



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Laser de Diodo na inativação de lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por *Porphyromonas gingivalis* aderidos à superfície de implantes dentários de titânio. Estudo piloto *in vitro*.

Willian Caetano Rodrigues

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre Profissional na área de *Lasers* em Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Zzell

**SÃO PAULO
2011**





Mestrado Profissionalizante *Lasers* em Odontologia
FOUSP-IPEN

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO

Laser de Diodo na inativação de lipopolissacarídeos
(LPS) produzidos por *Porphyromonas gingivalis*
aderidos à superfície de implantes dentários de
titânio. Estudo piloto *in vitro*.

Willian Caetano Rodrigues

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Mestre Profissional na
área de *Lasers* em Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Zzell

**SÃO PAULO
2011**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha adorável filha **Yasmin**, minha jóia mais preciosa, cujos cuidados nesta existência me foram maravilhosamente confiados por Deus. Seu amor contém a inocência de quem, não tendo ainda a correta noção de minhas limitações, me admira e me incentiva o crescimento, acreditando que eu ainda possa realizar algo grandioso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **DEUS**, pela oportunidade da vida e pela iluminação dos caminhos que tenho percorrido ao longo desta existência.

Aos meus **familiares** e **amigos** que compartilharam todas as minhas angústias, frustrações e alegrias durante o desenvolvimento do Curso de Mestrado e realização deste trabalho.

Um agradecimento especial a minha esposa **Ana Cláudia** pela extraordinária tolerância, carinho e compreensão em relação aos momentos de ausência, além da resignação diante das dificuldades impostas pelo redirecionamento dos recursos financeiros da família.

Ao amigo **Prof. Dr. Carlos Eduardo Ramos de Sant'Ana (Kadu)** pelo incentivo permanente, pelo carinho de irmão, pelo virtuosismo científico e pela postura sempre ética.

Aos **professores** de todas as disciplinas do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia e, em especial, à minha orientadora **Prof^a Dr^a Adriana Costa Ribeiro** cujo auxílio e orientação acadêmica foram imprescindíveis para que o sonho do mestrado pudesse ser concretizado e à **Prof^a Denise M. Zezell**, cuja competência e dedicação estimulam a vocação acadêmica.

Ao **Prof. Walter Myiakawa** pela orientação e apoio em relação às medidas de rugosidade das superfícies dos discos de titânio.

À **Prof^a Márcia Mayer** por permitir a utilização de seu laboratório e equipamentos para a realização da parte microbiológica do trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (**IPEN**), ao Centro de *Lasers* e Aplicações (**CLA**), ao Laboratório Especial de *Laser* em Odontologia (**LELO**), à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (**FOUSP**) e ao Instituto de Ciências Biomédicas (**ICB**) por permitirem a utilização de suas dependências, infraestrutura e equipamentos.

Ao **CEFOP-FAPESP** (Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão em Óptica e Fotônica), processos CEPID 98/14270-8 e 05/51689-2, por possibilitar a aquisição de equipamentos indispensáveis à realização dessa pesquisa como a câmera termográfica e o dispositivo *laser*.

Ao Processo **CAPES** Pró-equipamentos 2010 que possibilitou a aquisição do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) utilizado neste estudo.

Ao **INFO/CNPQ** pelo financiamento de equipamentos essenciais ao desenvolvimento de pesquisas no CLA/IPEN pelo processo 573.916/2008-D (INCT de Fotônica).

À Empresa **PROSS Sistema de Implantes** (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por fornecer gratuitamente todos os discos de titânio utilizados em todas as fases do presente estudo.

À Empresa **Lonza do Brasil Especialidades Químicas Ltda** (Santo Amaro, São Paulo, Brasil) pelo fornecimento gratuito dos kits para detecção de LPS residual utilizados no estudo piloto.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, a todos que torceram pela minha vitória e até mesmo àqueles que se postaram como adversários, pois seu antagonismo me instigou a estudar e me esforçar ainda mais para atingir meus objetivos.

Laser de Diodo na inativação de lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por *Porphyromonas gingivalis* aderidos à superfície de implantes dentários de titânio. Estudo piloto *in vitro*.

Willian Caetano Rodrigues

RESUMO

Grande parte das falhas no processo de osseointegração de implantes dentários está relacionada à manifestação de periimplantite, processo inflamatório de origem multifatorial associado à presença de bactérias patogênicas gram-negativas e anaeróbias, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Os lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por essas bactérias se aderem fortemente à superfície de titânio dos implantes e contribuem para a manutenção do processo inflamatório mesmo após a morte das mesmas. A irradiação *laser* é uma alternativa promissora para tratamento da periimplantite à medida que apresenta potencial bactericida e para inativação de LPS. No presente estudo objetivou-se avaliar a seguridade térmica e a possibilidade de danos morfológicos à superfície do implante quando da utilização do sistema *laser* de diodo (GaAlAs), em regime de alta potência, para a inativação *in vitro* de LPS. Na primeira fase experimental, 3 discos de titânio constituíram o grupo controle (não irradiados) e outros 30 foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos (n=5) para irradiação com *laser* de diodo ($\lambda = 830 \pm 5 \text{nm}$), no modo contínuo, durante 10 segundos cada. Conforme esperado, tanto os maiores valores de densidade de potência quanto maiores tempos de irradiação com uma mesma potência produziram maiores incrementos de temperatura medidos termografia no infravermelho. As temperaturas superficiais dos discos suplantaram o limiar crítico em alguns pontos, mas o resfriamento das amostras ocorreu, no máximo, em 22 segundos. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) não evidenciou alterações estruturais nas superfícies dos discos. Na segunda fase do experimento, o Teste de Limulus demonstrou relativa redução nas concentrações de LPS. Concluiu-se então que existe seguridade térmica e morfológica na utilização do *laser* de diodo com os parâmetros usados nesse estudo (1W, 2W e 3W,

tanto com a fibra em contato quanto no modo não contato) e possível eficácia na inativação de LPS, mas estudos posteriores com uma amostragem maior devem ser realizados para essa confirmação.

ABSTRACT

Most of the flaws in the process of osseointegration of dental implants is related to the manifestation of periimplantitis, an inflammatory process of multifactorial origin associated with the presence of pathogenic bacteria and anaerobic gram-negative bacteria such as *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. Lipopolysaccharides (LPS) produced by these bacteria adhere strongly to the surface of titanium implants and contribute to maintaining the inflammatory process even after the death of them. The *laser* irradiation is a promising alternative for the treatment of periimplantitis as it has bactericidal effect and have the potential to inactivate LPS. The present study aimed to evaluate the security and the possibility of thermal damage to the implant surface morphology when the system is used diode laser (GaAlAs), under high power, for in vitro inactivation of LPS. In the first experiment, three titanium disks were used as controls (not irradiated) and another 30 were randomly divided into six groups (n = 5) for irradiation with diode laser ($\lambda = 830 \pm 5$ nm) in continuous mode, for 10 seconds each. As expected, both the highest values of power density and longer periods of irradiation with the same power produced greater increases in temperature measured in the infrared thermography. The surface temperatures of the disks surpassed the critical threshold at some points, but the cooling of the samples occurred at most, 22 seconds. Analysis by scanning electron microscopy (SEM) revealed no structural changes on the surfaces of the disks. In the second stage of the experiment, the Limulus Test showed relatively reduced concentrations of LPS. It was concluded then that there is thermal and morphological security in the use of diode laser with the parameters used in this study (1W, 2W and 3W, both with the fiber in contact mode and noncontact) and possible efficacy in inactivating LPS, but further studies with a larger sample should be performed for confirmation.

SUMÁRIO

Páginas	
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Tecidos periodontais e periimplantares	17
3.2 Mucosite periimplantar e Periimplantite	20
3.3 Lipopolissacarídeos (LPS)	22
3.3.1 Detecção de endotoxinas bacterianas pelo método <i>in vitro</i> (Reação de Limulus)	24
3.3.2 Despirogenização (inativação das moléculas de LPS)	25
3.4 Tratamento da Mucosite Periimplantar e da Periimplantite	25
3.4.1 Tratamentos convencionais	26
3.4.2 Tratamentos com sistemas <i>laser</i>	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Parte I: avaliação termográfica no infravermelho	31
4.1.1 Discos de titânio	32
4.1.2 Irradiação das amostras	33
4.1.3 Grupos experimentais	35
4.1.4 Avaliação das oscilações de temperatura durante as irradiações dos discos	36
4.1.5 Análise estatística	39
4.2 Parte II: análise do padrão morfológico dos discos de titânio através de microscopia eletrônica de varredura	39
4.3 Parte III: inativação de lipopolissacarídeos de <i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>	41
4.3.1 Sensibilização da superfície dos discos de titânio por LPS	42
4.3.2 Irradiação da superfície dos discos de titânio sensibilizados por LPS	42
4.3.3 Detecção dos níveis de LPS pelo teste de Limulus	43
5 RESULTADOS	44

5.1	Avaliação termográfica _____	44
5.2	Análise morfológica da superfície dos discos de titânio por meio de microscopia eletrônica de varredura _____	49
5.3	Inativação de lipopolissacarídeos (LPS) _____	53
6	DISCUSSÃO _____	54
7	CONCLUSÕES _____	60
8	PERSPECTIVAS FUTURAS _____	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	62

1. INTRODUÇÃO

O advento da osseointegração de um material sintético para substituição de dentes perdidos constitui um dos mais importantes avanços do século XX. Diversos estudos garantem previsibilidade científica e suportam a utilização dos implantes dentários de titânio como uma excelente alternativa para a reabilitação de pacientes com edentulismo total ou parcial. Em função disso, sobretudo nos últimos 20 anos, houve um crescimento exponencial na utilização de próteses sobre implantes ao redor do mundo¹.

Apesar da vasta casuística e experimentação clínica, ainda há inúmeros relatos na literatura acerca de falhas no processo de osseointegração dos implantes, usualmente atribuídas à sobrecarga oclusal decorrente de mau planejamento e execução dos tratamentos ou ao desenvolvimento de periimplantite². A primeira é facilmente solucionada através ajustes oclusais ou técnicas mais apuradas na execução das cirurgias e reabilitações protéticas; a periimplantite, porém, requer uma abordagem mais complexa, devido sua etiologia análoga àquela da periodontite, doença infecciosa multifatorial, caracterizada por inflamação e destruição dos tecidos de suporte dos dentes, tais como a gengiva, o cemento, o ligamento periodontal e o osso alveolar³.

Dessa forma, pode-se definir a periimplantite como um processo inflamatório que afeta os tecidos moles e duros ao redor de implantes funcionais e osteointegrados e acarreta a perda de suporte ósseo². O mesmo intensifica-se após a colonização da superfície dos implantes dentários e tecidos circunvizinhos por bactérias patogênicas gram-negativas e anaeróbias tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, à semelhança do que acontece na superfície radicular⁴. Algumas endotoxinas liberadas por essas bactérias, como por exemplo, os lipopolissacarídeos (LPS), são capazes de se aderir fortemente à superfície de titânio dos implantes e

contribuir para a manutenção do processo inflamatório que leva à destruição de tecidos moles e duros, como um estímulo crônico, através da ativação de macrófagos, do estímulo à formação de osteoclastos e do impedimento para a atividade e diferenciação dos osteoblastos no osso alveolar⁵⁻⁷.

No âmbito da Implantodontia atual os maiores esforços são direcionados para intensificar a velocidade e a qualidade da osseointegração o que é conseguido aumentando-se a capacidade hidrofílica e a superfície de contato entre o implante e a fibrina do coágulo⁹. Há diversos tipos de tratamentos aplicados às superfícies dos implantes dentários com essa finalidade. As principais técnicas incluem alterações químicas como a incorporação de partículas inorgânicas (spray de plasma de titânio ou hidroxiapatita, por exemplo) à camada de óxido de titânio e físicas, pelo aumento da porosidade da superfície através de ataques ácidos ou jateamentos. Processos de anodização eletroquímica podem combinar as duas técnicas¹⁰. Entretanto, esse aumento da rugosidade de superfície parece favorecer a deposição de camadas organizadas de placa bacteriana (biofilme) e, conseqüentemente, intensificar o processo inflamatório levando a uma maior destruição óssea¹¹.

Um tratamento eficiente para a periimplantite seria aquele que incluísse não apenas uma redução da carga bacteriana, mas que também buscasse a eliminação ou inativação das endotoxinas produzidas por esses patógenos. Apenas o desbridamento mecânico associado ao uso de antissépticos ou antibióticos parece não ser satisfatório para isso; ao contrário, a liberação extra de LPS após a morte das bactérias pode até incrementar a reação inflamatória e piorar o prognóstico da osteointegração¹².

Não obstante a atividade antimicrobiana de diversos sistemas laser ser cientificamente comprovada, a utilização dos mesmos com a finalidade de tratamento e controle da periimplantite ainda gera controvérsias entre os clínicos e pesquisadores. O

desafio científico é o estabelecimento de parâmetros físicos do sistema laser como potência, comprimento de onda, intensidade, energia e dose de energia que sejam capazes de provocar redução bacteriana e neutralização da atividade de LPS sem, contudo, promover danos térmicos aos tecidos biológicos circunjacentes ou alterações permanentes à superfície metálica dos implantes prejudicando assim a reinserção dos tecidos ósseo e epitelial. Uma realidade nesse sentido é o sistema laser de (Nd:YAG) operando com 1064µm de comprimento de onda ¹². Alguns trabalhos indicam relativo sucesso com lasers de Érbio (Er:YAG) e Dióxido de Carbono (CO₂), respectivamente no destacamento moléculas de LPS das superfícies radiculares¹³ e na fragmentação *in vitro*¹⁴ das mesmas. Os aparelhos que operam através de sistemas diodo (GaAlAs) têm se mostrado eficazes na descontaminação bacteriana de implantes dentários osteointegrados ^{15,16, 17}. Mas não há registros na literatura científica sobre a eficácia do *laser* de diodo (GaAlAs), em regime de alta potência, para a inativação de lipopolissacarídeos (LPS).

