%, sendo significativamente menor ($P < 0,027$). A diferença da área reabsorvida, entretanto, não teve diferença estatística significativa entre os grupos.

Khadra et al. (2004) avaliaram a área de contato osso-implante após irradiação com laser infravermelho de baixa potência de AsGaAl (830 nm), 150 mW de potência, densidade de energia de 23 J/cm² em tíbias de coelhos. A laserterapia foi conduzida no pós-operatório imediato e durante 10 dias consecutivos. Os resultados mostraram que a porcentagem de cálcio e fósforo foi significativamente maior no grupo irradiado em relação ao controle ($P = 0,037$), sugerindo que o processo de maturação óssea foi mais rápido no osso irradiado. Os autores concluíram que a laserterapia tem efeito favorável na reparação tecidual e adesão celular em implantes dentais. Esses resultados foram novamente comprovados em estudos subsequentes (KHADRA, 2005; KHADRA et al., 2005a; KHADRA et al., 2005b).

Jakse et al. (2007) estudaram, em carneiros, a influência da terapia com laser de baixa potência na regeneração óssea e osseointegração de implantes dentais, após levantamento do seio maxilar. Doze animais foram submetidos à elevação bilateral do seio maxilar com enxerto da crista ilíaca. Os animais submeteram-se à eutanásia 16 semanas após o segundo estágio

cirúrgico. As regiões dos implantes foram irradiadas três vezes por semana unilateralmente quando do levantamento do seio e durante o segundo estágio cirúrgico com laser vermelho de baixa potência (680 nm, 75 mW, 3-4 J/cm²). Os autores concluíram que a regeneração óssea na região do seio, dentro dos parâmetros deste estudo, não teve benefício pela irradiação, entretanto, a laserterapia provavelmente teve um efeito positivo no processo de osseointegração dos implantes inseridos.

Lopes et al. (2007) analisaram, por espectroscopia Raman, a incorporação de cálcio-hidroxiapatita, qualidade e reparação óssea em implantes dentais após irradiação com laser (830nm) em coelhos. 14 animais receberam implantes na região da tíbia, sendo 8 irradiados (7 sessões com intervalo de 48h, 21,5 J/cm² por ponto, 10 mW, total de 86 J por sessão) e 6 no grupo controle. Os animais submeteram-se à eutanásia 15, 30 e 45 dias após a cirurgia. Os resultados mostraram diferença significativa na concentração de cálcio-hidroxiapatita entre os grupos em 30 e 45 após a cirurgia ($P < 0,001$). Os autores concluíram que a fotobiomodulação com laser infravermelho melhora a reparação óssea. Resultados semelhantes foram encontrados por Kim et al. (2007). Os autores observaram, em ratos, que a irradiação com laser de baixa potência após instalação de implantes dentais resultou em aumento da atividade metabólica do tecido ósseo e de osteócitos.

2.4 Terapia fotodinâmica

O laser de baixa potência, por si só, não tem a capacidade de descontaminação, como o laser de alta potência, conforme descrito anteriormente. Entretanto, a associação de um agente fotossensibilizador com uma fonte de luz, produz espécies reativas de oxigênio que, em altas concentrações, são tóxicas para bactérias, fungos e vírus (Figura 2.3). Esse processo é conhecido como terapia fotodinâmica ou PDT (do inglês, *Photodynamic Therapy*), possibilitando, então, descontaminação com os lasers de baixa potência (MAROTTI et al., 2008).

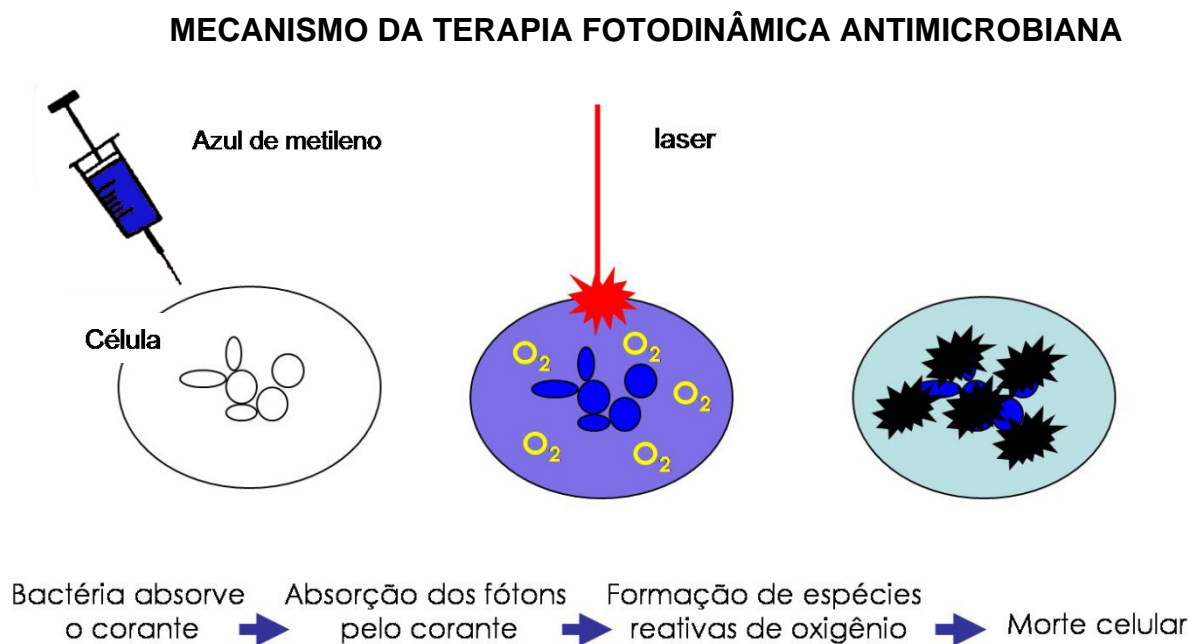


Figura 2.3 – Mecanismo da terapia fotodinâmica nas células bacterianas

A terapia fotodinâmica tem sido empregada nas diversas especialidades da Odontologia como a periodontia, endodontia e, mais recentemente, na implantodontia com o objetivo de redução bacteriana. Os resultados clínicos são bastante satisfatórios, sendo que o laser de baixa potência promove, através da PDT, uma redução bacteriana muito similar ao laser de alta potência, com a vantagem de não promover aumento da temperatura e a um custo reduzido (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004; ALMEIDA et al., 2006; MAROTTI et al., 2008).

A PDT é uma técnica que pode potencialmente atingir células prejudiciais sem afetar os tecidos normais do hospedeiro. Essa terapia foi inicialmente idealizada para o tratamento do câncer, baseada na observação de que algumas moléculas não tóxicas – os fotossensibilizadores, como os derivados das porfirinas, se acumulam principalmente nas células malignas e, quando uma luz (geralmente um laser) é aplicada nos tecidos contendo a droga, ela é ativada e os tecidos são rapidamente destruídos, precisamente onde a irradiação foi direcionada. A efetividade da terapia combina dois princípios: o acúmulo preferencial de fotossensibilizador nas células alvo e a irradiação precisa da luz, o que possibilita a ação seletiva e localizada da terapia fotodinâmica (ZANIN; BRUGNERA JR, 2007).

Há mais de 4 mil anos os egípcios deram início a essa terapia, através da ingestão de plantas contendo psoralenos e posterior exposição à luz solar a fim de tratar doenças, como o vitiligo. Entretanto, a PDT começou a ser empregada com sistemática científica em 1900, quando Oscar Raab

descreveu que a combinação do corante acridina e luz exerciam um efeito letal sobre paramécios, demonstrando que este organismo unicelular podia morrer sob essas condições. A primeira aplicação na medicina é atribuída a Tappeiner e Jesionek em 1903, que utilizaram a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para o tratamento de um câncer de pele. Desde então, vários estudos foram reportados na literatura, principalmente utilizando derivados de hematoporfirina como fotossensibilizador. Como resultado desses estudos, no final da década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama usando hematoporfirina D e irradiando seletivamente o tumor, marcando assim, o início da terapia fotodinâmica como terapia clínica para câncer (ACKROYD et al., 2001; RAAB, 1900).

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

redução bacteriana. Entretanto, esta morte celular não foi significativa na presença apenas do corante ou apenas do laser. Os autores sugeriram que o laser em baixa intensidade associado a um corante apropriado poderia ser efetivo como tratamento coadjuvante ao debridamento mecânico em inflamações periodontais (DOBSON; WILSON, 1992).

Após exposto à cavidade oral, é formado sobre a superfície do implante, muito parecido como ao elemento dental, uma película adquirida pelo contato com os biopolímeros presentes na saliva. Essa película adquirida forma a interface entre a superfície do implante e os primeiros microorganismos, como o *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*. Essas bactérias criam condições para a adesão de patógenos periodontais como o *Hamophilus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* ou *Tannerella forsythensis*, que podem induzir à periimplantite (HEUER et al., 2007).

Para que as bactérias causadoras da periimplantite sofram os efeitos da terapia fotodinâmica, é necessário que o agente fotossensibilizador seja absorvido. Estudos mostram que as bactérias Gram-positivas (G+) são mais susceptíveis à ação da PDT (MALIK et al., 1990; BERTOLONI et al., 1992). É possível, entretanto, atingir bactérias Gram-negativas (G-) também, porém muitas são resistentes (DOBSON; WILSON, 1992; MEISEL; KOCHER, 2005). Essa resistência pode ser explicada pela mudança na parede da célula ou por seleção de corantes específicos (NITZAN et al., 1992; MERCHAT et al., 1996).

