

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

CARLA FAUSTINO FUZARO

ESTUDO DE LASERTERAPIAS SOBRE A SUPERFÍCIE DE IMPLANTES
DENTÁRIOS DE TITÂNIO E SUA INFLUÊNCIA NA ADESÃO CELULAR

São Bernardo do Campo - SP
2019

CARLA FAUSTINO FUZARO

ESTUDO DE LASERTERAPIAS SOBRE A SUPERFÍCIE DE IMPLANTES
DENTÁRIOS DE TITÂNIO E SUA INFLUÊNCIA NA ADESÃO CELULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Aparecida da Ana

Co-orientadora: Profa. Dra. Christiane Bertachini Lombello

São Bernardo do Campo - SP

2019

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fuzaro, Carla Faustino
ESTUDO DE LASERTERAPIAS SOBRE A SUPERFÍCIE DE IMPLAN
DENTÁRIOS DE TITÂNIO E SUA INFLUÊNCIA NA ADESÃO CELULAR
Carla Faustino Fuzaro. — 2019.

81 fls.

Orientadora: Patricia da Ana

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, São
Bernardo do Campo, 2019.

1. Implante Odontológico. 2. Laserterapias. 3. Laser Diodo.
4. Adesão Celular. 5. Terapia Fotodinâmica. I. da Ana,
Patricia. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Biomédica. 2019. III. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do(a) autor(a) e com a anuência do(a) orientador(a).

Santo André/SP 04 de fevereiro de 2020

Assinatura do(a) autor(a):

Confaustino

Assinatura do(a) orientador(a):

Salvatore



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP
CEP 09210-580 - Fone: (11) 4996-0017
ppgebm@ufabc.edu.br

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carla Nascimento Faustino, realizada em 12 de março de 2019:

Prof.(a) Dr.(a) **Patricia Aparecida da Ana** (Universidade Federal do ABC) – Presidente

Prof.(a) Dr.(a) **Christiane Ribeiro** (Universidade Federal do ABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Ana Paula Romani** (Universidade Federal do ABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Ilka Tiemy Kato** (Universidade Federal do ABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Frederico Augusto Pires Fernandes** (Universidade Federal do ABC) – Membro Suplente



AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, Eliane, Carlos, Juliana, Jacqueline, Giovanni, Catharina e Luisa pelo imenso suporte e por entenderem as noites e dias os quais tive de deixá-los para me aplicar aos estudos, sem vocês nada disso teria sentido, fica aqui meu MUITO OBRIGADA!

Gostaria de agradecer imensamente a meu noivo e parceiro, Caio, o qual me ajudou e ajuda muito sempre que precisei me ausentar ou até mesmo de uma força nos momentos em que achei que não daria conta, muito obrigada!

Gostaria de agradecer imensamente à minha Professora e orientadora Prof. Dra. Patrícia Aparecida da Ana, sem você não chegaria até aqui, muito obrigada pelo incentivo e pelos puxões de orelha sempre muito adequados e no momento certo para as minhas decisões! Seu grande conhecimento alinhado à sua paciência me fizeram caminhar até aqui!

Não obstante gostaria de agradecer muito à minha co-orientadora Christiane Bertachini Lombelo, MESTRA sem seus conhecimentos, paciência e dedicação eu jamais concluiria esta etapa, você e a Patricia foram essenciais nesta jornada, muito obrigada por toda a paciência e apoio sempre que precisei, tenho grande admiração à sua forma de trabalhar!

Fica aqui meu agradecimento também aos meus colegas de trabalho, colegas de graduação e de mestrado sendo eles alunos e professores os quais incontáveis vezes me fizeram acreditar em meu potencial, em especial à Prof. Juliana Daguano, o aluno Marcelo Lima e a aluna Debora Carajiliascov que me deram grande apoio e ajuda nos experimentos.

Gostaria de agradecer as agências de fomento à pesquisa ao CNPq (INCT # 465763/2014-6 – Photonics National Institute– INFO) e à CAPES-PROCAD edital 071/2013- 88881.068505/2014-01.

Agradeço também às Centrais Multiusuário da UFABC pela disponibilização de equipamentos essenciais a este estudo.