Esses equipamentos são menos onerosos, portáteis, de manutenção mais simples do que aqueles citados anteriormente e têm encontrado uma grande aceitação no mercado mundial. No Brasil é cada vez maior o número de profissionais da área da saúde que investe em tecnologia e o uso dos *lasers* de diodo em consultórios odontológicos já está bastante disseminado em nosso país. Esses são fatores que nos motivaram a empreender esse estudo com o intuito de contribuir em relação ao estabelecimento de parâmetros físicos termo-morfológicamente seguros para a utilização desse *laser* com o propósito de neutralização de LPS.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo do estudo é avaliar a eficácia do sistema *laser* de diodo (GaAlAs), em regime de alta potência, para a inativação de endotoxinas (lipopolissacarídeos) produzidas por bactérias gram-negativas anaeróbias envolvidas na etiologia da periimplantite.

2.2. Específicos:

I (Seguridade térmica): mensurar as variações de temperatura nas superfícies dos discos de titânio durante o processo de irradiação com *laser* de diodo (GaAlAs) de alta potência;

II (Morfologia): avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, se ocorre alterações estruturais nas superfícies de discos de titânio após a irradiação com laser de diodo (GaAlAs);

Parte III (Inativação de LPS): avaliar, dentre os parâmetros físicos que se mostraram termo-morfologicamente seguros na utilização dos lasers de diodo (GaAlAs), quais são eficientes na inativação *in vitro* de lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por *Porphyromonas gingivalis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. TECIDOS PERIODONTAIS E PERIIMPLANTARES

O enorme índice de sucesso clínico obtido nas últimas duas décadas contribuiu para o desenvolvimento da Implantodontia como especialidade e está intimamente relacionado aos avanços no conhecimento sobre os eventos biológicos envolvidos no processo de osseointegração e manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares¹. Um dos aspectos importantes é o conhecimento da anatomia, histologia e fisiologia dos tecidos peri-implantares os quais apresentam similaridades com os tecidos periodontais.

A mucosa da cavidade oral pode ser classificada em três tipos: (1) mucosa mastigatória, constituída por gengiva e palato duro, revestida por epitélio pavimentoso estratificado bastante ceratinizado e interdigitada por tecido conjuntivo fibroso denso rico em fibras colágenas (lâmina própria); (2) alveolar ou de revestimento e (3) mucosa especializada, constituinte do dorso da língua, onde encontramos as papilas gustativas¹⁸. A mucosa alveolar, de coloração vermelha mais escura, localizada nas adjacências da junção mucogengival, é revestida por epitélio pavimentoso estratificado não-ceratinizado e sustentada por tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras elásticas, apresentando assim maior mobilidade quando comparada à mucosa mastigatória¹⁸. A gengiva inserida é o tecido que recobre o processo alveolar e circunda a cervical dos dentes, apresentando cor rosa mais clara e mobilidade mínima por estar firmemente aderida ao periósteo do osso alveolar e ao cimento radicular, respectivamente, pela lâmina própria e pelas Fibras de Sharpey^{19,20}. A gengiva marginal livre compreende todas as estruturas teciduais localizadas coronariamente a uma linha horizontal que passa ao nível da junção amelocementária, a saber: epitélio oral; epitélio do sulco

(voltado para a superfície do dente sem adesão ao mesmo); epitélio juncional (participa da adesão dos tecidos moles à estrutura dentária) e a transição entre o tecido epitelial e o conjuntivo, onde temos as Fibras de Sharpey. Nos dentes naturais as fibras de tecido conjuntivo se dispõem perpendicularmente ou obliquamente e estão inseridas no cimento radicular (FIGURA 1). Já no caso dos implantes não há inserção e essas fibras estão dispostas paralelamente ao longo eixo dos mesmos²¹. As fibras do ligamento periodontal mantêm os dentes naturais suspensos e propiciam o movimento fisiológico. O termo osseointegração criado por Branemark¹ pressupõe ausência de tecidos moles entre o implante e o osso; portanto, existem fibras colágenas justapostas apenas na porção coronal à área osteointegrada.

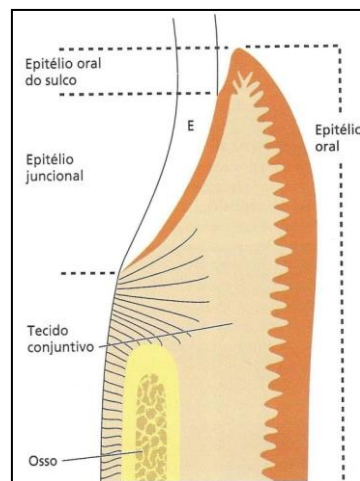


Figura 1 - Estruturas presentes no periodonto saudável¹⁹.

Os tecidos moles periimplantares podem, à semelhança dos tecidos que circundam os dentes constituir uma adesão epitelial à custa de hemidesmossomas, um epitélio sulcular e, dependendo da área receptora do implante, até mesmo uma mucosa mastigatória. É extremamente importante a capacidade do tecido conjuntivo sadio, sem inflamação, de formar uma adesão à superfície do implante capaz de sustentar o epitélio

juncional conforme ilustrado nas FIGURAS 02 e 03. A manutenção da normalidade dessas estruturas garante um selamento biológico e proteção contra invasões bacterianas. Warrer *et al.* (1995)¹⁹ demonstrou em modelo animal que a ausência de mucosa ceratinizada envolvendo o implante piora o impacto do acúmulo de biofilme e acentua o quadro inflamatório dos tecidos periimplantares.

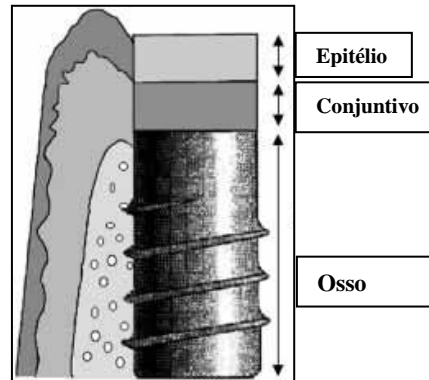


Figura 2 - Desenho esquemático mostrando implante dentário e as zonas de fixação de três diferentes tecidos. Porção apical: zona de fixação do epitélio; Porção intermediária: fixação de fibras conjuntivas gengivais e mais apicalmente: zona de adesão do osso⁵⁰.

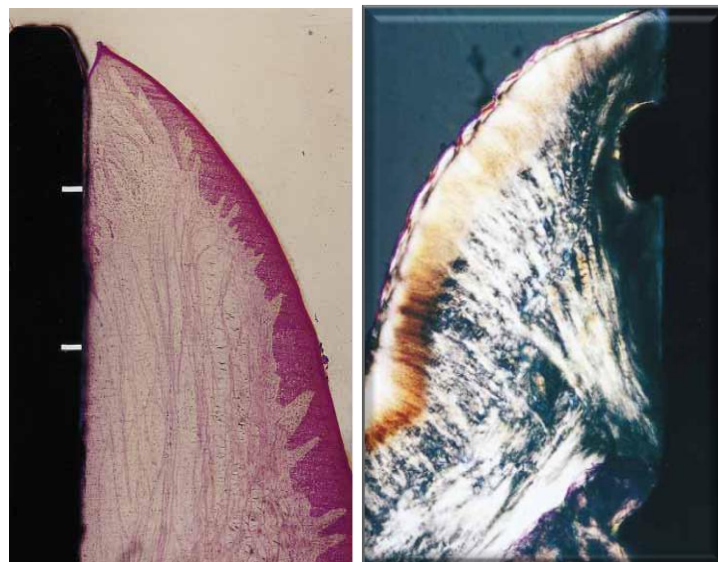


Figura 3 - (a) Fotomicrografia ilustrativa com magnificação de 10x mostrando epitélio e tecido conectivo peri-implantar em área saudável com fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície do implante. (b) Fotomicrografia com mesma magnificação mostrando desorganização do tecido conectivo e fibras colágenas distantes da superfície do implante em área de inflamação²¹.

3.2. MUCOSITE PERIIMPLANTAR E PERIIMPLANTITE

O termo periimplantite foi introduzido no final dos anos 1980 por Mombelli *et. al.*, (1987). No 6º Workshop Europeu de Periodontia em 2008, através de conferência de consenso, as seguintes designações ficaram estabelecidas: mucosite periimplantar é um processo inflamatório reversível da mucosa ao redor de um implante osteointegrado em função, evidenciada por sangramento sob sondagem suave (< 0,25 N) e sem sinais de perda óssea (FIGURA 4: A e B); e periimplantite é caracterizada por sinais de inflamação na mucosa associada a alguma perda óssea diagnosticada através de exame clínico e radiográfico (FIGURA 4: C e D)^{22, 23}.

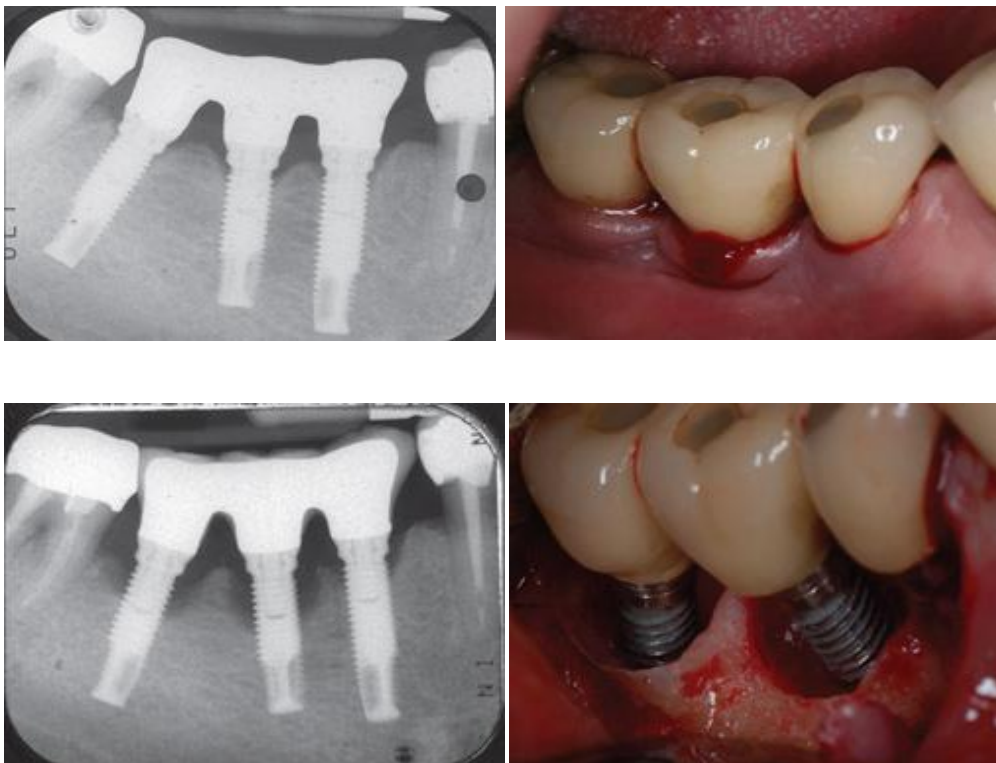


Figura ilustrativa 4 - (A) Quadro característico de periimplantite com sinais clínicos de sangramento à sondagem e supuração; (B) Sinais radiográficos de pequena perda óssea; (C) Radiografia demonstrando acentuação da perda óssea em poucas semanas e (D) Detalhe fotográfico dos defeitos ósseos circunferenciais já bastante acentuados²².

As lesões inflamatórias dos tecidos periodontais (periodontites) e aquelas que acometem os tecidos que circundam os implantes (periimplantites) são fundamentalmente semelhantes no que diz respeito à etiologia, diagnóstico, patogenia, avaliação de riscos e terapêutica. Ambas dependem da presença de biofilme contendo patógenos e da predisposição do hospedeiro para o desenvolvimento da doença. Porém, a dinâmica do processo patológico pode não ser idêntica em todos os casos ^{22,23}. A progressão da periodontite normalmente é impedida por uma barreira de tecido conectivo denso supracrestal que se insere no cemento radicular; no caso dos implantes não há essa inserção tão firme das fibras colágenas e o infiltrado inflamatório pode avançar mais facilmente para o osso ^{22,23}.

A microbiota associada a tecidos periimplantares saudáveis foi caracterizada por inúmeros estudos transversais e é composta basicamente por cocos gram-positivos facultativos (FIGURA 5). Embora eventualmente possa ser encontrado um pequeno número de bastonetes gram-negativos ^{22,24}.

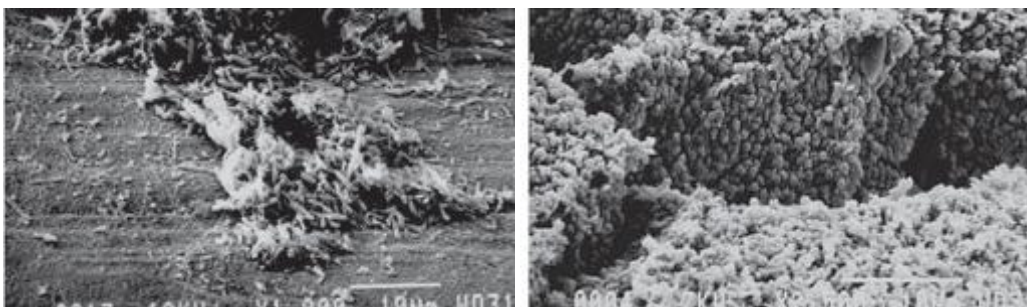


Figura 5 - (a) Eletromicrografia ilustrativa de um abutment de titânio exposto à cavidade oral por duas horas; ilustração do início da colonização bacteriana por cocos; (b) Eletromicrografia de varredura mostrando biofilme maduro constituído por múltiplas camadas no mesmo abutment de titânio exposto à cavidade oral por duas semanas ²².

Vários estudos reportaram uma alta prevalência de anaeróbios gram-negativos associados a implantes com sinais clínicos de periimplantite, que incluem membros do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*) e do complexo laranja (*Fusobacterium sp.* e *Prevotella intermedia*), como definido por Socransky *et. al.*, 1998^{24,25,26}. A bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* também é reportada em alguns sítios infecciosos²⁷ e outros estudos demonstram associação entre a presença de *Staphylococcus aureus*, bastonetes entéricos e *Candida albicans* e o desenvolvimento de periimplantite²².