Mais de 400 substâncias são conhecidas como fotossensibilizantes, incluindo corantes, drogas, cosméticos e compostos naturais. Os fotossensibilizadores mais utilizados na redução microbiana em Odontologia são: azul de metileno, verde de malaquita, azul de orto-toluidina, cristal violeta, fitalocianinas, hematoporfirinas e protoporfirina (MEISEL; KOCHER, 2005; ALMEIDA et al., 2006). Contudo, bactérias como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces odontoculus* não necessitam do uso adicional de corantes externos, pois são capazes de sintetizar a protoporfirina IX, um dos corantes mais utilizados na PDT. Assim, a simples irradiação com o laser com comprimento de onda na faixa do vermelho do espectro eletromagnético, produz a morte desses microorganismos e melhora a inflamação do tecido gengival (YAMADA JR et al., 2004).

Wainwright (1998), em uma revisão de literatura, citou os fotossensibilizadores disponíveis para utilização contra microorganismos patogênicos. O autor afirma que a PDT é uma técnica efetiva in vitro contra leveduras, vírus, parasitas e bactérias, inclusive cepas resistentes a drogas. Uma das dificuldades é que a técnica é limitada a infecções localizadas, pelo problema de entrega de luz. Com a resistência microbiana, a superinfecção pode ocorrer na microflora residente, e a PDT torna-se uma aliada contra os efeitos colaterais causados pela terapia antibiótica. Uma das vantagens da PDT é a capacidade de excitar o fotossensibilizador, com o mínimo efeito colateral sobre o tecido ao redor.

Com o intuito de avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de orto-toluidina sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, Usacheva, Teichert e Biel (2001) utilizaram os corantes em diversas concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 e 200 μM . Os autores utilizaram o laser de argônio 630nm e o laser de diodo 664nm, variando a fluência de 10 a 60 J/cm^2 , e a intensidade de 50 a 100 mW/cm^2 . Os resultados mostraram que todos os microorganismos foram eliminados em diferentes porcentagens. Entretanto, a fotossensibilização dependeu do corante utilizado, da sua concentração, fluência e densidade de potência do laser, bem como da bactéria envolvida.

Em um estudo recente (PRATES et al., 2007), foi observado a eficácia do verde de malaquita na PDT sobre a bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, presente no biofilme oral. Culturas desse microorganismo foram irradiadas com laser de diodo de baixa potência de 660nm com 30 mW de potência e os grupos foram expostos por 3 ou 5 minutos (5,4 J/cm^2 e 9 J/cm^2), na presença ou ausência do corante. Os resultados mostraram que o laser ou o corante sozinho, não são capazes de eliminar a bactéria e que ambas as fluências foram eficientes na PDT.

Em um estudo (DÖRTBUDAK et al., 2001) com 15 pacientes, foi demonstrado redução bacteriana (*P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans*) em diferentes superfícies de implantes com redução de 92% em média, sendo 97% para *P. gingivalis*, após 1 minuto de

irradiação durante a PDT com azul de orto-toluidina e laser de diodo de 690nm.

Yilmaz et al. (2002), em um estudo clínico, compararam a eficácia da PDT em relação ao tratamento convencional periodontal por raspagem e alisamento radicular. 10 pacientes foram divididos em quatro grupos, sendo G1 terapia convencional + PDT (685 nm, 30 mW, 1,6 J/cm² e azul de metileno a 0,05%); G2 apenas laser; G3 tratamento convencional e G4 apenas técnicas de higiene oral. Os autores concluíram que a PDT foi mais eficiente no tratamento da doença periodontal, quando aliada à técnica convencional.

Hayek et al. (2005) compararam os efeitos da PDT com a terapia convencional (raspagem e irrigação com clorexidina a 0,12%) na redução microbiana em periimplantite induzidas por ligadura em cães. Foi utilizado o laser de diodo de AsGaAl (660 nm), com potência de 49 mW, energia de 7,2 J por 3 minutos. Os autores concluíram que a PDT é um método não-invasivo, efetivo no tratamento da periimplantite comparado com a elevação mucoperiosteal para raspagem da superfície do implante. O uso do azuleno como fotossensibilizador mostrou-se efetivo contra os microorganismos periimplantares e não comprometeu a superfície do implante e nem dos tecidos ao redor.

Shibli et al. (2006) avaliaram o efeito da PDT na periimplantite induzida em cães sobre diferentes superfícies de implantes dentais. O grupo controle recebeu apenas o tratamento convencional, enquanto ao grupo teste foi

acrescida a PDT com laser de diodo AsGaAl 830 nm, 50 mW, 80 s, 4 J/cm² e azul de orto-toluidina 100 µg/mL. Concluiu-se que a PDT aliada à terapia convencional apresentou uma melhor re-osseointegração dos implantes nas áreas adjacentes ao defeito induzido da periimplantite, independente do tipo de superfície do implante, com a vantagem de não promover seleção de microorganismos resistentes e ser de fácil aplicação.

O azul de metileno a 0,01% foi utilizado em um estudo (CHAN; LAI, 2003) para avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica sobre as bactérias *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* e *S. sanguis*. Foram utilizados dois lasers; He-Ne (632 nm, 30 mW) e diodo de AsGaAl (665 e 830 nm, 100 mW). O laser de He-Ne foi utilizado por 30 e 60 segundos, com fluências de 3,2 J/cm² e 6,4 J/cm², enquanto o laser de diodo, no mesmo tempo, gerou fluências de 10,6 J/cm² e 21,2 J/cm². Os resultados mostraram que a terapia foi tempo-dependente para ambos os sistemas de laser. O laser de diodo de 830nm, entretanto, foi o mais efetivo com exposição por 60s e fluência de 21,2 J/cm², promovendo a redução de 99 a 100% das bactérias *P.gingivalis*, *P.intermedia* e *S. sanguis*. Já para as espécies de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*, o tratamento pela PDT promoveu redução de 95 e 96%, respectivamente.

O azul de metileno também foi utilizado por Gad et al. (2004) na PDT com laser de 665nm, 40J/cm², em colônias de *Staphylococcus epidermoides* e *S. aureus* com alterações na cápsula e na produção de exotoxinas. Os resultados obtidos indicaram alterações na morte celular em virtude da

produção de exotoxinas, que pode ser um obstáculo para a PDT e que corantes catiônicos podem superar o efeito negativo da presença de exotoxinas quando associados ao laser.

A PDT pode ser influenciada, entre outros fatores, pelo pH do meio, conteúdo de água, presença de exsudato, sangue, concentração e tempo de permanência do agente fotossensibilizador, comprimento de onda do laser, energia utilizada e tempo de exposição à luz laser (GARCIA; THEODORO; ALMEIDA, 2007). Nesse contexto, Matevski et al. (2003) observaram a influência de fatores como fluido gengival, sangue, saliva, entre outros, na terapia fotodinâmica. Foram analisadas culturas bacterianas de *P. gingivalis*, *Bacterioides forsythus*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* associadas ao sangue ou soro fisiológico, simulando o fluido gengival. Como fonte de luz foi utilizada o laser de He-Ne de 635nm e lâmpada de xenônio com filtro vermelho. O fotossensibilizador usado foi o azul de orto-toluidina nas concentrações de 12,5 e 50 µg/mL. Melhores resultados foram alcançados na concentração 12,5 µg/mL, com fluência de 10 J/cm² e intensidade de 100 mW/cm². Os autores concluíram que a presença de fluido gengival e sangue podem interferir tanto na ação da luz como no corante durante a PDT.

2.5 Azul de metileno

O azul de metileno (AM) é um composto aromático composto heterocíclico, sólido verde escuro, solúvel em água, produzindo solução azul, com fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S$ e massa molar 319,85 g/mol. É usado como um corante bacteriológico e indicador. Tem muitas aplicações nos mais variados campos da área biomédica. Em temperatura ambiente apresenta-se no estado sólido, inodoro, em formato de um pó verde-escuro que se torna uma solução azul quando dissolvido em água. É facilmente lavável, não manchando os tecidos orais nem componentes protéticos (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003).

Por ter absorção na faixa do vermelho do espectro eletromagnético, sendo a absorção máxima no comprimento de onda de 660 nm, o AM é muito efetivo na PDT, coincidindo com o comprimento de onda vermelho dos lasers comerciais em Odontologia, promovendo mínima toxicidade e efetiva ação antimicrobiana (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; TEICHERT et al., 2002).

O AM está dentro do grupo dos corantes fenotiazínicos, que possuem maior efetividade contra bactérias G+ que G-. Por ser um fotossensibilizador catiônico, a carga positiva do AM promove uma ligação eletrostática na superfície externa da célula alvo, causando um dano inicial à sua parede e

induzindo uma maior atividade fotodinâmica contra as bactérias (WAINWRIGHT, 1998; MEISEL; KOCHER, 2005; MIYAMOTO et al., 2007).

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

O solvente utilizado para o azul de metileno pode ser importante para a fotoquímica do corante. Os solventes geralmente utilizados são: água destilada, solução fisiológica (0,9% e 0,45%) e solução fisiológica tamponada com fosfato. Núñez et al. (2007) avaliaram a função do solvente utilizado, concluindo que a redução microbiana foi significativamente maior quando a água destilada foi utilizada como solvente.

Usacheva, Teichert e Biel (2001) avaliaram a eficácia do AM e azul de orto-toluidina contra diferentes bactérias com ou sem irradiação. A concentração do corante variou de 1 a 200 μM usando 45% de solução fisiológica como solvente. A irradiação foi com dois comprimentos de onda diferentes; 630 e 664 nm. O estudo demonstrou que ambos os corantes foram efetivos contra bactérias G⁺ e G⁻ dentro dos parâmetros utilizados. O *Staphylococcus aureus* foi o microorganismo mais resistente a terapia.