E por último e não menos importante agradeço a DEUS, sem ele não somos nada, muito obrigada por me capacitar e me dar forças para seguir atrás de meus objetivos, o senhor sempre soube do meu caminho e continuo entregando-o a ti!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**“Nenhum homem realmente produtivo pensa
como se estivesse escrevendo uma dissertação”.**

Albert Einstein

RESUMO

A periimplantite é um processo inflamatório destrutivo que pode levar à perda do implante e à perda óssea. Esta patologia possui diferentes vertentes de tratamento e, dentre estas, pode-se ressaltar a laserterapia com laser de Diodo de alta potência e a terapia fotodinâmica. Embora sejam aplicadas clinicamente, pouco se conhece sobre os efeitos das mesmas na superfície de implantes dentários, tampouco sobre a influência na adesão celular pré-osteoblástica. Desta forma, este estudo objetivou avaliar os efeitos térmicos, de rugosidade, molhabilidade e de adesão celular promovidos pela laserterapia com laser de diodo de alta potência e pela terapia fotodinâmica (PDT). Para tal, este estudo foi dividido em três fases experimentais. Na primeira, foram avaliadas as elevações de temperatura promovidas por um laser de Diodo de alta potência ($\lambda=808$ nm) de emissão contínua e pulsada (20 Hz) durante a irradiação de um defeito ósseo periimplantar. Na segunda fase experimental, discos de titânio grau IV foram submetidos a diferentes tratamentos: G1 - Raspagem mecânica e posterior irrigação com clorexidina 2% (controle positivo); G2 – PDT com azul de metileno 0,01% e laser vermelho de baixa potência ($\lambda=660$ nm); G3 - Laser de Diodo de alta potência sob emissão contínua; G4 - Laser de Diodo de alta potência sob emissão pulsada (20 Hz); e, G5 - sem tratamento (controle negativo). Os discos foram avaliados em relação à rugosidade e alterações no ângulo de contato. Na terceira fase experimental, 15 amostras de discos e 15 amostras de parafusos de titânio foram submetidas aos mesmos tratamentos propostos para a fase experimental 2; em seguida, foi efetuado o ensaio de adesão celular com células MC3T3. Todas as avaliações quantitativas foram avaliadas estatisticamente ao nível de significância de 5%. Foi observado que o aumento de temperatura atingido durante a irradiação com laser sob a forma de emissão contínua pode gerar efeitos deletérios nos tecidos de suporte periodontais, pois foram geradas elevações de temperatura maiores que 10 °C. A irradiação dos discos com laser de alta potência, em ambos os modos de emissão, alterou o parâmetro Rz do biomaterial; porém, nenhum dos tratamentos propostos alterou a molhabilidade dos discos. A irradiação com laser de alta potência, assim como a PDT, potencializou a adesão celular em relação aos grupos controle positivo e negativo, sendo observado maior número de células nos grupos tratados com laser de alta potência. Foi possível concluir que, para tratamento da periimplantite, o uso do laser de alta potência no modo pulsado apresenta-se como forma mais segura para o tecido ósseo adjacente. Ainda, a irradiação de implantes odontológicos de titânio com laser de diodo de alta potência promove elevações de temperatura que alteram o parâmetro Rz do biomaterial, e esta alteração melhora a adesão de células pre-osteoblásticas. A terapia fotodinâmica também exerce efeito positivo sobre tais células, sem promover alterações estruturais.

Palavras-chave: Adesão Celular, MC3T3, Implante, Laserterapia, PDT, Periimplantite.

ABSTRACT

Peri-implantitis is a destructive inflammatory process that can lead to implant and bone losses. This pathology has different aspects of treatment and, among these, one can highlight the high power diode laser therapy and photodynamic therapy. Although clinically applied, little is known about their effects on the surface of dental implants, nor about their influence on pre-osteoblastic cell adhesion. Thus, this study aimed to evaluate the thermal, roughness, wettability and cell adhesion effects promoted by high power diode laser therapy and photodynamic therapy (PDT). To this end, this study was divided into three experimental phases. In the first one, the temperature elevations promoted by a continuous and pulsed emission high power diode laser ($\lambda = 808 \text{ nm}$) were evaluated during the irradiation of a bone defect. In the second experimental phase, titanium discs were submitted to different treatments: G1 - Mechanical scraping and subsequent chlorhexidine 2% irrigation (positive control); G2 - PDT with 0.01% methylene blue and low power red laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$); G3 - High power diode laser under continuous emission; G4 - High power diode laser under pulsed emission (20 Hz); and, G5 - no treatment (negative control). The discs were evaluated for roughness and changes in contact angle. In the third experimental phase, 15 disc samples and 15 titanium screw samples were submitted to the same treatments proposed for experimental phase 2. The cell adhesion assay with MC3T3 cells was then performed. All quantitative evaluations were statistically evaluated at a significance level of 5%. It was observed that the temperature increase achieved during continuous emission laser irradiation can have deleterious effects on the periodontal support tissues, as temperature elevations higher than $10 \text{ }^\circ\text{C}$ were generated. The irradiation of the high power laser discs in both emission modes changed the Rz parameter of the biomaterial; however, none of the proposed treatments changed the wettability of the discs. High power laser irradiation, as well as PDT, enhanced cell adhesion in relation to the positive and negative control groups, with a higher number of cells in the high power laser treated groups. It was concluded that, for the treatment of periimplantitis, the use of high power laser in pulsed mode is the safest way for adjacent bone tissue. Furthermore, the irradiation of high power diode laser titanium dental implants promotes temperature elevations that alter the Rz parameter of the biomaterial,