Implantes dentários instalados em pacientes com histórico de periodontite crônica (28,6%) tendem, de forma estatisticamente significativa, a demonstrar maior incidência de periimplantite do que aqueles instalados em pacientes que nunca manifestaram a doença (5,8%)^{22,28}.

A detecção de quaisquer adversidades relacionadas aos tecidos onde estão instalados os implantes dentários é fundamental para o sucesso e longevidade do tratamento. A avaliação da concentração de citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular periimplantar pode ser uma importante ferramenta futura no sentido de prevenir a manifestação de periimplantite²⁹. Por exemplo, pacientes que manifestam algum sítio de periimplantite apresentam um incremento na produção de interleucina-17 (IL-17) que, por sua vez, induz a produção de outras citocinas e contribui para a patogênese da perda óssea³⁰.

3.3. LIPOPOLISSACÁRIDES (LPS)

Substâncias que produzem elevação da temperatura do corpo, ou seja, induzem febre, são denominadas *pirogênios* (grego pyro = ardente ou fogo). Bactérias, fungos, vírus e também alguns agentes não microbianos como, por exemplo, alguns fármacos,

esteróides, frações do plasma e o adjuvante sintético muramil dipeptídeo são exemplos de pirogênios exógenos, originários fora do corpo, que induzem elevações térmicas quando injetados em humanos e animais.

Os lipopolissacarídeos (endotoxinas), complexos de alto peso molecular associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas, sejam elas patogênicas ou não, constituem os mais presentes e importantes pirogênios exógenos^{31,32}. Apesar de a maior parte da endotoxina permanecer associada à parede celular até a desintegração da bactéria, quantidades ínfimas desse material são liberadas, na forma solúvel, por culturas de bactérias jovens ou também por bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* e outros agentes patogênicos em crescimento, inclusive *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Actinomyces*, microorganismos diretamente envolvidos na etiologia da periimplantite³¹.

O pirogênio endógeno é uma substância específica, sintetizada por diferentes células de hospedeiros após exposição aos pirogênios exógenos como a endotoxina, e capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica para ativar o hipotálamo e causar febre.

Citocinas inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) já foram reportados como indutores de osteoclastogênese de forma indireta. Da mesma forma, os lipopolissacarídeos (LPS), componentes inflamatórios produzidos por bactérias gram-negativas, também podem induzir a formação de osteoclastos na ausência de osteoblastos³³.

Elevadas concentrações de LPS associadas a baixos valores de pH na saliva predispoem as superfícies dos implantes de titânio a um maior índice de corrosão eletroquímica, o que pode diminuir sua biocompatibilidade, induzir reação inflamatória com liberação de mediadores dos macrófagos que contribuem para a reabsorção óssea e, conseqüentemente, levar à falha dos mesmos³⁴.

3.3.1. Detecção de endotoxinas bacterianas pelo método *in vitro* (Reação de Limulus)

O procedimento mais simples e amplamente usado para detecção de endotoxinas baseia-se na geleificação. O método se baseia na reação entre o lisado do amebócito de *Limulus* (LAL) e o lipopolissacarídeo, produzindo um gel opaco facilmente reconhecido. O reagente LAL é um extrato aquoso dos amebócitos, que são as células sanguíneas da hemolinfa azul da espécie de caranguejo ferradura *Limulus polyphemus*, composto de enzimas que reagem em presença de pequenas quantidades de endotoxina.

Volumes iguais de reagente LAL e da solução a ser analisada são transferidos a tubos de ensaio. A mistura homogeneizada é incubada em banho de água a 37°C por uma hora. O ponto final da reação é facilmente verificado pela remoção dos tubos e inversão a 180°. A presença do gel que se mantém sólido durante a inversão é considerada positiva para endotoxinas. O ensaio se constitui em teste limite, levando-se em consideração a sensibilidade do LAL empregado, que varia de 0,25 a 0,015 UE mL⁻¹ (UE = Unidade de Endotoxina). A formação de gel ocorre quando a enzima de coagulação dos amebócitos ativada pela endotoxina, na presença de cátions divalentes, é adicionada à proteína coagulante (coagulogênio) ³⁵.

A reação entre o lisado de amebócito e a endotoxina é dependente da concentração de endotoxina, temperatura e também do pH ³⁵. A reação LAL-endotoxina é otimizada na faixa de pH 6,4 a 8,0 (faixa de neutralidade). Abaixo ou acima desses valores de pH a reatividade do LAL diminui, o que pode ser minimizado pela utilização de tampões e diluições.

3.3.2. Despirogenização (inativação das moléculas de LPS)

A inativação pode ser obtida pela detoxificação da molécula de lipopolissacarídeo (LPS) usando tratamentos químicos que quebrem pontes lábeis ou bloqueiem sítios necessários à atividade pirogênica: hidrólise ácida, oxidação com peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, periodato de sódio, permanganato de potássio diluído, alquilação com anidrido acético e succínico, ou mesmo óxido de etileno. Outros processos que levam à inativação de endotoxinas são tratamento por calor seco, radiação ionizante e tratamento com o antibiótico polimixina B ^{31,32}.

Dados recentes da literatura científica também apontam eficiência de alguns tipos de laser na inativação de endotoxinas aderidas à superfície de implantes ^{12,14}.

3.4. TRATAMENTO DA MUCOSITE PERIIMPLANTAR E DA PERIIMPLANTITE

A etiopatogenia da periimplantite parece ser multifatorial e está relacionada ao ambiente próximo ao implante, à interface implante/tecidos moles, ao sistema imunológico e a fatores relacionados ao paciente (tabagismo, higiene oral, doenças sistêmicas e sobrecarga oclusal)³⁶, mas há muito, está bem documentado na literatura científica que o principal fator etiológico relacionado ao desenvolvimento da mucosite periimplantar e da periimplantite é a presença de bactérias, com predominância de uma microflora gram-negativa e anaeróbia. Portanto, a redução da carga bacteriana constitui medida terapêutica básica para o controle desses processos inflamatórios e apenas quando o grau de contaminação se reduz a um nível em que as defesas do hospedeiro conseguem debelar a infecção, pode ocorrer adequada regeneração dos tecidos periimplantares ^{11,25}.

3.4.1. Tratamentos convencionais

O método mais óbvio de tratamento é o debridamento mecânico através do uso de curetas apropriadas (plástico, fibra de carbono ou revestimento com teflon), mas a própria morfologia das espiras e as irregularidades de superfície dificultam a remoção completa do biofilme. Alguns recursos adjuvantes como a utilização de antimicrobianos sistêmicos, antissépticos de uso local como a clorexidina, na forma de bochechos ou perioships, e alguns tipos de laserterapia foram então propostos para complementar essa descontaminação ¹¹.

Renvert *et al.* (2008) ¹¹, através de revisão sistemática de literatura, concluíram que terapia mecânica não cirúrgica seria efetiva para tratamento da mucosite e que o uso de enxaguatórios antissépticos intra-orais poderia incrementar os resultados. Já em relação à periimplantite, parece que não haveria efetividade com a terapia mecânica e os resultados com o uso concomitante de clorexidina teriam efeitos limitados nos parâmetros clínicos e microbiológicos. Contudo, com o uso de antibióticos sistêmicos ou de ação local haveria redução dos índices de sangramento à sondagem e profundidade de bolsa.

Para Claffey *et al.* (2008)³⁷, o desbridamento cirúrgico incluindo descontaminação parece ser mais efetivo do que o desbridamento não cirúrgico das lesões periimplantares, debelando a inflamação e promovendo preenchimento de defeitos ósseos. Reosseointegração demonstrou ser mais pronunciada em superfícies rugosas que em superfícies lisas e nenhum método isolado de descontaminação foi estatisticamente mais eficiente ³⁷. O uso adjunto de material de enxerto resultaria em maior ganho de osso, mas isso parece estar mais relacionado ao tamanho e morfologia

do defeito. Ainda para esses autores, não está determinado se o uso sistêmico de antibióticos concomitantemente a qualquer terapêutica seria mesmo necessário.

Em Conferência de Consenso realizada no ano de 2004 foi estabelecido um protocolo com uma série de procedimentos clínicos cirúrgicos ou não cirúrgicos visando ampliar o índice de sucesso e sobrevida dos implantes dentários através da prevenção e tratamento da periimplantite⁹. Embora inúmeros trabalhos tenham demonstrado relativo índice de sucesso no que diz respeito à redução da carga bacteriana e atenuação do processo inflamatório usando esses protocolos, ainda era elevado número de casos em que a cirurgia ressectiva para remoção do implantes se fazia necessária.

Outras medidas terapêuticas tinham que ser incorporadas ao arsenal já existente e diversos pesquisadores reconheceram no laser uma alternativa viável para auxiliar no processo descontaminação dos sítios periimplantares.

3.4.2. Tratamentos envolvendo sistemas *lasers*

Diversos sistemas *laser* foram ostensivamente estudados nos últimos anos e os protocolos de tratamento ainda não estão completamente estabelecidos. O tecido ou material alvo e o tipo de patologia são determinantes para a escolha do tipo de *laser* e a definição dos parâmetros físicos a serem aplicados em cada caso. Alguns conceitos são imprescindíveis para se entender o seu mecanismo de ação.

Os processos ópticos fundamentais que ocorrem quando a luz incide sobre a matéria são: reflexão, transmissão, absorção e dispersão ou espalhamento, sendo os dois últimos os que governam as interações da luz com o tecido. Uma pequena porcentagem dos fótons que atinge a superfície de um determinado material é refletida em decorrência da alteração do índice de refração entre o ar e a camada superficial do mesmo; os demais podem ser absorvidos, espalhados ou transmitidos. Na absorção, o

fóton cede sua energia para o átomo ou para a molécula os quais são conhecidos como cromóforos ou estruturas-alvo. Depois da absorção, o fóton deixa de existir e o cromóforo fica excitado, podendo sofrer reação fotoquímica dissipar a energia na forma de calor ou emitir novamente a luz (fluorescência). O coeficiente de absorção ($\alpha[\text{cm}^{-1}]$), que é a probabilidade de um fóton ser absorvido por unidade de comprimento, depende da concentração dos cromóforos presentes e varia conforme o comprimento de onda (FIGURA 06). A pele, por exemplo, contém pigmentos e estruturas distintas, portanto, possui diferentes coeficientes de absorção.

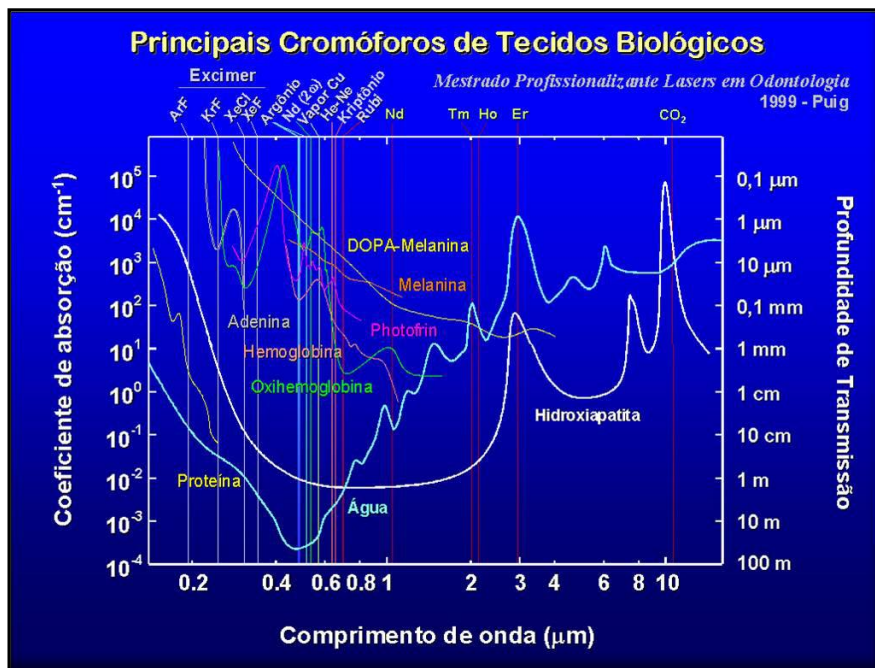


Figura 6 - Relação entre coeficiente de absorção e profundidade de transmissão em diversos materiais em função do comprimento de onda do laser utilizado ³⁸.

Ao ser absorvida a radiação produz efeitos térmicos e não térmicos. Os efeitos não térmicos podem ser fotoquímicos, fotoelétricos, fotomecânicos e multifotônicos. Já os efeitos térmicos incluem: corte dos tecidos, coagulação, vaporização e carbonização

tecidual. O aumento da temperatura tecidual decorre da vibração rápida de átomos e moléculas induzidas por fótons de baixa energia (infravermelho)³⁸.

Para uso odontológico, os lasers de alta potência usados em procedimentos cirúrgicos em tecidos moles devem apresentar comprimentos de onda específicos que favoreçam a absorção por parte dos tecidos, de acordo com os cromóforos constituintes, como a pele, gengiva e mucosas permitindo a adequada ação térmica de vaporização, ablação e corte, além de coagulação. O laser de CO₂ ($\lambda=10.600$ nm) seria o de primeira escolha para situações em que trabalhamos a certa distância dos tecidos duros, mas o laser de Nd:YAG ($\lambda =1.064$ nm) é também muito útil nos procedimentos de corte e provoca certa hemostasia. O processo de ablação depende das propriedades ópticas dos tecidos e das características do feixe^{38,39}.

As características do feixe, como comprimento de onda, perfil temporal do pulso e a quantidade de energia absorvida determinam o volume de ablação e os danos térmicos aos tecidos adjacentes. O aumento da largura do pulso aumenta a lesão térmica, pois a duração de exposição à radiação é maior, aumentando a quantidade de calor que será difundida termicamente. A densidade de potência nas laterais da cratera é menor se comparada ao centro, por duas razões: pelo perfil de intensidade de energia e pelo ângulo oblíquo de incidência nas paredes inclinadas da cratera. Sistemas de onda contínua tendem a promover lesão residual por coagulação, causando desidratação e carbonização. Em contraste, pulsos mais energéticos e curtos removem o tecido com maior eficiência, menor dano térmico e sem nenhuma carbonização. O Laser de Er:YAG que emite em 2.940nm é fortemente absorvido pela água e capaz de promover ablação superficial altamente precisa. É excelente para ablação delicada, porém menos efetivo para promover hemostasia. O uso de pulsos mais longos possibilita a coagulação de vasos e aumento intencional de lesão térmica por permitir condução térmica maior.