Quando os corantes foram utilizados em altas concentrações por um longo período de tempo sem luz (200 a 230 μM por 1 hora), os autores observaram efeito bactericida contra G^+ e G^- . Os autores afirmam que por serem corantes hidrofílicos, podem passar através dos canais de proteína que são preenchidos por água, presentes na membrana externa das bactérias. Quanto maior essa habilidade de o fotossensibilizador difundir-se através da membrana, maior será o grau de destruição bacteriana. E quanto maior a concentração e a permanência do fotossensibilizador, maior seu efeito bactericida sem a aplicação da luz.

Wilson, Dobson e Sarkar (1993) avaliaram a ação da terapia fotodinâmica em bactérias patogênicas variando o fotossensibilizador e microrganismos. Um dos fotossensibilizadores foi o AM com concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, que é geralmente utilizada. Na ausência de luz, e nesta concentração, não causou redução estatisticamente significativa em nenhuma das bactérias testadas (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), porém com a irradiação com laser de He-Ne, houve diferença significativa na redução dos microrganismos.

Chan e Lai (2003) avaliaram o efeito do azul de metileno a 0,01% na PDT utilizando dois tipos de laser (He-Ne e AsGaAl, 100 mW) em diferentes bactérias. O laser de He-Ne foi utilizado no comprimento de onda de 632 nm, por 30 s, com fluência de 3,2 J/cm². Já o laser de AsGaAl foi utilizado por 30 e 60 s no vermelho (665 nm, 10,6 e 20,2 J/cm², respectivamente), e 60 s no

infravermelho (830 nm, 20,2 J/cm²). Os autores analisaram também a ação somente do laser ou somente do corante sobre as bactérias para avaliar a real efetividade da PDT, bem como o aumento de temperatura durante a irradiação. A PDT com laser de He-Ne promoveu redução das bactérias de 55 a 81%. O laser AsGaAl no infravermelho teve o pior resultado, com redução de apenas 40 a 55%. Os melhores resultados foram obtidos com o laser de AsGaAl no vermelho, sendo a redução de 71 a 88% em 30 s, e 99 a 100% no tempo de 60s, sendo que *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *S. sanguis* tiveram redução de 99 a 100%, enquanto *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*, de 95 e 96%, respectivamente. Os autores relataram que somente o corante ou a luz, não tiveram nenhum efeito sobre a redução bacteriana e que o corante não converteu a energia da irradiação em calor, comprovando a baixa toxicidade e confiabilidade da técnica.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi analisar a descontaminação bacteriana na superfície de implantes dentários por meio da terapia fotodinâmica, utilizando dois tempos diferentes de irradiação, a fim de estabelecer um protocolo mais apropriado e criar subsídios para um posterior estudo *in vivo*. Pretendeu-se observar a eficácia da terapia fotodinâmica em relação ao método tradicionalmente utilizado (gluconato de clorexidina a 0,12%) e se há influência da associação ou não do corante com a irradiação a laser na descontaminação bacteriana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP sob o protocolo nº 68/2008, FR 184633 (anexo A). Foram utilizados implantes com tratamento de superfície por anodização (TiUnite – Nobel, 12 x 4 mm), n=60, que foram divididos igualmente em 4 grupos e 2 subgrupos, sendo 10 implantes para cada (Tabela 4.1). G1 e G2 são os grupos controle. Em G1 não teve descontaminação (controle negativo), enquanto em G2 (controle positivo) realizou-se a descontaminação através do método tradicionalmente utilizado com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard – Colgate). G3 é o grupo que houve a descontaminação por meio da PDT (corante + laser). G4 é o grupo onde se utilizou a irradiação com o laser, porém sem a aplicação do corante, para melhor avaliarmos a efetiva ação da PDT pelo uso do corante. Os grupos G3 e G4 foram subdivididos em dois, sendo que em G3a e G4a houve irradiação por 3 minutos, enquanto G3b e G4b por 5 minutos.

Tabela 4.1 – Distribuição dos grupos experimentais e controles

Grupos	Método de descontaminação	
G1 (controle negativo)	não se aplica (n=10)	
G2 (controle positivo)	Clorexidina a 0,12% (n=10)	
G3 (PDT – laser+corante)	a) Laser 3 min (n=10)	b) Laser 5 min (n=10)
G4 (sem corante, com laser)	a) Laser 3 min (n=10)	b) Laser 5 min (n=10)

4.2 Contaminação

Para melhor manipulação dos implantes, estes foram posicionados em uma placa, previamente colorida com esmalte preto (Risqué – Niasi), visando reproduzir a absorção da luz que ocorre no ambiente oral (Figura 4.3). Como havia 30 implantes disponíveis, o experimento teve uma repetição, no dia seguinte, após limpeza e esterilização dos implantes.

Para a contaminação dos implantes (G2 a G4) coletou-se saliva de um paciente, previamente diagnosticado com periimplantite em quatro elementos dentais. A coleta foi realizada no laboratório de microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB – USP). O modelo do Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se no apêndice A. Realizou-se previamente, em um estudo piloto, uma análise inicial da saliva a fim de observar número total de bactérias presentes por mL de saliva e para determinação das diluições a serem realizadas no estudo de cada grupo. Durante todo o experimento, a saliva do paciente ficou acondicionada em copo plástico envolto por gelo, a fim de retardar a morte das bactérias. Em um estudo piloto, observamos que não houve morte significativa das bactérias, nas mesmas condições, por um período de 6 horas, superior ao tempo total do experimento.

Para a análise, realizaram-se diluições seriadas da saliva, e alíquotas de 100 μ L, de cada diluição, em água peptonada (apêndice B), foram semeadas na superfície de placas de Petri contendo ágar Brucella, acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (apêndice C), hemina e menadione (apêndice D). Previamente à obtenção das alíquotas, frascos contendo a saliva diluída, foram agitados por 10 s, com exceção do primeiro, contendo o implante, que foi agitado por 30 s. Toda a manipulação dos materiais da pesquisa para diluição e semeadura, foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70% e radiação UV por 5 minutos, objetivando a menor contaminação possível dos materiais manipulados.

4.3 Descontaminação

Realizou-se a irrigação com solução de clorexidina (G2) ou com o corante (G3). O corante utilizado foi o azul de metileno (Chimiolux – Hypofarma, Belo Horizonte – MG, Brasil) com concentração de 0,01% (m/V). O corante foi aplicado somente no grupo G3 e após período de espera de 5 minutos, realizada a irradiação com o laser. Os implantes ficaram embebidos no corante nos casulos da placa pré-fabricada.

A irradiação foi realizada com o laser de diodo de baixa potência Twin Laser Flex (MM Optics – São Carlos, Brasil) como meio ativo semiconductor AsGaAl, classe 3B: IEC 60825-1 International Standard, alimentação: 95~240 V / 50-60 Hz, registro na ANVISA/MS nº 80051420008, certificado INMETRO nº NCC 2756/05, com comprimento de onda de 660 nm, estando, portanto, na faixa do vermelho do espectro eletromagnético (Figura 4.1).



Figura 4.1 – Laser Twin Flex (MM Optics), contendo duas ponteiros laser (vermelho e infravermelho) e uma ponteira LED

A caneta do laser foi envolta por filme PVC para biossegurança. A potência no visor foi de 40 mW, mas com o acoplamento da fibra óptica de PDT, houve perda de 25%, sendo que a potência de saída na ponta da fibra foi de 30 mW (previamente à irradiação, a potência foi aferida com o medidor de potência - Power Meter 841-PE, Newport Corporation - USA). A fibra óptica de PDT (MM Optics), por ser muito flexível, foi cortada perpendicularmente em um terço com lâmina de bisturi nº12 para que houvesse melhor controle durante a irradiação (Figura 4.2).



Figura 4.2 – Devido à alta flexibilidade da fibra óptica da PDT (A), seu comprimento foi reduzido em um terço com corte perpendicular por lâmina de bisturi (B). Na Figura C, observa-se a fibra de PDT após o corte

O tempo de irradiação foi de 3 ou 5 minutos, de acordo com os subgrupos, sendo que a energia total liberada para o tempo de 3 min foi de 5,4 J, e para 5 min, 9 J. A fibra óptica de 0,3 mm foi desenvolvida especialmente para a utilização em PDT. A irradiação em toda a superfície externa exposta do implante foi realizada com movimentos de cima para baixo e vice-versa até atingir o tempo proposto, estando o pesquisador previamente calibrado (Figura 4.3). Todas as pessoas presentes no ambiente

durante o uso do laser utilizaram obrigatoriamente óculos de proteção apropriados (fornecido pelo próprio fabricante) para evitar danos à retina.

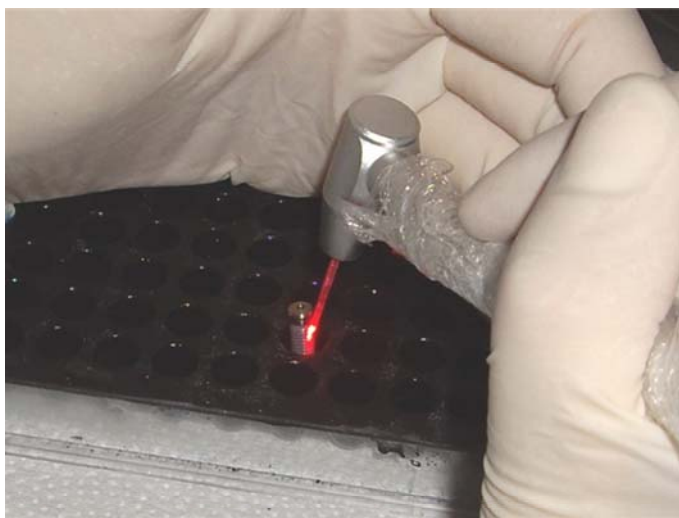


Figura 4.3 – Irradiação na superfície do implante posicionado em placa pré-fabricada colorida de preto

Neste estudo não se aplica utilizar densidade de energia (J/cm^2), pois o laser esteve em movimento durante a irradiação, pela técnica de varredura. Iremos, portanto, informar a quantidade total de energia (J) distribuída para o implante.