and this change improves the adhesion of pre-osteoblastic cells. Photodynamic therapy also exerts a positive effect on such cells without promoting structural changes.

Key words: Cell adhesion, MC3T3, Implant, Laser therapy, PDT, Periimplantitis.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. Edentulismo	16
3.2. Implantes dentários	17
3.3. Periimplantite	19
3.4. Tratamentos da periimplantite	21
3.5. Laserterapia no tratamento da periimplantite	24
3.6. A Terapia Fotodinâmica como tratamento da periimplantite	27
3.7. Influência da superfície e adesão celular	32
4. MATERIAL E MÉTODO	37
4.1. Delineamento Experimental	37
4.2. Fase 2: Avaliação dos efeitos microestruturais dos tratamentos sobre os discos de titânio	43
4.2.1. Ensaio de Rugosidade	43
4.2.2. Ensaio de Molhabilidade	46
4.3. Fase 3: Inoculação pré-osteoblástica e avaliação da adesão celular	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	72
8. BIBLIOGRAFIA	73

1. INTRODUÇÃO

A radiação laser tem se tornado uma grande aliada aos tratamentos odontológicos, uma vez que tal ferramenta possibilita a execução de tratamentos mais rápidos e com menores efeitos colaterais. Para tal, são empregados lasers de alta e de baixa potência, isoladamente ou em associação com técnicas convencionais. Os lasers de alta potência, por gerarem aquecimento controlado, apresentam benefícios para corte e hemostasia de tecidos moles, além de ação bactericida local. Os lasers de baixa potência, por sua vez, são grandes aliados no reparo de lesões, aceleração de cicatrização, redução de inflamação e dor por sua ação fotobiomodulatória sem aumento de temperatura. Ainda, estes lasers, quando associados a um corante fotossensibilizador, podem atuar na descontaminação local por meio da terapia fotodinâmica. Considerando estes aspectos, são muitas as condições que podem ser tratadas empregando-se a radiação laser.

O edentulismo é caracterizado pela perda total do dente do indivíduo. Um dos tratamentos desta condição é a substituição do(s) dente(s) perdidos por implante(s) dentário(s) biocompatível(is) [1]. Atualmente o Brasil demonstra maior prevalência de edentulismo na faixa etária entre 65 a 74 anos, no qual 76,5% dos indivíduos possuem perda total ou parcial de dentes superiores [1]. Considerando-se o fato de que o edentulismo é uma condição fortemente ligada a fatores socioeconômicos e ao acesso a recursos de saúde bucal, observa-se uma maior prevalência de edentulismo no Brasil em regiões mais carentes, sendo as regiões Norte e Nordeste as de maior prevalência [2].

A condição de edentulismo é amplamente estudada e se mostra estritamente ligada a diferentes fatores, tais como o envelhecimento da população, socioeconômicos, dificuldades de acesso, dentre outros. Estes afetam os cuidados com a saúde do indivíduo, prejudicando-o e impossibilitando o adequado manejo da saúde bucal [2].

A consequência do edentulismo caracteriza-se não só por um mutilamento funcional, devido à perda de eficiência de mastigação e às desordens geradas na articulação têmporo-mandibular, mas também por um constrangimento social. Considera-se que a perda dos dentes pode afetar de maneira moderada a severa alguns aspectos de expressão facial e aspectos estéticos do indivíduo [3]. O profissional Cirurgião-Dentista tem, então, o papel de prover a reabilitação de tais pacientes, possibilitando o acesso aos tratamentos para esta condição, tais como a colocação de próteses parciais ou totais, fixas ou removíveis, assim como disponibilizar o tratamento por meio da instalação de implantes dentários de titânio visando, assim, minimizar os problemas ocasionados pela perda dentária [3].