Técnicas de regeneração óssea em lesões periimplantares só podem ser utilizadas após completa desinfecção dos sítios. Em se tratando de microorganismos, a luz colimada e coerente do laser deve ser primariamente absorvida pela água existente no interior dos mesmos resultando em rápida evaporação e morte celular. Então é necessário que se atinja determinado patamar de temperatura para que haja destruição bacteriana, mas sem que haja grande difusão de calor para os tecidos adjacentes⁸. Incrementos acima de 10°C devem ser evitados já que o tecido ósseo pode sofrer injúrias caso se mantenha por 60 segundos à temperatura de 47°C⁴⁰.

O Tempo de Relaxamento Térmico (TRT) é o tempo transcorrido para que o pico de temperatura dos tecidos de uma determinada região aquecida pelo *laser* decaia a 37% do valor total. Esse conceito é importante para a aplicação de lasers no modo pulsado ou chaveado, pois esse intervalo de tempo permite algum resfriamento dos tecidos circunjacentes à área irradiada, evitando maiores danos térmicos aos mesmos^{38,39}. Fato consagrado na literatura é que o modo pulsado gera menores elevações de temperatura na superfície dos implantes.

Diversos tipos de superfícies de implantes como as obtidas por tratamento ácido, jateamento de areia, spray de plasma de titânio e revestidas por hidroxiapatita foram comparadas no que diz respeito à absorção de vários comprimentos de onda⁴¹. No estudo de Kreisler *et al.*, os autores utilizaram *lasers* de Nd:YAG, Ho:YAG, CO₂ e GaAlAs em diversos parâmetros de potência. Após essas superfícies terem sido analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura, constatou-se que os *lasers* de YAG provocaram áreas de fusão, trincas e crateras nas superfícies dos implantes, enquanto que o *laser* de CO₂ provocou apenas alterações superficiais naquelas tratadas com ataque ácido, revestidas por hidroxiapatita e por spray de plasma de titânio. O *laser* de GaAlAs foi o único deste estudo que não modificou a topografia dos implantes, por

isso a conclusão a partir desses resultados foram que: os *lasers* de Nd:YAG e o Ho:YAG não eram indicados para descontaminação de superfícies de implantes, independentemente da potência utilizada. Já os *lasers* de CO₂ e Er:YAG deveriam ter suas potências controladas para evitar alterações e danos às superfícies⁴¹.

Os sistemas *lasers* de diodo são relativamente recentes e promissores, além de serem portáteis e de custo relativamente baixo quando comparados a outros aparelhos. Alguns estudos mostram que são eficazes no controle bacteriano, destruindo microorganismos tais como *Actinobacillus*, *Prevotella* e *Porphyromonas*⁴² e parecem não causar danos às superfícies dos implantes, mesmo em regimes de potências mais elevadas. Segundo Romanos *et al.*, laser diodo 960 nm não causou danos à superfície de titânio mesmo com 15 watts de potência¹⁷.

A problemática atual não é apenas a necessidade de eliminação de microorganismos, mas também a inativação de endotoxinas (lipopolissacarídeos) produzidas por bactérias gram-negativas anaeróbias envolvidas na etiologia da periimplantite. Com que parâmetros físicos de operação o sistema laser de diodo (GaAlAs) seria eficaz nesses processos, sem alterar as características físico-químicas do titânio?

4. MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I

4.1. I: AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA NO INFRAVERMELHO

4.1.1. Discos de titânio

Os discos usados em todos os experimentos constantes no presente estudo foram obtidos a partir da secção, com equipamentos perfeitamente calibrados, de cilindros de titânio comercialmente puro (ASTMF67 - grau IV), de modo a se obter espécimes padronizados com 0,5 mm de espessura e 5,0 mm de diâmetro (FIGURA 7). Os mesmos receberam tratamento de superfície em todas as suas faces, com subtração por duplo ataque ácido, idêntico àquele aplicado aos implantes dentários comercialmente disponíveis e foram gentilmente cedidos pela empresa PROSS Sistema de Implantes (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

A porosidade gerada pelo tratamento ácido não é homogênea e visa gerar maior superfície de contato entre o titânio e as células ósseas facilitando o processo de osseointegração. Segundo informações técnicas da empresa fabricante, o diâmetro dos poros obtidos por esse tratamento varia entre 3 e 5 μm (micrometros) e apresentam as mais variadas formas. Os discos foram limpos, esterilizados por radiação gama (25KGray) e acondicionados em invólucros que garantem a manutenção da esterilização por seis meses, à semelhança dos implantes comercialmente disponíveis.



Figura 7 - discos de titânio com 0,5 mm de espessura por 5,0 mm de diâmetro

4.1.2. Irradiação das amostras

O equipamento laser de diodo (Opus 10, OpusDent, Sharplan, Norwood, MA, USA) utilizado no desenvolvimento desse trabalho emite fótons no comprimento de onda de $830 \pm 5 \text{ nm}$, operando no modo chaveado ou contínuo, com potência variando entre 0,1 e 4,0 W (FIGURA 8). O sistema de entrega do feixe laser foi uma fibra óptica de sílica de $300\mu\text{m}$ de diâmetro, acoplada a uma peça de mão que acompanha o aparelho.



Figura 8 - Aparelho laser semiconductor OPUS 10

Para melhor padronização, imediatamente antes da irradiação de cada amostra (disco de titânio), a potência dissipada pela ponta ativa da fibra óptica era mensurada por um medidor de potência e energia (Fieldmaster GS, Coherent, EUA), acoplado a um detector (LM45, Coherent, EUA – FIGURA 9). Quando houve queda da potência dissipada, a mesma teve sua ponta adequadamente clivada.

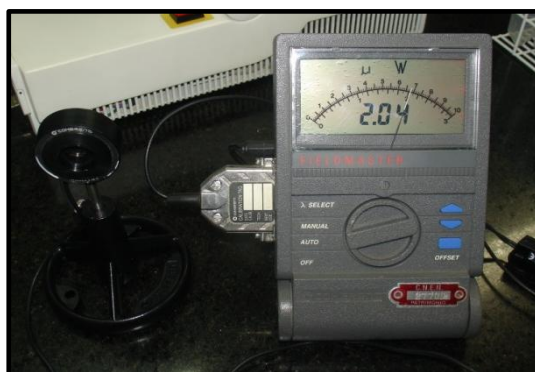


Figura 9 - Power meter acoplado ao detector

Para o procedimento de irradiação laser a fibra óptica permaneceu imóvel e disposta perpendicularmente à superfície do disco com o auxílio de suportes ópticos (Newport Corp., Irvine, CA, EUA).

Uma placa de vidro foi acoplada à plataforma móvel do motor de passo permanecendo na mesma posição até o final dos experimentos. Sobre esta foi fixada uma fita adesiva dupla face com marcações a tinta que delimitavam precisamente a área em que o disco de titânio deveria ser posicionado. Cada disco foi irradiado em toda sua superfície, sob velocidade constante, através da movimentação da plataforma do motor de passo. O mesmo teve sua programação ajustada de modo a permitir a varredura ou completa de uma área quadrangular com $0,25 \text{ cm}^2$ na qual o disco de titânio encontrava-se inscrito (FIGURA 10), durante um intervalo de 13 segundos. Considerando-se que a medida do diâmetro do disco é idêntica àquela de cada lado do quadrado (0,5 cm) em que o mesmo estava inscrito, a área circunferencial efetivamente irradiada foi de 0,19

cm², valor correspondente a aproximadamente 78% da área quadrangular. Portanto, o intervalo de irradiação efetiva do disco foi de apenas 10,14 segundos, ou seja, 78% do intervalo total de 13 segundos. Esse tempo de irradiação (~10s) está em consonância com outros estudos realizados^{43,44}.

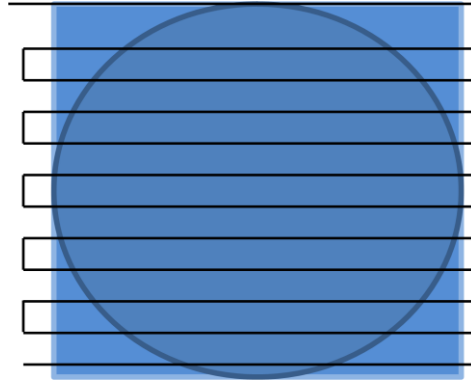


Figura 10 - desenho esquemático da varredura de superfície do disco

4.1.3. Grupos experimentais

Trinta e três espécimes (discos de titânio) foram considerados para os testes de avaliação termográfica e morfológica. Três amostras não foram irradiadas e constituíram o grupo controle (GC) para análise do padrão morfológico da superfície dos discos de titânio através de microscopia eletrônica de varredura. Os demais foram aleatoriamente divididos em seis grupos experimentais com cinco espécimes cada (n=5), os quais foram irradiados pelo laser de diodo ($\lambda = 830 \pm 5 \text{ nm}$). Cada disco teve toda sua superfície irradiada num intervalo de aproximadamente 10 segundos, sob velocidade constante e com o auxílio do motor de passo, conforme descrição anterior.

As amostras (n=30), aleatoriamente divididas em seis grupos experimentais, foram irradiadas sob o modo de emissão contínuo (CW) com três diferentes valores de potência média, dependendo do grupo: 1W, 2W ou 3W (TABELA 1). Em três desses grupos a fibra foi mantida em contato com a superfície do disco (modo contato) e nos

demais manteve-se a distância de 3,0 mm entre a ponta da fibra e a superfície o mesmo (modo não-contato). A distância de 3,0 mm foi estipulada em consonância com a literatura científica⁴³.

TABELA 1 - Distribuição das amostras nos grupos experimentais

GRUPOS	PROCEDIMENTO	AMOSTRAS	DENSIDADE DE POTÊNCIA
Controle (GC)	Amostras não irradiadas	n = 3	Nula
Grupo 1W	Modo não contato	n = 5	796,18 W/cm²
Grupo 2W	Modo não contato	n = 5	1592,35 W/cm²
Grupo 3W	Modo não contato	n = 5	2388,53 W/cm²
Grupo 1W	Irradiação contato	n = 5	1415,43 W/cm²
Grupo 2W	Irradiação contato	n = 5	2830,86 W/cm²
Grupo 3W	Irradiação contato	n = 5	4246,28 W/cm²

4.1.4. Avaliação das oscilações de temperatura durante as irradiações dos discos

Para detectar as variações de temperatura nas superfícies dos discos durante o processo de irradiação laser utilizou-se uma câmera termográfica detectora de radiação na faixa do infravermelho (ThermaCam SC3000, FLIR Systems, Boston, EUA – FIG.11). Esta é dotada de um detector do tipo *Quantum Well Infrared Photodetector* (QWIP) refrigerado a 70 K, capaz de registrar temperaturas na faixa de - 20°C a 2000°C, com variação de $\pm 0.01^\circ\text{C}$.

Para calibração do dispositivo ajustou-se a distância focal em relação à área de interesse para 10 cm com auxílio de lentes apropriadas e os seguintes parâmetros foram estabelecidos: (a) temperatura ambiente de 21° C; (b) umidade relativa do ar em torno de 54%; (c) intervalo de varredura entre 10 e 150° C e (d) emissividade do titânio (Ti) de 0,63. As imagens em infravermelho foram obtidas com resolução de 0,01° C e taxa de aquisição de imagens de 60 Hz.

A câmera termográfica capta imagens no infravermelho e gera diferentes tons de cinza ou cores correspondentes aos diferentes valores de temperatura em cada pixel da imagem como as imagens de um filme contínuo. As imagens capturadas e arquivadas com o auxílio do programa *ThermaCAM Researcher 2001* demonstram o padrão de dissipação de calor e variação de temperatura.

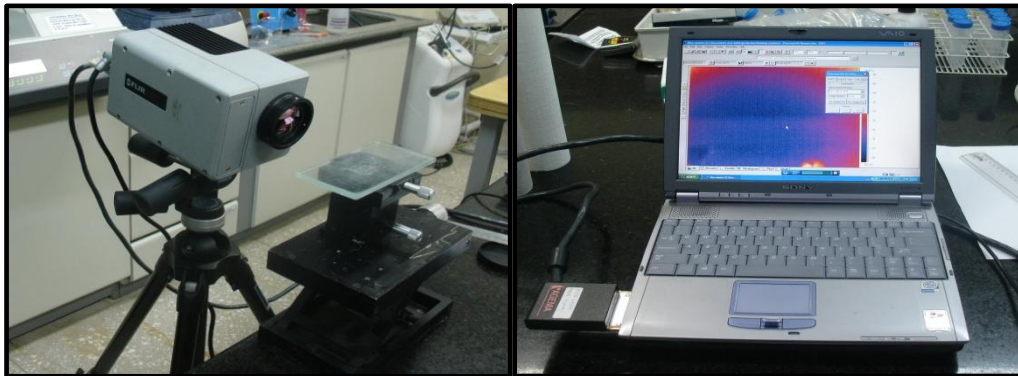


Figura 11 - Ilustração da montagem experimental e do sistema de captação ThermaCam SC 3000

Para cada espécime foi obtido um filme, cujo registro dos dados se iniciava cerca de 5 segundos antes da irradiação e se encerrava 20 segundos após o término da mesma. Isso para que fosse possível registrar a temperatura inicial, as oscilações durante o procedimento e o decaimento de temperatura no centro do disco de titânio.

Os filmes obtidos pela câmera termográfica para cada disco irradiado foram analisados através do programa *ThermaCam Researcher* 2001. A aferição das temperaturas ocorreu em três diferentes pontos da superfície de cada disco de titânio os quais foram designados **A**, **B** e **C**. As medidas foram realizadas em diferentes instantes para cada ponto e em cada disco irradiado (FIGURA 12):

- Instante $t_0= 0s$: temperatura da amostra antes de iniciarmos a irradiação laser;
- Instante $t_1= 5s$: temperatura da superfície naquele determinado ponto, 5 segundos após o início da irradiação laser;
- Instante $t_2= 9s$: temperatura da superfície naquele determinado ponto, 9 segundos após o início da irradiação;
- Instante $t_3= 13s$: temperatura da superfície naquele ponto, 13 segundos após o início da irradiação;
- Instante $t_4=$ variável: intervalo de tempo desde o início da irradiação até que a temperatura crítica ($47^\circ C$) fosse atingida no ponto B de cada disco.
- Instante $t_5=$ variável: tempo transcorrido desde o final da irradiação até que a temperatura da superfície no ponto B atingisse, por resfriamento espontâneo, $37^\circ C$, temperatura corpórea média normal.