Após descontaminação com PDT ou solução de clorexidina, os implantes foram irrigados com duas seringas, de 3 mL cada, de soro fisiológico estéril, a fim de que resquícios da substância química não fossem

transportados para o meio de cultura, o que poderia prejudicar o crescimento das colônias, principalmente no caso da clorexidina.

Após secagem completa das gotas semeadas, as placas foram colocadas em jarras fechadas e mantidas em estufa à 37°C por sete dias em atmosfera de anaerobiose. Após este período, as jarras foram abertas e avaliou-se, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Bausch & Lomb), em aumento de 10x, o número total de colônias na superfície do ágar (Figura 4.4).

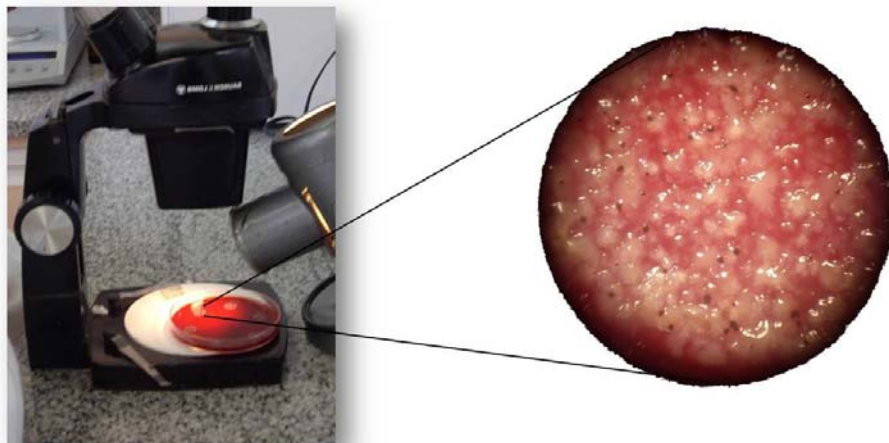


Figura 4.4 – Determinação das diluições em contagem de UFCs no estudo piloto. Aumento de 10x em microscópio estereoscópico

4.4 Análise da descontaminação

A análise quantitativa da descontaminação bacteriana foi realizada por meio de semeadura da saliva em meio de cultura e contagem de UFCs no ICB – USP (Instituto de Ciências Biomédicas da USP), sob a supervisão da Profa. Dra. Silvana Cai.

Após descontaminação dos diferentes grupos, os implantes foram colocados em tubos de microcentrifuga, previamente esterilizados, contendo água peptonada e agitados por 30 s, visando o desprendimento das bactérias. Diluições seriadas foram então realizadas e alíquotas de 20 µL, semeadas em ágar Brucella, pela técnica da gota. Para cada diluição, semearam-se três gotas. As diluições para cada grupo estão descritas na Tabela 4.2. As placas foram incubadas para posterior contagem das UFCs, de acordo com método descrito anteriormente.

Tabela 4.2 – Diluições realizadas para cada grupo. Em negrito, destaca-se a diluição que foi utilizada para análise estatística

Grupos	G1	G2	G3a	G3b	G4a	G4b
Diluições	10⁻⁴	zero	zero	zero	10⁻¹	10⁻¹
	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²
			10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³

O número de bactérias por mL foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Nº bactérias por mL} = \text{média nº de colônias nas 3 diluições} \times 1/\text{diluição} \times 50$$

5 RESULTADOS

Dos 10 implantes avaliados em cada grupo, coletou-se três amostras (três gotas) para a solução diluída de cada implante.

Inicialmente foram calculadas as estatísticas descritivas, ou seja, média, desvio padrão, valor mínimo, máximo e mediana dos dados coletados de cada uma das coletas realizadas para cada grupo.

Depois, as três coletas foram reunidas e resumidas através da média aritmética, e novamente calculadas as estatísticas resumo de cada grupo. Com esses dados, um gráfico de boxplot¹ foi construído para se ter uma idéia visual da distribuição dos dados.

Antes da comparação entre os grupos, os dados foram testados quanto à sua distribuição, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Esse teste mede se é possível estabelecer a distribuição normal, e então aplicar testes paramétricos (como ANOVA). No caso de rejeição da suposição de normalidade, um teste não paramétrico (Kruskal-Wallis) deverá ser aplicado para comparar os grupos.

Se o teste de comparação entre os grupos indicar significância estatística, uma segunda análise será necessária para verificar exatamente quais grupos são diferentes entre si. No caso das comparações múltiplas, é importante observar que o nível de significância do teste (α) deverá ser

¹veja no apêndice E, um exemplo com a interpretação de um gráfico de boxplot.

ajustado conforme o total de comparações a ser realizado, de forma que seja mantido o mesmo nível de significância global, em cada uma das comparações. Esse cálculo é realizado da seguinte forma:

$$\alpha_{individual} = 1 - \left(n^{\circ} \text{ de comparações} \sqrt[10]{1 - \alpha_{global}} \right)$$

No caso de 10 comparações múltiplas, e considerando ainda o nível de significância global como sendo de 5%, então cada comparação de dois grupos deverá ser feita a um nível de 0,005 (e não 0,05).

$$\alpha_{individual} = 1 - \left(\sqrt[10]{1 - 0,05} \right) = 0,005$$

As comparações de dois grupos entre si poderão ser realizadas pelo teste de Mann-Whitney, com a utilização do nível de significância individual, tal como calculado acima.

Todas as análises foram realizadas com a utilização do *software* estatístico Minitab, versão 15.0, e conforme explicado acima, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($\alpha=0,05$), para as comparações globais (todos os grupos), ou 0,5% ($\alpha=0,005$) nas comparações individuais de dois grupos entre si.

A tabela 5.1 mostra o resumo dos dados coletados, para cada uma das três coletas realizadas de cada implante.

Tabela 5.1 - Medidas resumo do número de bactérias ($\times 10^3$) por mL, por grupo, por coleta (gota)

grupo	coleta	N	média	d.p.	mínimo	mediana	máximo
G1	1 ^a	10	850	784	0	500	2500
	2 ^a	10	450	497	0	500	1500
	3 ^a	10	150	337	0	0	1000
G2	1 ^a	10	0,595	1,016	0	0,150	2,750
	2 ^a	10	0,645	1,178	0	0,125	3,200
	3 ^a	10	0,625	1,019	0	0,175	2,750
G3a	1 ^a	10	1,835	1,357	0,050	1,700	3,650
	2 ^a	10	1,925	1,515	0,150	1,500	4,650
	3 ^a	10	1,555	1,185	0,300	1,300	4,000
G3b	1 ^a	10	0,520	0,919	0,050	0,125	3,000
	2 ^a	10	0,620	0,969	0	0,225	3,050
	3 ^a	10	0,670	1,116	0	0,225	3,500
G4a	1 ^a	10	9,900	8,000	2,000	5,500	23,500
	2 ^a	10	11,700	7,210	4,000	9,000	25,000
	3 ^a	10	13,050	8,830	3,000	11,250	31,000
G4b	1 ^a	10	11,600	11,860	1,000	9,750	42,500
	2 ^a	10	11,650	9,390	2,000	11,500	35,000
	3 ^a	10	13,100	11,210	0,500	10,750	40,500

N = número de implantes avaliados por grupo; d.p. = desvio padrão

Uma vez que foram realizadas três coletas por implante, a tabela 5.2 mostra o resumo dessas medidas, obtidas pela média aritmética das três coletas.

Tabela 5.2 - Medidas resumo do número de bactérias ($\times 10^3$) por mL, por grupo

grupo	N	média	d.p.	mínimo	mediana	máximo
G1	10	483	448	0	333	1167
G2	10	0,622	1,070	0,000	0,158	2,900
G3a	10	1,772	1,310	0,167	1,500	3,633
G3b	10	0,603	0,995	0,017	0,225	3,183
G4a	10	11,550	7,750	4,000	9,170	25,830
G4b	10	10,590	10,590	1,170	10,580	39,330

N = número de implantes avaliados por grupo; d.p. = desvio padrão

Os dados acima foram inseridos num gráfico do tipo boxplot (Gráfico 5.1), onde é possível verificar claramente a grande diferença do número de bactérias encontradas nos implantes do grupo G1, em relação aos demais.