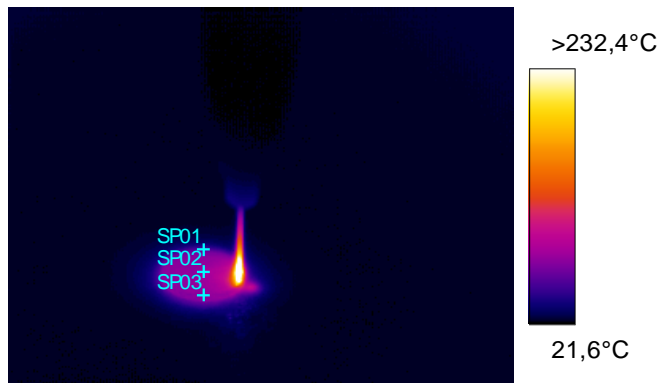


Figura 12 - Imagem termográfica representativa ilustrando os pontos de aferição de temperatura na superfície do disco de titânio. Os pontos SP01, SP02 e SP03 correspondem, respectivamente, aos pontos A, B e C.

Após a tabulação dos valores absolutos de temperatura obtidos, foi calculada, para cada ponto, a variação de temperatura (ΔT), que consiste na diferença entre a temperatura final aferida no instante t_1 , t_2 ou t_3 e a temperatura inicial medida no instante t_0 . Além disso, também foi avaliado o intervalo de tempo necessário para que o ponto B (mais central) de cada amostra resfriasse até 37°C .

Observou-se ainda o intervalo de tempo, em segundos, necessário para que a temperatura crítica de 47°C fosse atingida no ponto B, mais central de cada amostra.

4.1.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. Para cada conjunto de dados foi inicialmente testada a normalidade e homogeneidade de variâncias, com o propósito de selecionar o teste estatístico mais apropriado. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA considerando-se $p < 0,05$.

4.2. II: ANÁLISE DO PADRÃO MORFOLÓGICO DOS DISCOS DE TITÂNIO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E RUGOSÍMETRO

Para a obtenção das imagens e análise morfológica das superfícies dos discos de titânio o equipamento de escolha foi o microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo TM 3000 Tabletop Microscope (Hitachi HTA Inc., EUA – FIGURA 13).



Figura 13 - TM 3000 Tabletop Microscope (Hitachi)

Considerando-se as características do equipamento e a natureza metálica das amostras, vale ressaltar que não houve a necessidade de nenhuma preparação prévia das mesmas antes da varredura das imagens. O regime de operação foi ajustado para 15 kV visando obtenção de imagens com melhor resolução.

Cada disco de titânio foi posicionado separadamente em um *stub* (porta-amostra) próprio do TM 3000 Tabletop com o auxílio de uma fita adesiva para evitar deslocamento do disco durante o estabelecimento de vácuo relativo na câmara, o que poderia prejudicar a aquisição das imagens (FIGURA 14).

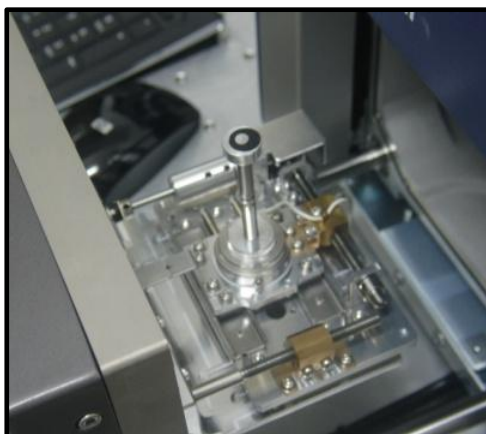


Figura 14 - Stub com disco de titânio posicionado sobre fita adesiva antes da análise microscópica.

Para essa fase do experimento foram selecionados aleatoriamente três exemplares de cada um dos grupos de amostras irradiadas e os três discos do grupo controle.

Conforme ilustração da figura 15, as imagens para a caracterização morfológica foram obtidas em três pontos.

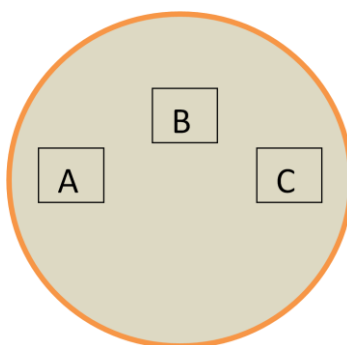


Figura 15 - Diagrama representativo dos pontos onde foram obtidas as imagens em cada amostra.

Os pontos A e C guardam entre si uma relação contralateral e se encontram a aproximadamente 0,2 mm das bordas. O ponto B, mais centralizado, não pôde coincidir

exatamente com o centro do disco de titânio, pela presença de pequenas alterações estruturais provocadas durante o corte dos discos na indústria.

Em cada um desses pontos registrou-se imagens com as seguintes ampliações: 250X, 500X, 1000X, 1500X, 2000X, 2500X E 3000X.

4.3. III: INATIVAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS DE *Porphyromonas gingivalis* (LPS - PG)

4.3.1. Sensibilização da superfície dos discos de titânio por LPS- PG

Quatro discos de titânio, cujas características foram descritas no item 4.1.1, foram individualmente envoltos em papel alumínio e submetidos ao processo de despirogenização, através de calor seco, permanecendo em estufa a uma temperatura de 250° C por 30 minutos ⁴⁵. Instrumentos auxiliares como pinças, também foram submetidos ao mesmo processo.

As superfícies de 3 (três) desses discos foram sensibilizadas por solução de LPS de *Porphyromonas gingivalis* – LPS-PG (InvivoGen San Diego, CA, EUA), numa concentração de 50 µg/mL¹². Com auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 10 µL desta solução foi depositada sobre a superfície de cada amostra, que foi mantida em repouso até a completa evaporação do diluente aquoso, durante aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, os invólucros de alumínio foram novamente fechados. Uma das amostras (controle negativo) não foi sensibilizada pela solução de LPS-PG e recebeu apenas uma alíquota de 10 µL de água destilada esterilizada, sendo igualmente envolta em papel alumínio. Esses procedimentos

foram realizados no interior da capela de fluxo laminar, previamente limpa e desinfetada.

4.3.2. Irradiação da superfície dos discos de titânio sensibilizados por LPS-PG

Dentre as amostras experimentais sensibilizadas pelo LPS-PG, duas foram irradiadas pelo laser de diodo calibrado para 1,0 W, conforme as condições descritas no item 4.1.2, diferenciando-se o modo de irradiação. Uma das amostras recebeu tratamento laser com a fibra em contato com a sua superfície e outra com a ponta da fibra óptica distando exatos 3,0 mm da mesma, ou seja, modo não contato, conforme experimento termográfico anterior. Um dos discos sensibilizados com a solução de LPS não recebeu irradiação laser (controle positivo) e outro não recebeu irradiação laser nem sensibilização com LPS-PG (controle negativo).

4.3.3. Detecção dos níveis de LPS-PG pelo teste de Limulus

A concentração residual de LPS ativo nas superfícies dos discos foi avaliada pelo Teste de Limulus, nas dependências do laboratório da Empresa Lonza do Brasil Especialidades Químicas. Os 4 (quatro) discos considerados neste ensaio piloto (controle negativo, controle positivo, 1W contato e 1W não contato) foram inicialmente submersos em água bi-deionizada e estéril para extração das moléculas de lipopolissacarídeos. Os frascos foram agitados durante 5 minutos em equipamento apropriado e a solução obtida foi então diluída na proporção de 1:10, tendo a temperatura monitorada e controlada a 37°C. Em seguida procedeu-se à Reação de

Limulus através de solução contendo, além dos reagentes específicos, substâncias tamponadoras para controle de pH. Os frascos foram então agitados durante 2 minutos e dispostos em outro equipamento, onde se aguardou cerca de 30 minutos para que a reação de geleificação ocorresse e a leitura da concentração residual de LPS-PG pudesse ser feita ⁴⁵.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA

A TABELA 2 apresenta três aspectos importantes relacionados à irradiação com o *laser* de diodo no experimento: (a) tempo médio necessário para que o limiar crítico de temperatura seja atingido no ponto B da amostra; (b) médias de valores máximos de temperatura absoluta atingidas no ponto B durante os procedimentos de irradiação em todos os grupos experimentais e (c) os respectivos tempos médios de resfriamento após a finalização da irradiação laser.

TABELA 2 - Medidas de temperatura no ponto B em função do tempo (termos absolutos)

	Tempo para se atingir temperatura crítica (47°C) em segundos	Temperatura mais elevada no ponto B em valores absolutos (°C)	Tempo médio de resfriamento até 37°C em segundos
Não Contato 1W	5,0	64,16	2,94
Não Contato 2W	4,0	107,08	11,26
Não Contato 3W	1,7	160,18	12,24
Contato 1W	3,0	82,58	6,73
Contato 2W	2,7	117,38	7,08
Contato 3W	1,0	181,04	11,78

A comparação entre os tempos médios de resfriamento de todas as amostras do experimento mostrou não haver diferença estatisticamente significativa tanto entre os grupos do modo contato e não contato na potência de 1W quanto para esses mesmos grupos na potência de 2W e de 3W (Kruskal Wallis, $p < 0.05$).

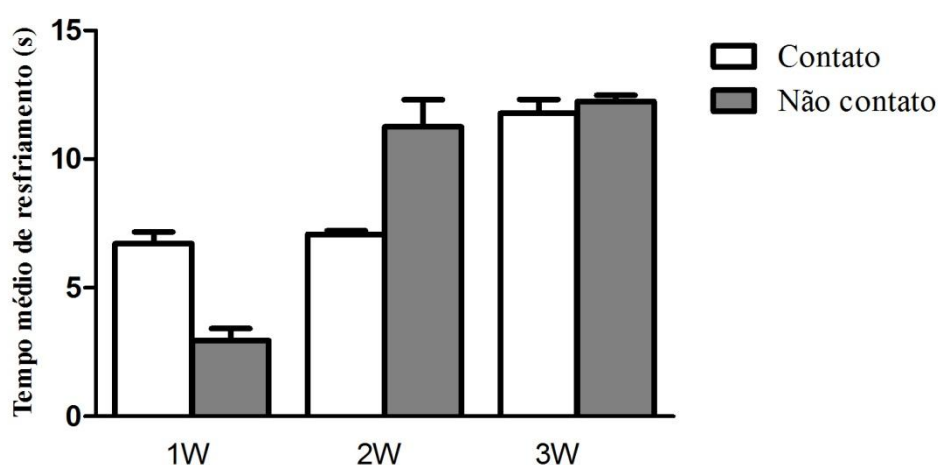


Figura 16 - Gráfico evidenciando o tempo médio de resfriamento até 37° C das amostras de todos os grupos com os respectivos valores de desvio-padrão.

A irradiação da superfície dos discos de titânio no modo não contato promoveu incrementos de temperatura médios menores que aqueles promovidos pelo modo contato. Isso foi válido na comparação entre os grupos de todos os valores de potência utilizados no estudo (1W, 2W e 3W) e em todos os pontos (A, B e C). Os resultados das variações médias de temperatura e seus respectivos desvios-padrão são evidenciados nos gráficos constantes nas FIGURAS 17, 18 e 19.

As variações de temperatura (ΔT) sofridas pelas amostras de todos os grupos, tanto para o modo não contato quanto para o modo contato, aumentaram gradativamente à medida que se aumentou os valores de potência, apresentando diferenças consideráveis.

Isolando-se os pontos A, B e C ao longo do tempo, a variação de temperatura foi significativamente maior após 5 segundos de irradiação, em praticamente todos os grupos, especialmente nos pontos B e C (FIGURAS 17, 18 e 19).

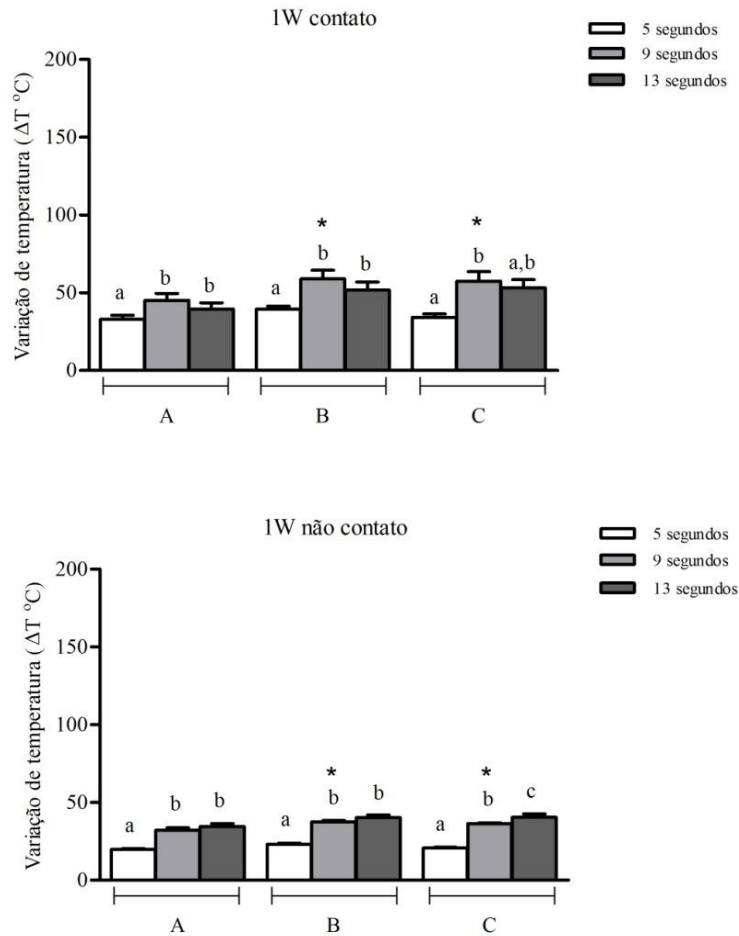


Figura 17 - Variações médias de temperatura, considerando diferentes intervalos de tempo, durante a irradiação dos discos pelo modo contato e não contato com 1W de potência. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas intragrupos (ANOVA, $p < 0,05$) e asteriscos indicam diferenças entre grupos (Kruskal – Wallis, $p < 0,05$).