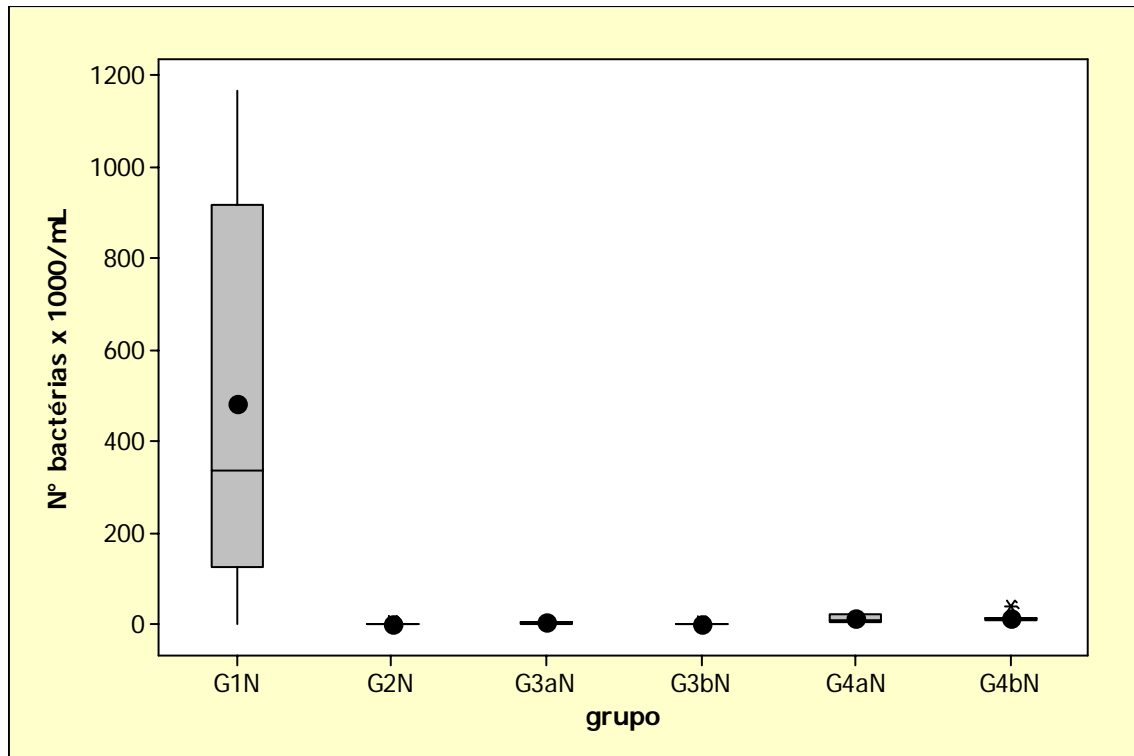


Gráfico 5.1 - Gráfico de boxplot: Nº de bactérias ($\times 10^3$) / mL, por grupo (todos os grupos)

O gráfico 5.2 mostra os demais grupos em que os implantes passaram por algum processo de descontaminação (G2, G3a, G3b, G4a, G4b), ou seja, é o mesmo gráfico que o anterior, apenas retirando os implantes do grupo G1, e aumentando a escala do eixo Y para que se possa observar melhor como se distribuem esses dados.

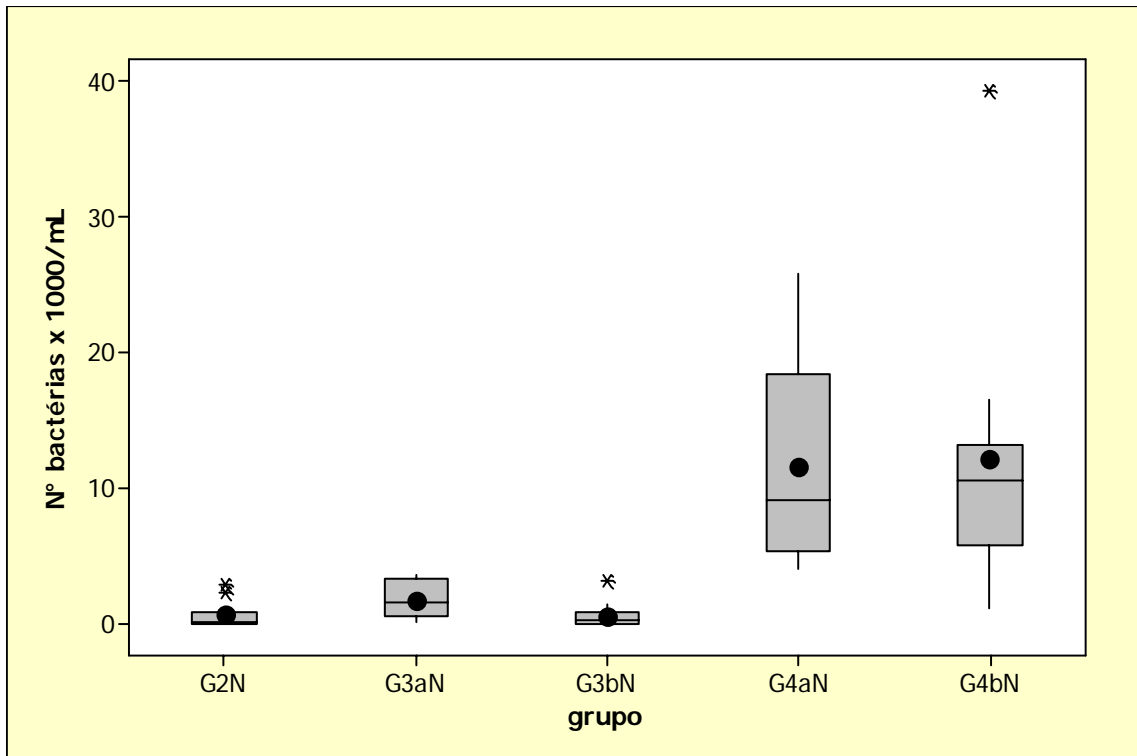


Gráfico 5.2 - Gráfico de boxplot: N° de bactérias ($\times 10^3$) / mL, por grupo (exceto G1)

Mesmo com a exclusão do grupo G1, que é naturalmente diferente dos demais em termos de variabilidade, os outros grupos não parecem ter uma distribuição normal dos dados (verificado estatisticamente pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,010$). Dessa forma, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que dispensa a suposição de normalidade dos dados.

Aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis, verifica-se significância estatística ($p < 0,001$), indicando que de fato existe diferença significativa entre os grupos G2, G3a, G3b, G4a e G4b.

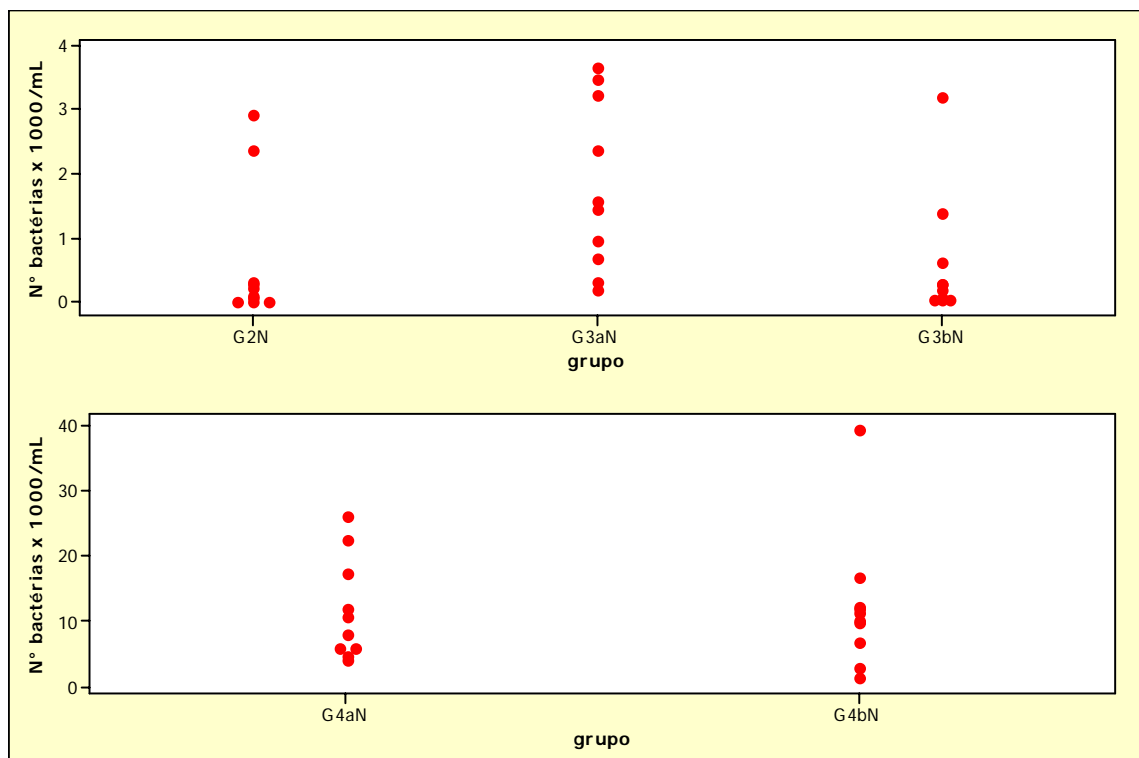
Para saber exatamente qual grupo difere de qual, utilizou-se o teste de Mann-Whitney, para a comparação entre dois grupos entre si. A tabela 5.3 mostra o resultado do teste de Mann-Whitney, para cada uma dessas comparações entre dois grupos.

Tabela 5.3 - Nível descritivo do teste de Mann-Whitney (p-valor), para a comparação entre dois grupos

	G2	G3a	G3b	G4a	G4b
G2	-	0,154	0,649	<0,001	<0,001
G3a	0,154	-	0,011	<0,001	0,002
G3b	0,649	0,011	-	<0,001	<0,001
G4a	<0,001	<0,001	<0,001	-	0,999
G4b	<0,001	0,002	<0,001	0,999	-

Conforme descrito na metodologia estatística, com o nível de significância ajustado em $\alpha=0,005$ para todas as comparações múltiplas, conclui-se que os grupos G2, G3a e G3b apresentaram nível de contaminação menor do que nos grupos G4a e G4b, não havendo diferença significativa entre G2, G3a e G3b, bem como também não houve diferença significativa entre os grupos G4a e G4b.

O gráfico 5.3 mostra todas as medidas obtidas, indicando a semelhança entre os grupos G2, G3a e G3b, bem como entre os grupos G4a e G4b.



6 DISCUSSÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, assim como o laser, foram introduzidos recentemente na Odontologia. Já é consenso na literatura o benefício do laser e da PDT nas diversas especialidades. O que se busca atualmente é um protocolo ideal de trabalho para obter-se o máximo de benefício. O estudo da ação da PDT como tratamento coadjuvante da periimplantite é ainda mais recente, mas alguns autores relatam o sucesso dessa terapia (DÖRTBUDAK et al., 2001; HAYEK et al., 2005; SHIBLI et al., 2006; YILMAZ et al., 2002). A descoberta da osseointegração por Branemark em 1965 foi um advento de extrema importância para a reabilitação oral protética estética e, principalmente, funcional. Cada vez mais pacientes são reabilitados com implantes dentários e, conseqüentemente, mais casos de sucesso e insucesso surgem com o passar dos anos. Assim, a periimplantite torna-se um problema cada vez mais freqüente nas clínicas odontológicas (JEPSEN et al., 1996).

Diversas são as terapias propostas na literatura visando a descontaminação da superfície de implantes, porém ainda não satisfatórias. A PDT surge como mais uma opção para a redução bacteriana, entretanto, não há ainda um protocolo ideal. Baseado nessa dúvida, esse estudo teve como objetivo avaliar apenas alguns parâmetros dessa complexa terapia.

Os resultados obtidos foram condizentes com o que era esperado, baseado em estudos anteriores da literatura (CHAN; LAI, 2003; DÖRTBUDAK et al., 2001; DOBSON; WILSON, 1992; GAD et al., 2004; HAYEK et al., 2005; SHIBLI et al., 2006; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; WAINWRIGHT, 1998; WILSON; DOBSON; SARKAR, 1993; YAMADA JR et al., 2004; YILMAZ et al., 2002). Uma vez que o grupo G1 refere-se ao controle negativo, onde nenhuma técnica de descontaminação foi utilizada, era esperado observar essa grande diferença do número de bactérias encontradas, em relação aos outros grupos. Também era esperado encontrar maior número de bactérias para os grupos G4a e G4b, em relação ao grupo clorexidina (G2) e PDT (G3a e G3b), como de fato ocorreu, mas a diferença entre G4 e G1 foi muito grande, provavelmente pelo fato do maior tempo entre a contaminação e a cultura bacteriana, devido ao tempo de irradiação com o laser.

Uma possível redução do número de bactérias de G4, em relação a G1, é a absorção da luz por bactérias pigmentadas que, por possuírem cromóforos endógenos, dispensam a utilização de um agente fotossensibilizador adicional, ocorrendo também os efeitos da terapia fotodinâmica. Segundo König et al. (2000), bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinomyces odontolyticus* são capazes de sintetizar a protoporfirina e protohematoporfirina, um dos corantes mais utilizados na terapia fotodinâmica, não necessitando do uso adicional de fotossensibilizadores externos. Assim, a simples irradiação com laser de emissão vermelha produz a morte bacteriana desses microorganismos.

Ao comparar os grupos G4 com G3, observa-se que a utilização do corante foi importante para uma maior redução bacteriana, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Esse resultado comprova a real efetividade da associação do corante com a fonte de luz laser, pois estes grupos tiveram a mesma diferença de tempo entre a contaminação e a cultura bacteriana, o que não aconteceu em G1 e G2, por serem metodologias mais rápidas de trabalho.

Não houve diferença significativa entre G4a e G4b, assim, o tempo de irradiação, sem a presença do corante, não interferiu na redução bacteriana, o que já não aconteceu ao compararmos G3a e G3b. Apesar da diferença entre G3a e G3b não ser significativa, observa-se uma tendência do grupo G3b (PDT com irradiação por 5 minutos) ser melhor que G3a (PDT com irradiação por 3 minutos). Para um mesmo tempo das bactérias em contato com o corante azul de metileno, um tempo maior de irradiação teve melhor resultado. Durante a irradiação, foi realizado movimentos de cima para baixo em toda a extensão do implante. A velocidade da irradiação foi previamente calibrada pelo operador, entretanto, o fato da luz permanecer por um período maior na superfície do implante (G3b), facilita a formação de mais espécies reativas de oxigênio, promovendo maior redução bacteriana. Seria interessante, em um próximo estudo, avaliar a redução bacteriana variando o tempo de contato com o corante azul de metileno, para um mesmo tempo de irradiação. Um maior tempo de contato com o agente fotossensibilizador poderia permitir que

mais bactérias fossem atingidas, principalmente as Gram-negativas, que são mais resistentes à passagem do corante devido à presença de uma membrana externa.

Os resultados deste trabalho complementam a teoria da efetividade da associação laser + corante com estudos prévios (CHAI; LAI, 2003; DOBSON; WILSON, 1992; PRATES et al., 2007) ao comparar-se G3 e G4. Enquanto observou-se neste experimento que somente a irradiação laser foi significativamente menos efetiva que a terapia fotodinâmica, Chai e Lai (2003) comprovaram que somente a irradiação laser ou somente a aplicação do corante azul de metileno a 0,01% não tiveram toxicidade contra bactérias. Os autores afirmaram também que o corante não converteu a energia do laser em calor, comprovando que a irradiação com laser de baixa potência não provoca aumento da temperatura e que a descontaminação não foi devido a um possível aumento excessivo da temperatura intracelular. Dobson e Wilson (1992) e Prates et al. (2007) também afirmaram que a morte celular não foi significativa na presença apenas do corante ou apenas do laser.

Yamada Jr et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes, em cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* coradas com azul de metileno, após irradiação com laser com emissão vermelha após 3 ou 5 minutos, não havendo também diferença estatística significativa entre os tempos de irradiação. Os autores ressaltam, entretanto, que resultados diferentes podem ser encontrados *in vivo*, devido à presença de sangue,

fluido gengival, etc., podendo influenciar na fotossensibilização das bactérias. Kömerik e Wilson (2002) também relataram em um estudo, utilizando azul de orto-toluidina em bactérias G-, que a presença de sangue e saliva oferece proteção às bactérias contra a terapia fotodinâmica.

Os melhores resultados foram obtidos nos grupos G2 e G3 (clorexidina e PDT, respectivamente), sendo estatisticamente diferentes em relação à G1 e G4 ($p < 0,001$), entretanto não houve diferença estatística significativa entre G2 e G3. Resultados muito semelhantes foram observados entre G2 e G3b (PDT 5 minutos). Sabe-se que a clorexidina tem a capacidade de ser liberada gradualmente, podendo agir em um período de até 24 horas *in vivo*. Mesmo irrigando os implantes abundantemente com soro fisiológico após descontaminação com clorexidina, resquícios da substância química podem ter permanecido na superfície dos implantes e, conseqüentemente, serem transportados para o meio de cultura, continuando a agir sobre as bactérias.

Alguns autores relatam diferenças nos resultados de análise microbiana quando da utilização da clorexidina, principalmente em função da metodologia de avaliação e da difusão da clorexidina no Agar (ESTRELA et al., 2001; ESTRELA et al., 2003; SEGUNDO et al., 2007). Considerando essa hipótese ou não, o fato de G3 ser estatisticamente igual a G2, permite considerar que a terapia fotodinâmica ainda assim seria um método de descontaminação da superfície de implantes melhor indicado que a irrigação com solução de clorexidina, pois não causa resistência bacteriana

e ainda há o benefício da irradiação laser. A luz que não foi absorvida pelas bactérias, pode ser espalhada e absorvida por cromóforos do tecido periimplantar adjacente, promovendo a biomodulação dos tecidos (efeito analgésico, modulação da inflamação, aceleração do processo de reparação do tecido gengival e ósseo, etc.). Foi pensando nessa perda de energia durante a irradiação que se tomou o cuidado neste estudo de utilizar uma placa de cor preta, na tentativa de simular o tecido gengival ao redor do implante, que poderia absorver parte dos fótons emitidos pela fonte luminosa.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a terapia fotodinâmica pode ser considerada um método eficaz para redução bacteriana em superfícies de implantes e que somente a irradiação laser, sem a associação do corante, foi menos eficiente ($p < 0,001$) que a PDT. A terapia fotodinâmica deve ser considerada, entretanto, como um coadjuvante no tratamento da periimplantite e associada aos tratamentos mecânicos (raspagem) e cirúrgicos (enxertos) na tentativa de controle da doença periimplantar.

Mais estudos devem ser realizados testando não somente os parâmetros de irradiação laser, como o agente fotossensibilizador, tempo de permanência, modo de aplicação (solução, pasta, etc.), concentração, entre outros, para que um protocolo ideal de utilização da terapia fotodinâmica para a periimplantite seja alcançado.

7 CONCLUSÕES

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

- O grupo G1 foi o que apresentou o maior número de bactérias, superior a todos os demais grupos;
- Os grupos G2, G3a e G3b apresentaram menos bactérias (estatisticamente significante) do que nos grupos G4a e G4b;
- Os grupos G4a e G4b não apresentaram diferenças significantes estatisticamente entre si;
- Os melhores resultados foram obtidos nos grupos G2, G3a e G3b, que não apresentaram diferenças significantes entre si. Ainda assim, a utilização da terapia fotodinâmica seria mais bem indicada que a irrigação com clorexidina para descontaminação da superfície dos implantes dentários por não promover resistência bacteriana a longo prazo, além dos benefícios da irradiação com o laser de baixa potência para os tecidos periimplantares.

REFERÊNCIAS²

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001;74(5):656-69.

Albrektsson T, Sennerby L. Re: A comparison of endosseous dental implant surfaces. *Cochran DL* (1999;70:1523-39). *J Periodontol* 2000;71(6):1054-5;author reply 5-6.

Almeida JM, Garcia VG, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Macarini VM. Terapia fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. *Arq Odontol* 2006;42(3):199-210.

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

Azzeh MM. Er,Cr:YSGG laser-assisted surgical treatment of peri-implantitis with 1-year reentry and 18-month follow-up. *J Periodontol* 2008;79(10):2000-5.