Considerando-se a potência de 1W e fazendo-se uma análise inter-grupos, pode-se dizer que as variações de temperatura foram maiores no modo contato com diferença estatisticamente significativa apenas no instante $t_2 = 9s$ e para os pontos B e C.

Numa análise intra-grupo para 1W e no modo não contato, verifica-se diferença estatisticamente significante nos incrementos de temperatura apenas entre 5 e 9 segundos ou entre 5 e 13 segundos para os pontos A, B e C. Avaliando-se a temperatura entre 9 e 13 segundos só existe diferença estatística considerável no ponto C.

Já em relação ao grupo 1W e modo contato, observa-se diferença estatisticamente significativa nos incrementos de temperatura apenas entre 5 e 9 segundos nos pontos A, B e C. Entre 9 e 13 segundos não há diferença estatística considerável para nenhum dos pontos (FIGURA 17).

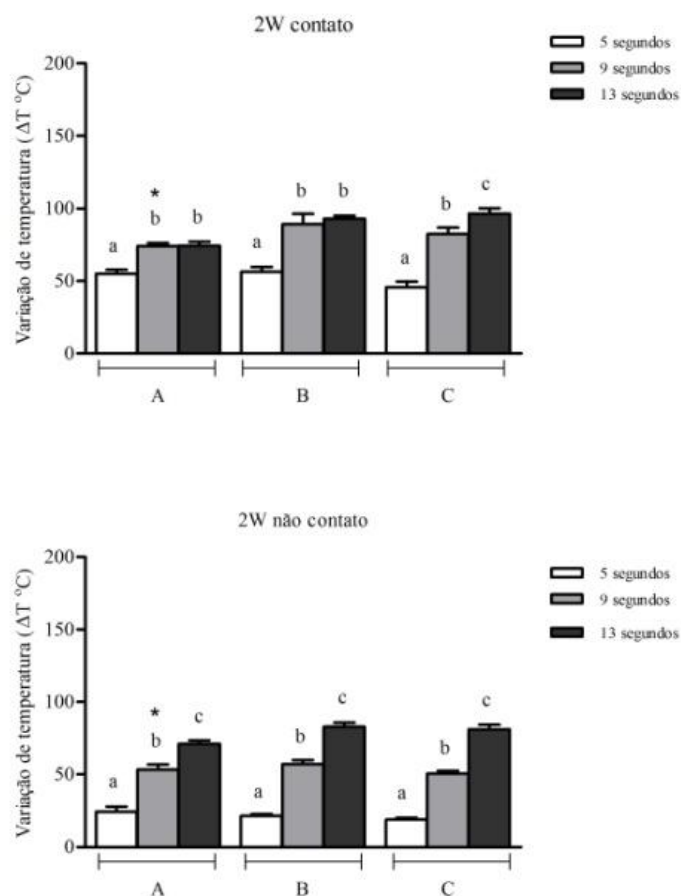


Figura 18 - Variações médias de temperatura, considerando diferentes intervalos de tempo, durante a irradiação dos discos pelo modo contato e não contato com 2W de potência. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas intragrupos (ANOVA, $p < 0,05$) e asteriscos indicam diferenças entre grupos (Kruskal – Wallis, $p < 0,05$).

Sob a potência de 2W, as variações de temperatura também foram maiores no modo contato em detrimento ao modo não contato, mas com diferença estatisticamente significativa apenas no ponto A e instante $t_2 = 9s$ (FIGURA 18).

Para o grupo 2W e modo não contato, verifica-se diferença significativa nos incrementos de temperatura entre 5 e 9 segundos, entre 5 e 13 segundos e entre 9 e 13 segundos para todos os pontos (A, B e C).

Já em relação ao grupo 2W e modo contato, observa-se diferença estatisticamente significativa nos incrementos de temperatura apenas entre 5 e 9 segundos e entre 5 e 13 segundos nos pontos A, B e C. Entre 9 e 13 segundos há diferença estatística considerável apenas no ponto C (FIGURA 18).

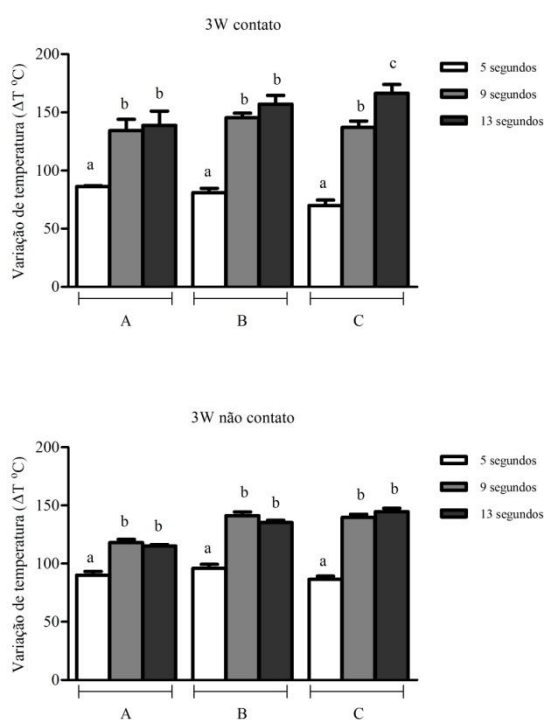


Figura 19 - Variações médias de temperatura, considerando diferentes intervalos de tempo, durante a irradiação dos discos pelo modo contato e não contato com 3W de potência. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas intragrupos (ANOVA, p<0,05).

Para a potência de 3W os incrementos de temperatura foram maiores no modo contato do que no modo não contato.

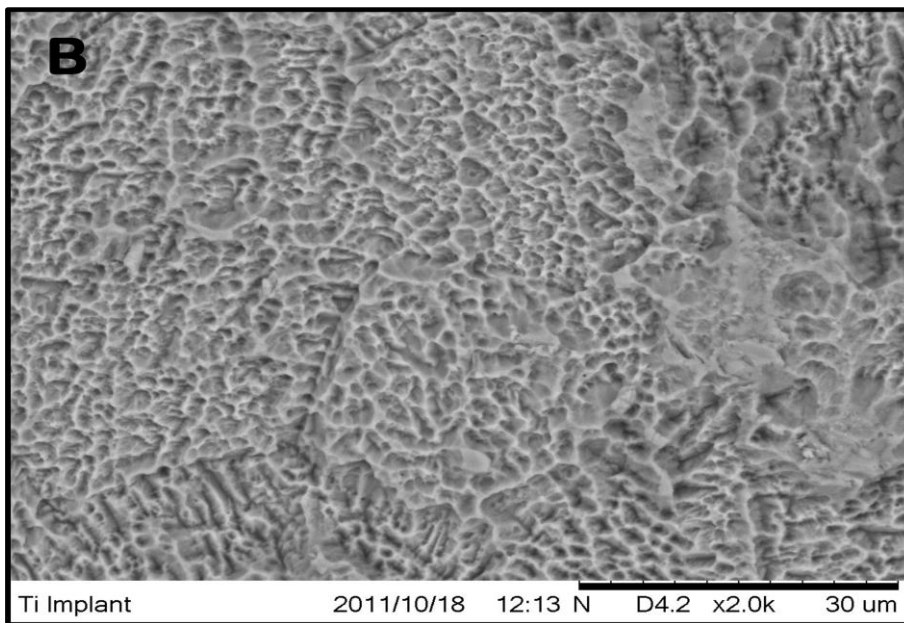
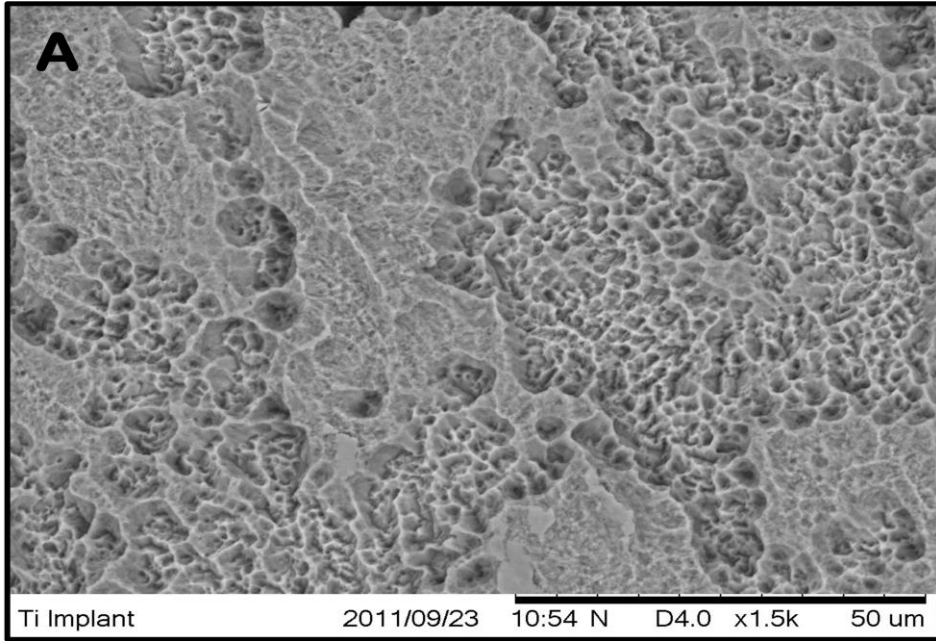
Para o grupo 3W e modo não contato, verifica-se diferença estatisticamente significativa nos incrementos de temperatura entre 5 e 9 segundos e também entre 5 e 13

segundos para todos os pontos (A, B e C). Entre 9 e 13 segundos não ocorre diferença estatística considerável em nenhum dos pontos.

Em relação ao grupo 3W e modo contato observa-se diferença estatisticamente significativa nos incrementos de temperatura entre 5 e 9 segundos e também entre 5 e 13 segundos para todos os pontos (A, B e C). Entre 9 e 13 segundos há diferença estatística considerável apenas no ponto C (FIGURA 19).

5.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DOS DISCOS DE TITÂNIO POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A técnica subtrativa com duplo ataque ácido usada pelo fabricante produz um padrão de rugosidade bastante irregular na superfície do disco de titânio. As eletromicrografias apresentadas foram obtidas de faces não irradiadas de discos de titânio (amostras controle) com diferentes magnificações (FIGURA 20 - A, B e C). Nota-se a presença de micro rugosidades típicas desse tipo de tratamento com minúsculos poros, ora bastante irregulares, ora com formato circular ou elíptico. Áreas sem tratamento ácido ou defeitos estruturais tais como trincas não foram detectadas.



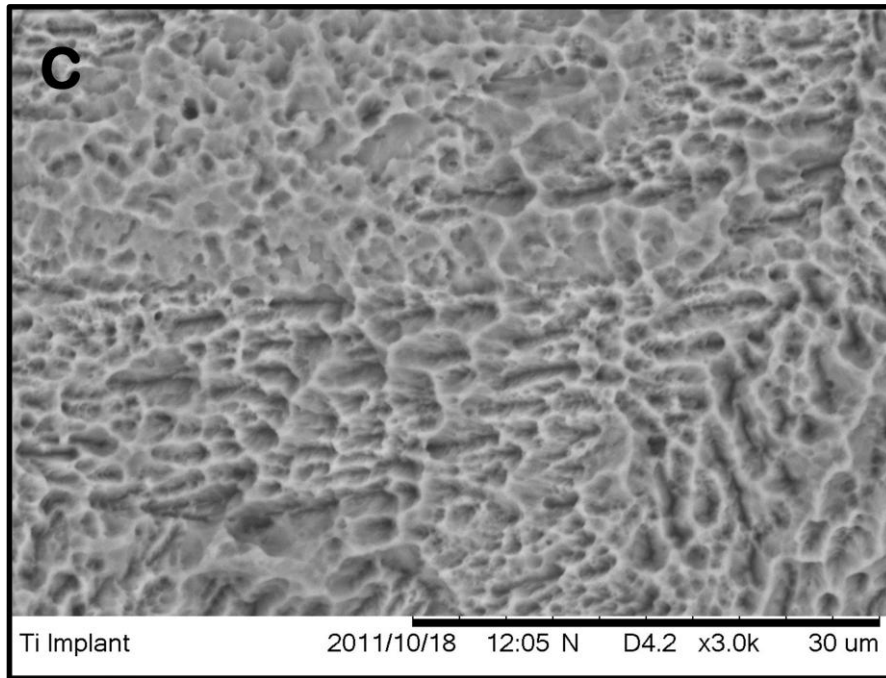
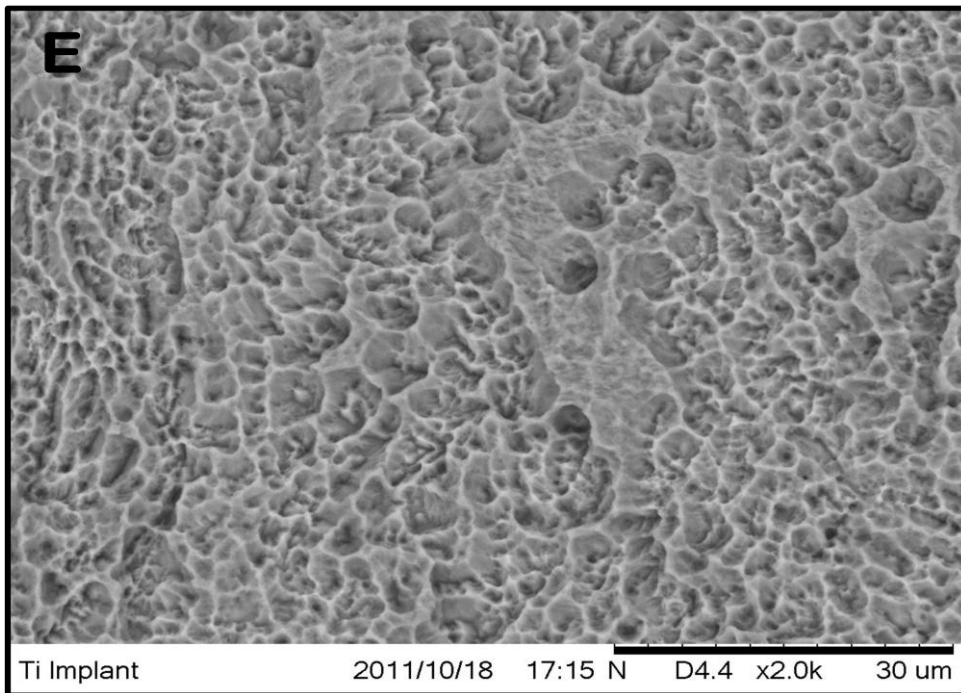
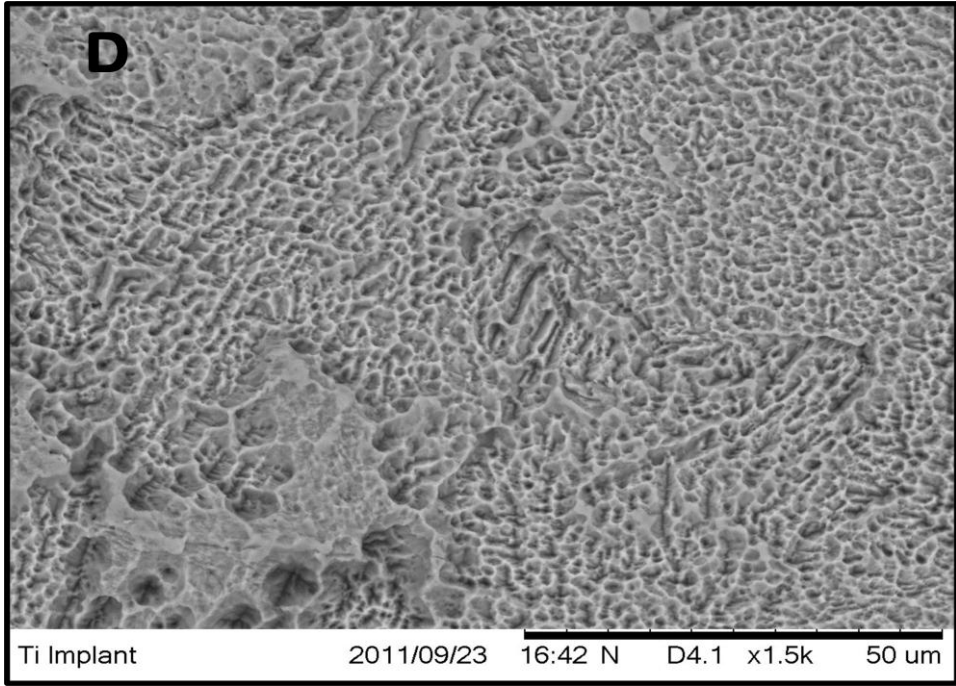