Basford JR. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. *Lasers Surg Med* 1989;9(1):1-5.

Berardi D, Colagiovanni M, Scoccia A, Raffaelli L, Manicone PF, Perfetti G. Evaluation of a new laser surface implant: scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray and X-ray photoelectron spectroscopy analyses. *J Biol Regul Homeost Agents* 2008;22(3):161-8.

Bereznai M, Pelsoczi I, Toth Z, Turzo K, Radnai M, Bor Z, et al. Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material. *Biomaterials* 2003;24(23):4197-203.

² De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

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

Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in Implant Dent reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* 2002;29 Suppl 3:197-212;discussion 32-3.

Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, van Lier JE. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios* 1992;71(286):33-46.

Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res* 1994;100:43-6.

Braga FJC, Marques RFC, Filho EA, Guastaldi AC. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO4 laser irradiation. *Appl Surface Sci* 2007;253(23):9203-8.

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

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

Buchter A, Meyer U, Kruse-Losler B, Joos U, Kleinheinz J. Sustained release of doxycycline for the treatment of peri-implantitis: randomised controlled trial. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004;42(5):439-44.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991;25(7):889-902.

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

Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. In press 2008. Oct 30.

Davis DM. The shift in the therapeutic paradigm: osseointegration. *J Prosthet Dent* 1998;79(1):37-42.

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

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

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

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

Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23(2):327-34.

Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85(4):255-65.

Emrani J, Chee W, Slots J. Bacterial Colonization of Oral Implants from Nondental Sources. *Clin Implant Dent Relat Res*. In press 2008. Jul 23.

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

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 1998;106(1):527-51.

Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pecora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 2001;34(5):341-5.

Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14(1):58-62.

Francio LSA, Storrer CLM, Deliberador TM, Sousa AC, Pizzatto E, Lopes TR. Tratamento da periimplantite: revisão da literatura. *Rev Sul-bras Odontol* 2008;5(2):76-81.

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

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

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

Garcia VG, Theodoro LH, Almeida JM. Considerações atuais dos lasers no tratamento periodontal. *Rev PerioNews* 2007;1(1):52-8.

George K, Zafiropoulos GG, Murat Y, Hubertus S, Nisengard RJ. Clinical and microbiological status of osseointegrated implants. *J Periodontol* 1994;65(8):766-70.

Groessner-Schreiber B, Hannig M, Duck A, Griepentrog M, Wenderoth DF. Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? *Eur J Oral Sci* 2004;112(6):516-22.

Gross AJ, Herrmann TR. History of lasers. *World J Urol* 2007;25(3):217-20.

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

Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, et al. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(6):543-51.

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

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

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

Heinrich A, Dengler K, Koerner T, Haczek C, Deppe H, Stritzker B. Laser-modified titanium implants for improved cell adhesion. *Lasers Med Sci* 2008;23(1):55-8.

Heitz-Mayfield LJ. Diagnosis and management of peri-implant diseases. *Aust Dent J* 2008;53 Suppl 1:S43-8.

Henry PJ. Tooth loss and implant replacement. *Aust Dent J* 2000;45(3):150-72.

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

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

Jepsen S, Ruhling A, Jepsen K, Ohlenbusch B, Albers HK. Progressive peri-implantitis. Incidence and prediction of peri-implant attachment loss. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(2):133-42.

Johansson C, Lausmaa J, Ask M, Hansson HA, Albrektsson T. Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti 6Al 4V or commercially pure titanium. *J Biomed Eng* 1989;11(1):3-8.

Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B, Karring T. Treatment of peri-implantitis by the Vector system. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(3):288-93.

Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B* 1989a;3(4):638-40.

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

Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mater Res* 1988;22(A2 Suppl):145-58.

Kato T, Kusakari H, Hoshino E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. *Lasers Surg Med* 1998;23(5):299-309.

Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 2003;12(2):175-81.

Keller W, Bragger U, Mombelli A. Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(4):209-17.

Khadra M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. *Swed Dent J Suppl* 2005 (172):1-63.

Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J Biomed Mater Res A* 2005a;73(1):55-62.

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

Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(3):325-32.

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

Kim YH, Koak JY, Chang IT, Wennerberg A, Heo SJ. A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(3):349-56.

Klinge B, Gustafsson A, Berglundh T. A systematic review of the effect of anti-infective therapy in the treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol* 2002;29 Suppl 3:213-25;discussion 32-3.

Klokkevold PR, Newman MG. Current status of dental implants: a periodontal perspective. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(1):56-65.

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

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

Kotsovilis S, Karoussis IK, Trianti M, Fourmoussis I. Therapy of peri-implantitis: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008;35(7):621-9.

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

Kronstrom M, Svenson B, Hellman M, Persson GR. Early implant failures in patients treated with Branemark System titanium dental implants: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(2):201-7.

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

Lang NP, Berglundh T, Heitz-Mayfield LJ, Pjetursson BE, Salvi GE, Sanz M. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19 Suppl:150-4.

Lazzara RJ, Testori T, Trisi P, Porter SS, Weinstein RL. A human histologic analysis of osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999;19(2):117-29.

Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007; 23(7): 844-54.

Leonhardt A, Dahlen G, Renvert S. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *J Periodontol* 2003;74(10):1415-22.

Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(5):339-45.

Li D, Ferguson SJ, Beutler T, Cochran DL, Sittig C, Hirt HP et al. Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. *J Biomed Mater Res* 2002;60(2):325-32.

Lindhe J, Karring T, Lang N. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontol. *J Clin Periodontol* 2008;35(8 Suppl):282-5.

Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 1994;14(4):347-54.

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

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

Malik Z, Ladan H, Nitzan Y, Ehrenberg B. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B* 1990;6(4):419-30.

Maluf PSZ, Marotti J, Komatsu C, Arcangeli P. Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis. *ImplantNews* 2007;4(6):643-6.

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

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

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

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

Meffert RM, Langer B, Fritz ME. Dental implants: a review. *J Periodontol* 1992;63(11):859-70.

Meira KB, Argento LC, Campos A Jr. Caracterização de superfícies de titânio grau I, titânio grau II e Ti6Al4V submetidos a diferentes tratamentos térmicos. *Rev Fac Odontol Bauru* 2001;9(1/2):71-6.

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

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

Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B* 1996;32(3):153-7.

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985;5(1):31-9.

Misch CE. Contemporary Implant Dent. St. Louis: Mosby, 1993.

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

Mombelli A. Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. Curr Opin Periodontol 1997;4:127-36.

Mombelli A, Feloutzis A, Bragger U, Lang NP. Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline. Clinical, microbiological and radiological results. Clin Oral Implants Res 2001;12(4):287-94.

Mombelli A, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant infections. Clin Oral Implants Res 1992;3(4):162-8.

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

Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. Photochem Photobiol 1992;55(1):89-96.

Norowski PA, Jr., Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. In press 2008. Aug 12.

Núñez SC, Garcez AS, Junqueira H, Baptista MS, Ribeiro MS. Avaliação da função do solvente na eficiência fotodinâmica antimicrobiana do azul de metileno. FS-31-Terapia Fotodinâmica, 03-06 de junho de 2007, Resumos, p.17, PDT 2007. www2.if.usp.br/~pdt/4k

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

Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* 2004;25(19):4601-6.

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

Parente EV, Gil JN, Klein RF, Trentini N, Camarini ET, Leite PCC. Periimplantite: revisão da literatura. *Implant News* 2007;4(4):393-8.

Persson GR, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Antimicrobial therapy using a local drug delivery system (Arestin) in the treatment of peri-implantitis. I: Microbiological outcomes. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(4):386-93.

Persson LG, Araujo MG, Berglundh T, Grondahl K, Lindhe J. Resolution of peri-implantitis following treatment. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(3):195-203.

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

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

Piattelli A, Manzon L, Scarano A, Paolantonio M, Piattelli M. Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(6):805-10.

Polo L, Presti F, Schindl A, Schindl L, Jori G, Bertoloni G. Role of ground and excited singlet state oxygen in the red light-induced stimulation of *Escherichia coli* cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257(3):753-8.

Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(4):254-9.

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

Qu Z, Rausch-Fan X, Wieland M, Matejka M, Schedle A. The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification. *J Biomed Mater Res A* 2007;82(3):658-68.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995;22(1):1-14.

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

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

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

Raghavendra S, Wood MC, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(3):425-31.

Renvert S, Lessem J, Dahlen G, Renvert H, Lindahl C. Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol* 2008;79(5):836-44.

Renvert S, Roos-Jansaker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol* 2008;35(8 Suppl):305-15.

Romanos G, Crespi R, Barone A, Covani U. Osteoblast attachment on titanium disks after laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(2):232-6.

Romanos GE, Nentwig GH. Regenerative therapy of deep peri-implant infrabony defects after CO2 laser implant surface decontamination. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28(3):245-55.

Roos-Jansaker AM, Renvert S, Egelberg J. Treatment of peri-implant infections: a literature review. *J Clin Periodontol* 2003;30(6):467-85.

Salvi GE, Persson GR, Heitz-Mayfield LJ, Frei M, Lang NP. Adjunctive local antibiotic therapy in the treatment of peri-implantitis II: clinical and radiographic outcomes. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(3):281-5.

Scarano A, Piattelli M, Vrespa G, Caputi S, Piattelli A. Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study. *J Oral Implantol* 2003;29(2):80-5.

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

Schwartz Z, Nasazky E, Boyan BD. Surface microtopography regulates osteointegration: the role of implant surface microtopography in osteointegration. *Alpha Omegan* 2005;98(2):9-19.