Figura 20 - Eletromicrografias representativas de amostras controle de discos de titânio antes da irradiação com *laser* de diodo. Magnificações: A= 1500X; B = 2000X e C= 3000X. Note-se a presença de micro-rugosidades características do tratamento de superfície por duplo ataque ácido.

As imagens obtidas a partir do microscópio eletrônico de varredura (MEV) evidenciaram que o padrão morfológico de rugosidade da superfície dos discos foi mantido após a irradiação. Eletromicrografias de discos irradiados no modo **não** contato com 1W, 2W e 3W não evidenciaram quaisquer alterações estruturais tais como áreas de fusão, perda de porosidade, microfraturas ou alterações crateriformes. O mesmo pode ser dito em relação às amostras irradiadas no modo contato com 1W, 2W e 3W (FIGURAS 21 – D, E e F)



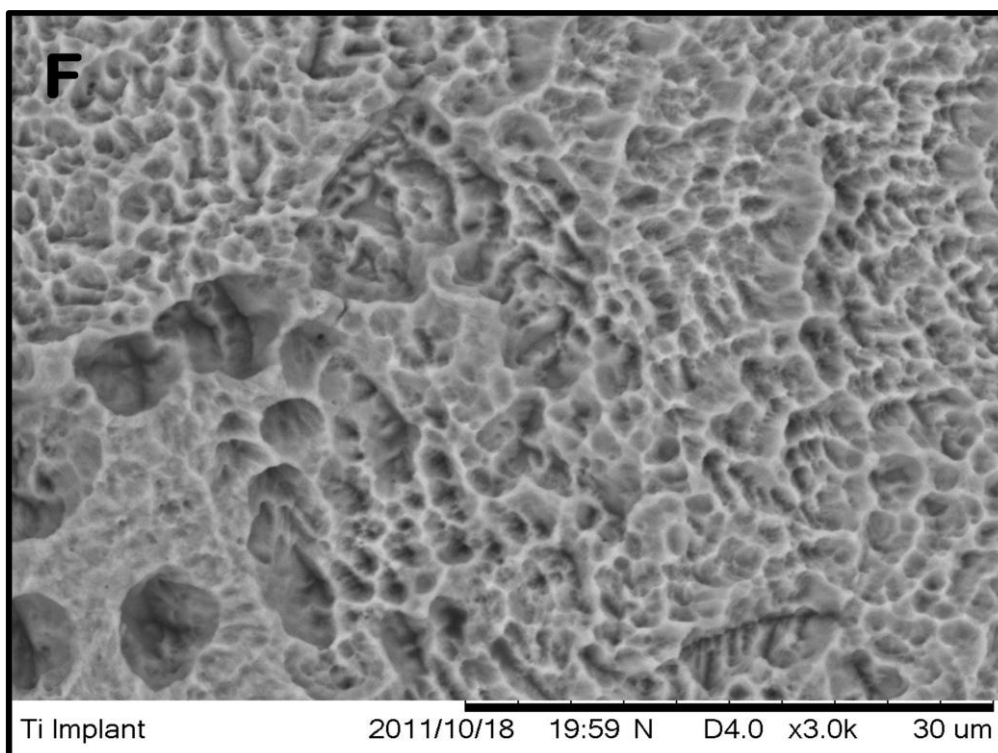


Figura 21 - Eletromicrografias representativas de amostras irradiadas com *laser* de diodo em diferentes potências. D = 2W, modo não contato e magnificação de 1500X. E = 1W, modo contato e magnificação de 2000X. F = 3W, modo contato e magnificação de 3000X. Note-se a presença das mesmas micro-rugosidades características das amostras controle indicando que não houve áreas de fusão ou trincas.

5.3. INATIVAÇÃO DE LIPOPOLISSACÁRIDES (LPS)

Os testes para detecção de resíduos ou moléculas íntegras de LPS após a irradiação laser foram realizados em diluições de 1:10 das soluções obtidas a partir da imersão dos discos em água destilada e bi-deionizada.

A concentração da solução obtida a partir da amostra que não foi sensibilizada pelo LPS-PG apresentou valor nulo conforme esperado. A solução da amostra considerada controle positivo, isto é, disco sensibilizado com solução de LPS-PG, mas não irradiada com *laser* de diodo teve concentração de 4,52 EU/mL (EU = unidades de endotoxina). O disco irradiado com o regime de 1W e modo não contato apresentou

redução na concentração de LPS-PG para 3,79 EU/mL e a amostra irradiada pelo modo contato e regime de 1W sofreu redução da concentração para 3,41 EU/mL (TABELA 3).

TABELA 3 - Concentrações das soluções em unidades de endotoxina por mililitro, antes e depois da irradiação.

MODO DE IRRADIAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE LPS
Não sensibilizado	0,0 EU/mL
Sensibilizado / Não Irrradiado 1W	4,52 EU/mL
Não contato 1W	3,79 EU/mL
Contato 1W	3,41 EU/mL

6. DISCUSSÃO

Há uma janela terapêutica nos tecidos biológicos em que a absorção de luz é mínima e a transmissão é máxima, o que evita superaquecimento e injúrias. Esta janela se encontra entre o vermelho e o infravermelho próximo, aproximadamente entre 800 e 1200 nm^{38,46}. Por isso a escolha de *lasers* emitindo em comprimentos de onda próximos a essa faixa na maioria dos trabalhos encontrados na literatura e a seleção de um equipamento emitindo em 830 nm para a realização desse estudo.

Feixes de luz no infravermelho próximo são primariamente absorvidos por tecidos com alto teor de hemoglobina e componentes celulares com pigmentos escuros como encontrados em importantes patógenos periodontais. Com o incremento na

absorção, maior quantidade de energia laser é convertida em calor, resultando em maior morte celular¹⁵. A utilização do *laser* de diodo em regime de alta potência como parte integrante do tratamento da periimplantite se justifica pela capacidade do mesmo em gerar esse efeito térmico que deve também ser suficiente para promover desestruturação e consequente inativação de moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) produzidas por algumas bactérias^{4,15,16}. O desafio está em se encontrar parâmetros físicos (densidade de potência e energia) adequados à geração de calor suficiente para redução da carga bacteriana e seus subprodutos sem, contudo lesionar o osso e tecidos moles periimplantares⁴.

Apesar de comprimentos de onda na faixa de 800 nm serem melhor absorvidos pelo titânio que outros como Nd:YAG (1064 nm), Ho:YAG (2100 nm), Er:YAG (2940 nm) e CO₂ (10600 nm), o laser de diodo é o único que, independentemente da potência utilizada, não é capaz de provocar danos alterando as características morfológicas da superfície de titânio dos implantes¹⁵.

Moritz *et al.* examinaram o efeito bactericida da terapia com *laser* de diodo emitindo em 805nm e a sua capacidade de controle do processo inflamatório a longo prazo encontrado dados consistentes de sua eficácia⁴². A aplicação de *laser* de diodo no comprimento de onda 809 nm teve efeito letal sobre bactérias anaeróbias gram negativas encontradas em sítios de periimplantite, mas o que determina a potência e o tempo de irradiação eficiente é o tipo de cobertura da superfície do implante, porque o coeficiente de absorção da luz é sempre diferente para cada tipo⁴⁴.

Superfícies de titânio com diferentes tipos de tratamento (usinada, deposição de microcristais de hidroxiapatita, subtração por ataque ácido ou spray de plasma de titânio) absorvem os diversos comprimentos de onda dos *lasers* de modos distintos e a quantidade de calor gerada pode ser bem diferente. Portanto deve haver certo cuidado

ao se avaliar relatos na literatura acerca dos incrementos de temperatura nas superfícies dos implantes⁴³. Determinado estudo com *laser* de Er: YAG mostrou que as elevações de temperatura foram significativamente maiores nos implantes cujas superfícies apresentavam revestimento de hidroxiapatita em detrimento àqueles cujas superfícies eram de titânio ($p < 0.01$). Isso possivelmente se deveu ao fato da hidroxiapatita apresentar maior grau de absorção para o comprimento de onda emitido pelo laser de Er:YAG (2940 nm)⁴⁰.

Até o início da década de 1980 acreditava-se que a temperatura crítica para injúrias ao tecido ósseo seria em torno de 56°C porque a fosfatase alcalina se desnatura nesse nível. Porém, estudos posteriores comprovaram, através de modelos envolvendo coelhos, que o aquecimento dos tecidos a uma temperatura de 50° C por um minuto induz sinais de injúria vascular, enquanto que a elevação à 60°C provoca cessação permanente do fluxo sanguíneo e necrose do osso⁴⁷. Elevações de temperatura a 47°C durante um minuto resultam em danos às células adiposas, mas não provocam injúrias às células ósseas⁴⁸. Portanto, o incremento de 10°C parece ser o limiar crítico para comprometimento da vitalidade do tecido ósseo e a manutenção de temperaturas entre 47 e 50 °C por mais de 60 segundos pode levar a injúrias irreversíveis^{36,43,47,48}.

Para realização do presente estudo padronizou-se o tempo de 10 segundos de irradiação efetiva das superfícies de titânio com *laser* de diodo. Esse limite foi estabelecido com base em trabalhos onde se demonstrou que em 10 a 12 segundos de irradiação no modo contínuo o valor de 47°C pode ser atingido¹⁵.

A irradiação contínua das amostras de titânio permitiu que a temperatura atingisse o limiar crítico entre 1 e 5 segundos, dependendo do regime de potência e do modo de aplicação (contato ou não contato). As temperaturas máximas na superfície foram muito superiores ao limiar crítico, atingindo valores médios entre 64 e 181°C.

Entretanto, os tempos de resfriamento após a cessação do uso do laser foram muito curtos variando de 12 a 2,94 segundos. Considerando-se o tempo de irradiação de 10 segundos e os tempos de resfriamento espontâneo das amostras, pode-se aferir que os valores se mantiveram acima de níveis críticos por, no máximo, 22 segundos.

É importante considerarmos que estudos *in vitro* apresentam algumas limitações e os resultados têm que ser interpretados com cautela. A geração de calor provocada pela irradiação laser, e a sua difusão em discos de titânio sem contato com osso, pode ser bem diferente daquela encontrada em implantes osteointegrados. Parte da energia interage com o titânio e parte com os tecidos circunjacentes^{43,44}. Determinados autores realizaram estudo com implantes comerciais inseridos em material sintético apresentando difusividade térmica similar à do osso. Os implantes foram irradiados com *laser* de diodo operando em 810 nm e na interface implante/material sintético a temperatura crítica de 47°C só foi atingida após 14 segundos de irradiação no modo contínuo e potência de 2W⁴³. Como no presente estudo a irradiação efetiva foi de apenas 10 segundos, caso os discos estivessem inseridos em tecido ósseo ou material sintético similar, poder-se-ia inferir que o limiar crítico de temperatura não seria atingido na interface implante/tecido circunjacente.

Esses dados são importantes porque numa situação clínica, grandes quantidades de calor geradas em curtos intervalos de tempo, permitiriam a eliminação de bactérias e suas endotoxinas sem que houvesse dissipação acentuada de energia para os tecidos adjacentes^{15, 10}.