Segundo AS, Bosco AF, Semenoff TADV, Rocatto GEGD, Cirilo DM, Buzelle SL et al. Efeetividade do gluconato de clorexidina a 0,12% e do digluconato de clorexidina a 2% adquiridos em diferentes dentais e farmácias, na cidade de Cuiabá, sobre *Candida albicans*. *Periodontia* 2007;17(1): 18-22.

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

Shibli JA, Theodoro LH, Haypek P, Garcia VG, Marcantonio E, Jr. The effect of CO(2) laser irradiation on failed implant surfaces. *Implant Dent* 2004;13(4):342-51.

Smith K. Photobiological basis of low level lasers irradiation therapy. *Lasers Ther* 1991;3:19-24.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-87.

Stabholz A, Zeltser R, Sela M, Peretz B, Moshonov J, Ziskind D, et al. The use of lasers in dentistry: principles of operation and clinical applications. *Compend Contin Educ Dent* 2003;24(12):935-48;quiz 49.

Stubinger S, Henke J, Donath K, Deppe H. Bone regeneration after peri-implant care with the CO2 laser: a fluorescence microscopy study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(2):203-10.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(5):675-90.

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

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 Suppl 2:68-81.

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

Townes CH. Obituary: Theodore H. Maiman (1927-2007). *Nature* 2007;447(7145):654.

Trisi P, Keith DJ, Rocco S. Human histologic and histomorphometric analyses of hydroxyapatite-coated implants after 10 years of function: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(1):124-30.

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

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

Vasanthan A, Kim H, Drukteinis S, Lacefield W. Implant surface modification using laser guided coatings: in vitro comparison of mechanical properties. *J Prosthodont* 2008;17(5):357-64.

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

Wennerberg A. Implant design and surface factors. *Int J Prosthodont* 2003;16 Suppl:45-7;discussion 7-51.

Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 1995;6(1):24-30.

Wetzel AC, Vlassis J, Caffesse RG, Hammerle CH, Lang NP. Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(2):111-9.

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

Yamada Jr AM, Hayek RRA, Ribeiro MS. O emprego da terapia fotodinâmica (PDT) na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. *RGO* 2004;52(3):207-11.

Yamada Jr AM, Prates RA, Cai S, Ribeiro MS. Photosensitization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* with methylene blue: A microbiological and spectroscopic study. *Proc SPIE* 2008;6846:68460F.

Yeh S, Jain K, Andreana S. Using a diode laser to uncover dental implants in second-stage surgery. *Gen Dent* 2005;53(6):414-7.

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

Zanin ICJ, Brugnera Jr A. Terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal. *Rev PerioNews* 2007;1(1):79-85.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74(1):49-58.

Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002;29(5):456-61.

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Descontaminação da superfície de implantes dentários por meio da terapia fotodinâmica.

Pesquisadores responsáveis: Juliana Marotti, Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos

Instituição/Departamento: Departamento de Prótese da FOUSP

Telefone para contato: (11) 3091-7885 ou (11) 2941-4114

Local da coleta de dados: ICB – USP

Prezado Senhor:

- Você está sendo convidado a participar desta pesquisa de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que você se decidir a participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivos: As informações abaixo são para esclarecer e pedir a sua participação voluntária neste estudo que tem por finalidade medir a descontaminação na superfície dos implantes através da terapia fotodinâmica, que consiste na aplicação de um corante associado com laser em baixa intensidade. Todo o estudo será *in vitro*, ou seja, em laboratório, não será feito em humanos nem em animais.

Procedimentos: Será coletada sua saliva em um copo plástico e esta saliva será depositada nos implantes. Será medido então o número de colônias de bactérias, ou seja, o quão contaminado está cada implante. Os implantes são divididos em diferentes grupos, sendo que em cada grupo os implantes serão descontaminados de diferentes modos. Depois iremos avaliar o quanto descontaminou cada grupo a fim de saber qual método utilizado foi mais eficiente. Os resultados da pesquisa serão posteriormente enviados para publicação em uma revista científica a ser selecionada. Todos os seus dados permanecerão em sigilo, com sua identidade preservada.

Riscos e Benefícios: Teremos o cuidado de te encaminhar para uma sala ou ambiente fechado a fim de evitar um possível constrangimento ao fornecer sua saliva no recipiente. Não haverá um benefício direto, mas para a comunidade clínica e científica em geral ao divulgar os resultados deste estudo. O benefício pode estender-se a todos os pacientes portadores de implantes caso os resultados dessa pesquisa sejam satisfatórios. A saliva será coletada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Não haverá qualquer tipo de ressarcimento financeiro ou ajuda de custo. A saliva coletada será utilizada somente para os objetivos propostos desta pesquisa.

Sigilo: As informações obtidas não serão utilizadas para divulgar sua identidade. Garantimos esclarecer qualquer tipo de dúvida que possa ter durante o andamento da pesquisa. A pesquisadora responsável, Juliana Marotti, poderá ser encontrada no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária – São Paulo-SP – Departamento de Prótese Dentária da Faculdade de Odontologia da USP, ou nos telefones (11) 3091-7885 ou (11) 2941-4114. Garantimos ainda, que poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, não interferindo no tratamento que esteja sendo realizado.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Prof. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo). Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora Juliana Marotti, concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

São Paulo, 18 de junho de 2008.

Nome completo

RG:
CPF:
Endereço:
Tel:

APÊNDICE B – Água Peptonada e Solução de Hidróxido de Sódio

Água Peptonada

Água destilada.....	1 L
Tryptone.....	2,5 g
Peptamin (Tryptone E-peptone).....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g

Aquecer até dissolver por completo. Dispensar em tubos e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Solução de Hidróxido de Sódio (1 M)

1 N.....	4 g
3 N.....	12 g
10 N.....	40 g

Dissolver em 100 mL de água destilada.

APÊNDICE C – Ágar Brucella Sangue

Água destilada.....	950 mL
Ágar Brucella.....	43 g
Extrato de levedura.....	2 g

Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos. Após, resfriar o meio a 45°C, adicionar:

Solução de hemina.....	1 mL
Solução de menadione.....	0,1 mL
Sangue de carneiro desfibrinado.....	50 mL

APÊNDICE D – Hemina e Menadione

Solução de Hemina

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

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

Solução de Menadione

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

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

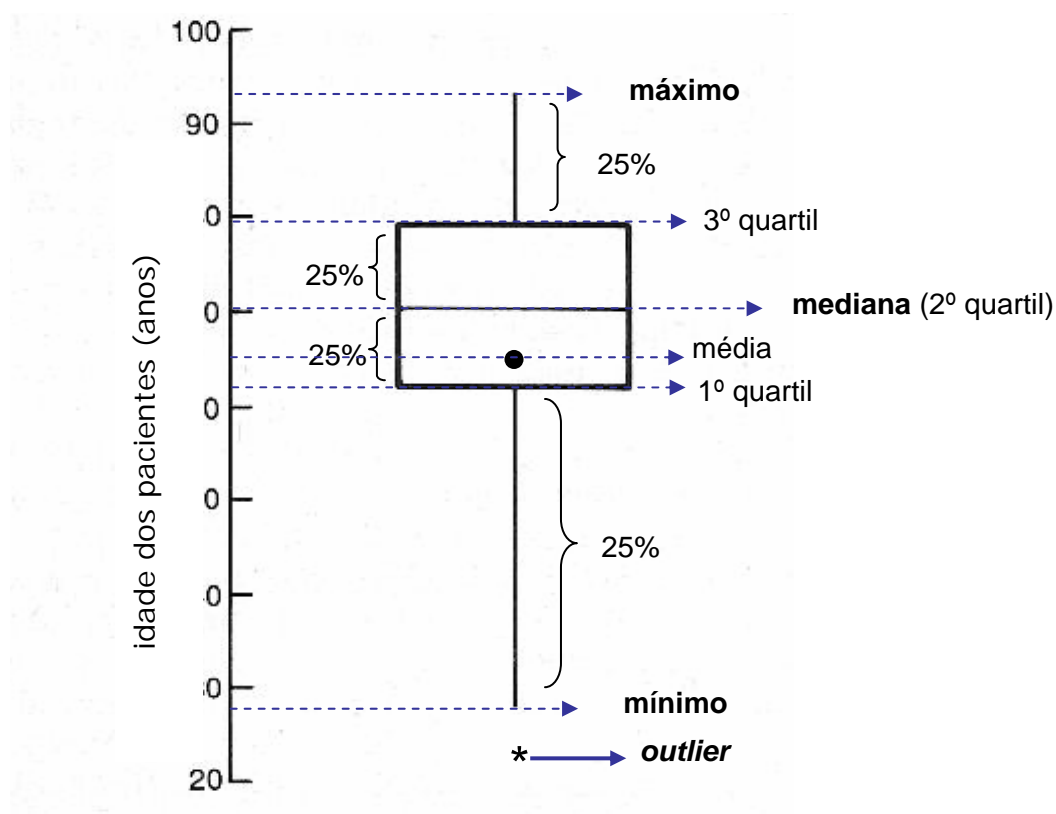
APÊNDICE E – Interpretação do gráfico de Boxplot

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

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

Na estatística descritiva, um “quartil” é qualquer um dos três valores que divide um conjunto ordenado de dados em quatro partes iguais, e dessa forma, cada parte representa 1/4 (25%) da amostra ou população. Portanto, 1º quartil, é o valor que representa 25% da amostra ordenada, 2º quartil (mediana) é o valor que representa 50% dos dados; 3º quartil é o valor que representa 75% dos dados.

Exemplo de um gráfico de boxplot:



ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa




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

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 184633
Protocolo 68/2008

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "**Descontaminação da superfície de implantes dentários por meio da terapia fotodinâmica**", de responsabilidade da Pesquisadora Juliana Marotti e sob orientação da Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos.

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

São Paulo, 10 de junho de 2008.


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