Durante o experimento, a superfície do disco de titânio absorve gradativamente os fótons emitidos pelo laser e os converte em calor, o que leva a um aumento gradual da temperatura superficial. Os dados captados pela câmera termográfica ao longo do tempo em cada ponto (A, B e C) da amostra confirmaram essa tendência de acúmulo de

calor, já que houve diferença estatisticamente significativa de temperatura entre os instantes 5 e 9 segundos e entre 9 e 13 segundos de irradiação em praticamente todas as análises intragrupos.

A potência de um laser pode ser conceituada como o número de fótons emitidos por segundo. Se a potência aplicada em determinado experimento foi maior, houve maior taxa de transferência de fótons e, conseqüentemente, maiores incrementos de temperatura em função do tempo para aquelas amostras. À medida que se aumentou os valores de potência do laser, tanto no modo contato quanto não contato, houve aumento das temperaturas médias nas amostras de titânio.

As densidades de potência (TABELA 1) foram consideravelmente maiores para os grupos irradiados no modo contato em detrimento ao modo não contato. A transferência de calor foi mais intensa e as temperaturas médias aferidas foram mais elevadas para os grupos do modo contato, o que pode ser explicado pelo aumento do coeficiente de absorção do titânio à medida que se aumenta a temperatura do objeto em estudo. Porém, houve diferença estatisticamente significativa apenas nas comparações de alguns pontos e os incrementos foram maiores para a potência de 1W.

Inúmeros são os protocolos de utilização de lasers para descontaminação da superfície de implantes dentários de titânio sugeridos na literatura, mas a possibilidade de alterações estruturais nas superfícies dos mesmos capazes de impedir a reinserção do tecido epitelial e ósseo sempre foi motivo de grandes preocupações entre os clínicos e pesquisadores³⁶.

As análises microscópicas (MEV) não evidenciaram quaisquer alterações qualitativas tais como áreas de fusão, perda de porosidade, micro fraturas ou alterações crateriformes nas superfícies dos discos após a irradiação com *laser* de diodo quando comparadas àquelas do grupo controle, o que é compatível com os relatos de inúmeros

autores^{17,36}. Esse resultado era absolutamente esperado já que a temperatura de fusão do titânio gira em torno de 1668 °C, e mesmo as temperaturas mais altas aferidas no grupo com regime de maior potência (3W) foram inferiores a 200 °C⁴⁹.

Um estudo *in vitro* procurou avaliar o efeito inibitório do *laser* de CO₂, em regime de baixa potência, na proliferação de bactérias envolvidas na etiopatogenia da periimplantite (*P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*) e a eficácia na inativação de lipopolissacarídeos (LPS) produzidos pelas mesmas. Os autores concluíram que esse *laser* provocou redução bacteriana e inativação de LPS de forma estatisticamente significativa¹⁴.

O presente estudo piloto foi conduzido com uma amostra muito restrita, o que impossibilita a elaboração de uma avaliação estatística consistente para determinar a efetividade do sistema na neutralização das moléculas de LPS. Porém, houve redução nas concentrações após a irradiação *laser* quando comparadas ao controle não irradiado, o que sinaliza possibilidade do calor gerado pelo *laser* de diodo na superfície de titânio ter inativado parte das mesmas.

A complementação do trabalho será realizada com uma amostragem mais significativa, distribuída em grupos com aplicação de todos os valores de potência anteriormente testados, para se averiguar a capacidade do sistema em neutralizar os lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por *Porphyromonas gingivalis*.

7. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos com o presente estudo *in vitro* parece lícito concluir que:

(I) A oscilação de temperatura aferida na superfície de titânio quando irradiada no modo contínuo com o *laser* de diodo (GaAlAs) nas potências de 1W, 2W ou 3W, modo contato e não contato, e num intervalo de tempo de 10 segundos, parece estar dentro do limite de segurança biológica;

(II) A geração de calor pela irradiação durante 10 segundos, no modo contínuo, sob potência de 1W, 2W ou 3W, quer no modo contato ou não contato, não foi suficiente para promover alterações morfológicas na superfície de titânio;

(III) Pelo restrito número de amostras utilizadas no estudo piloto, não se pode afirmar que o *laser* de diodo no modo contínuo, sob potência de 1W, tenha eficácia na inativação *in vitro* de lipopolissacarídeos (LPS).

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Faz-se necessário a complementação desse estudo *in vitro* incluindo valores de potência mais elevados (2W e 3W) e maior número de amostras para se determinar a real eficácia dos parâmetros levantados na inativação do LPS.

Estudos mais detalhados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e com outras metodologias devem realizados para se averiguar se os fragmentos residuais das moléculas LPS ainda poderiam ativar a cascata de eventos inflamatórios que culminam com a destruição do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBREKTSSON T, SENNERBY L, WENNERBERG A. State of the art of oral implants. **Periodontol** 2000 2008;47:15-26.
2. BECKER W, BECKER BE, NEWMAN MG, NYMAN S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1990;5:31-38.
3. ARMITAGE GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**.4(1):1-6, 1999.
4. GOKHALE, S.; PADHYE, A.; SUMANTH, S. Bactericidal effect of Nd:YAG Laser in an *in vitro* Tissue Model – A Light Microscopic Evaluation. **J Oral Laser Applications** 2010;10: 17-22.
5. ABU-AMER Y, ROSS FP, EDWARDS J, TEITELBAUM SL. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. **J Clin Invest** 1997;100:1557-1565.
6. SUDA K, WOO JT, TAKAMI M, SEXTON PM, NAGAI K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1, and RANKL. **J Cell Physiol** 2002;190:101-108.
7. MÖRMANN M, THEDERAN M, NACKCHBANDI I, GIESE T, WAGNER C, HA`NSCH GM. Lipopolysaccharides (LPS) induce the differentiation of human monocytes to osteoclasts in a tumour necrosis factor (TNF) alphadependent manner: A link between infection and pathological bone resorption. **Mol Immunol** 2008; 45:3330-3337.
8. ROBERTS HC,MOSELEYR,SLOAN AJ, YOUDE SJ,WADDINGTON RJ. Lipopolysaccharide alters decorin and biglycan synthesis in rat alveolar bone osteoblasts:Consequences for bone repair during periodontal disease. **Eur J Oral Sci** 2008; 116:207-216.
9. LANG, N.P.; BERGLUNDH ,T.; HEITZ-MAYFIELD, L.J; PJETURSSON, B.E.; SALVI, G.E.; SANZ, M. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 19, suppl, p.150-154, 2004.
10. EHRENFEST, D.M. D., COELHO, P. G., KANG, B. S., SUL, Y.T. & ALBREKTSSON, T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. **Trends in Biotechnology** 2010 (28), 198–206.
11. RENVERT S, ROOS-JANSÅKER AM, CLAFFEY N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. **J Clin Periodontol**. 2008 Sep;35(8 Suppl):305-15. Review.
12. GIANNELLI, M.; BANI, D.; TANI, A.; PINI, A.; MARGHERI, M.; ZECCHI-ORLANDINI, S.; TONELLI, P.; FORMIGLI, L. In Vitro Evaluation of the Effects of Low-Intensity Nd:YAG Laser Irradiation on the Inflammatory Reaction Elicited by

- Bacterial Lipopolysaccharide Adherent to Titanium Dental Implants. **J Periodontol** 2009; 80:977-984.
13. YAMAGUCHI H, KOBAYASHI K, OSADA R. Effects of irradiation of an erbium:YAG laser on root surfaces. **J Periodontol** 1997; 68:1151-1155.
 14. KOJIMA T, SHIMADA K, IWASAKI H, ITO K. Inhibitory effects of a super pulsed carbon dioxide laser at low energy density on periodontopathic bacteria and lipopolysaccharide in vitro. **J Periodontol Res** 2005;40: 469-473.
 15. KREISLER M, AL HAJ H, D'HOEDT B. Temperature changes induced by 809-nm GaAlAs laser at the implant-bone interface during simulated surface decontamination. **Clin Oral Implants Res**. 2003 Feb;14(1):91-6.
 16. HAUSER-GERSPACH I, STUBINGER S, MEYER J. Bactericidal effects of different laser systems on bacteria adhered to dental implant surfaces: an in vitro study comparing zirconia to titanium. **Clin. Oral Impl. Res.** 21, 2010; 277–283.
 17. ROMANOS GE, EVERTS H, NENTWIG GH. Effects of diode and Nd:YAG laser irradiation on titanium discs: a scanning electron microscope examination. **J Periodontol** 2000 May; 71(5):810-5.
 18. DINATO, J.C.; POLIDO,W.D. Implantes osseointegrados: **Cirurgia e Prótese**. Pag 516. São Paulo: Artes Medicas, 2004.
 19. WARRER, K; BUSER, D.; LANG, NP. Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys. **Clin Oral Implants Res**, v.6, p.131-138, 1995.
 20. LINDHE, J. BERGLUNDH, T. The interface between the mucosa and the implant. **Periodontology** 2000, Vol, 17, 47-54, 1998.
 21. ÇOMUT, A. A., H. P. WEBER, et al. Connective tissue orientation around dental implants in a canine model. **Clin Oral Implants Res**, v.12, n.5, Oct, p.433-40.2001.
 22. HEITZ-MAYFIELD LJ, LANG NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. **Periodontol** 2000. 2010 Jun;53:167-81. Review.
 23. LANG NP, BERGLUNDH T; Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now? Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**. 2011 Mar;38 Suppl 11:178-81.
 24. SHIBLI JA, MELO L, FERRARI DS, FIGUEIREDO LC, FAVERI M, FERES M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. **Clin Oral Implants Res** 2008; 19: 975–982.
 25. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol** 1998; 25: 134–144.
 26. TABANELLA G, NOWZARI H, SLOTS J. Clinical and microbiological determinants of failing dental implants. **Clin Implant Dent Relat Res** 2009; 11: 24–36.

27. VAN WINKELHOFF AJ, WOLF JW. Actinobacillus actinomycetemcomitans - associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. **J Clin Periodontol** 2000; 27: 531–535.
28. KOTSOVILIS S, KAROUSSIS IK, TRIANTI M, FOURMOUSIS I. Therapy of peri-implantitis: a systematic review. **J Clin Periodontol**. 2008 Jul;35(7):621-9.
29. JAVED, F AL-HEZAIMI, K. SALAMEH, Z.ALMAS, K. ROMANOS, GE. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Cytokine**, (53), p. 8–12, 2011.
30. SEVERINO, V.O. NAPIMOGA, M.H. PEREIRA, A.S.L. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Archives of Oral Biology**, 2011.
31. PEARSON, F. C. **Pyrogens Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation**. New York, NY: Marcel Dekker, p. 3-7, 11-14, 23-44, 89-214, 1985.
32. PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, p. 179-215, 2003.
33. JIANG, Y; MEHTA, CK.; HSU, TY. Bacteria Induce Osteoclastogenesis via an Osteoblast-Independent Pathway. **Infection and Immunity**, June, v. 70, n.6, p. 3143–3148, 2002.
34. BARÃO VA, MATHEW MT, ASSUNÇÃO WG, YUAN JC, WIMMER MA, SUKOTJO C. The role of lipopolysaccharide on the electrochemical behavior of titanium. **J Dent Res**. 2011 May;90(5):613-8.
35. MORALES, R. P. Ensayo del lisado de amebócitos del Limulus (LAL). **Rev. Cub. Farm.** v. 38, n.1, p. 1-1 , 2004.
36. CASTRO GL, GALLAS M, NÚÑEZ IR, BORRAJO JL, ALVAREZ JC, VARELA LG. Scanning electron microscopic analysis of diode laser-treated titanium implant surfaces. **Photomed Laser Surg**. 2007 Apr;25(2):124-8.
37. CLAFFEY N, CLARKE E, POLYZOIS I, RENVERT S: Surgical treatment of peri-implantitis. **J Clin Periodontol** 2008; 35 (Suppl. 8): 316–332.
38. ZECELL, D.M. Interação da Luz Laser. **Apostila do Curso de Mestrado Profissionalizante em Lasers em Odontologia**. IPEN/FOUSP, p. 24-30, 2005.
39. EDUARDO, CARLOS DE PAULA. **Lasers em Odontologia**. Págs. 1-17. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2010.
40. KREISLER M, KOHNEN W, MARINELLO C, GÖTZ H, Duschner H, Jansen B, d’Hoedt B. Bactericidal effect of the Er:YAG laser on dental implants surfaces: an *in vitro* study. **J Periodontol**. 2002;73(11):1292-98.
41. KREILSER, M.; GÖTZ, H.; DUSCHNER, H. Effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂, and GAAIAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 2, p. 202-211, 2002.

42. MORITZ, A., SCHOOP, U., GOHARKHAY, K., SCHAUER, P., DOERTBUDAK, O., WERNISH, J. & SPERR, W. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers in Surgery and Medicine* (1998) 22: 302–311.
43. GEMINIANI A, CATON JG, ROMANOS GE. Temperature change during non-contact diode laser irradiation of implant surfaces. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan 28.
44. KREISLER M, KOHNEN W, MARINELLO C, SCHOOF J, LANGNAU E, JANSEN B, D'HOEDT B. Antimicrobial efficacy of semiconductor laser irradiation on implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Sep-Oct;18(5):706-11.
45. FUKUMORI, NTO. Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação. **Dissertação Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.** IPEN/USP, São Paulo, SP, Brasil,2008.
46. ROMANOS GE, GUTKNECHT N, DIETER S, SCHWARZ F, CRESPI R, SCULEAN A. Laser wavelengths and oral implantology. *Lasers Med Sci.* 2009 Nov;24(6):961-70.
47. ERIKSSON AR, ALBREKTSSON T (1983). Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* 50:101–107.
48. ERIKSSON RA, ALBREKTSSON T (1984). The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in the rabbit using the bone growth chamber. *J Oral Maxillofac Surg* 42:705–711.
49. LIU, X.; CHU, P.; DING, C. Surface modification of titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Material Sci Engen*, v. 47, p. 49-121, 2004.
50. MOON I-S, BERGLUNDH T, ABRAHAMSSON I, LINDER E, LINDHE J: The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 658–663.
51. STUBINGER S, ETTER C, MISKIEWICZ M, HOMANN F, SALDAMLI B, WIELAND M, SADER R. Surface alterations of polished and sandblasted and acid-etched titanium implants after Er:YAG, carbon dioxide, and diode laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010 Jan-Feb;25(1):104-11.