Os estudos sobre os implantes dentários iniciaram-se em 1952 por Per-Ingvar Brånemark [3], o qual descreveu a necessidade de se obter uma boa osseointegração, ou seja, uma junção funcional e anatômica de maneira direta entre o osso remodelado e a superfície do implante dentário [4]. A osseointegração se compreende como a capacidade de estabelecer uma interface mecanicamente sólida, sem a presença de tecido fibroso, com a completa união entre a superfície do material e o tecido ósseo [5]. Contudo, ressalta-se que a

anquilose, ou seja, a completa junção entre osso e implante, era considerada um fator negativo para a vida útil do implante para alguns autores [5][6][7].

Outro fator importante a ser considerado para o sucesso do tratamento com implantes dentários é a biocompatibilidade, que ocorre quando os tecidos entram em contato com um determinado material e não manifestam qualquer tipo de experiência de natureza irritante, tóxica, inflamatória, alérgica ou de fundo carcinogênico ou mutagênico [8]. O sucesso de implantes odontológicos continua sendo demonstrado atualmente, onde as ligas titânio mostram-se como a matéria-prima mais adequada para a confecção dos mesmos, fato que está ligado principalmente às suas altas condições biocompatíveis em meio vivo e alta similaridade mecânica em relação ao osso, assim como sua ductilidade e módulo de elasticidade ótima para tal tipo de aplicação [3][8].

O uso de um implante dentário envolve riscos pré e pós-operatórios como qualquer outra medida cirúrgica. Algumas doenças podem ser desenvolvidas ao longo de utilização dos implantes, tal como a periimplantite [9]. A periimplantite tem sua definição como um processo inflamatório dos tecidos moles, com a existência de bolsa periimplantar, sangramentos e posterior perda do osso que faz contato com o implante. Em casos extremos, acarreta no surgimento de defeitos ósseos com a exposição do implante, podendo culminar em perda do implante dentário e, conseqüentemente, em maior perda óssea do paciente [10].

Atualmente existem três principais tipos de tratamento para a periimplantite, as quais são divididos em terapias não-cirúrgicas, cirúrgicas e laserterapia [11][12]. A técnica não cirúrgica trata-se da raspagem mecânica do implante com curetas periodontais apropriadas, associadas ou não à irrigação com agentes

descontaminantes (tais como a clorexidina), sem a abertura de retalho para acesso à bolsa periimplantar [10]. Tal tratamento tem o intuito de promover a eliminação do biofilme, que é uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos aderidos entre si. Em contrapartida, a técnica cirúrgica trata-se da raspagem mecânica do implante e da região que o circunda, para a eliminação do biofilme, com possível associação de agentes descontaminantes como a clorexidina, porém feita por meio de abertura de retalho cirúrgico [10][11].

Ainda, a radiação laser pode ser empregada como tratamento para esta condição. Lasers de alta potência, tais como Er:YAG, CO₂, Nd:YAG, Er,Cr:YSGG, e Diodo são empregados com o objetivo de eliminar o biofilme e tecidos de granulação por meio de efeito térmico [12][13][14]. Uma das vantagens destes tratamentos reportada por alguns autores é a não necessidade de abertura de retalho cirúrgico, uma vez que os equipamentos são providos com fibras ópticas de tamanho tal que propiciam o acesso a regiões mais profundas da bolsa periimplantar [14][15][16]. Dentre os lasers de alta potência comercialmente disponíveis, o laser de Diodo apresenta grande interesse pelos profissionais clínicos, uma vez que têm preço atrativo em comparação com os demais lasers de alta potência, além de eficácia comprovada [36].

Além do uso dos lasers de alta potência, outra modalidade de tratamento de periimplantite possível é a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*). Trata-se de um tratamento que envolve uma substância fotossensibilizadora (FS), a irradiação com fonte de luz (lasers ou LEDs de baixa

potência) e a presença de oxigênio molecular. Nesta terapia, os fótons emitidos pela fonte de luz devem ser absorvidos pelo FS para que ocorra a liberação de espécies reativas de oxigênio e/ou radicais livres, que são citotóxicos e, portanto, auxiliam na eliminação dos microrganismos da bolsa periimplantar. Por usar fontes de luz de baixa potência, esta terapia não gera aumento de temperatura. Trata-se de uma terapia que pode ser efetuada em associação com a raspagem mecânica da superfície do implante, sendo de relativo baixo custo quando comparada com os custos de um laser de alta potência.

Deve-se ter cautela durante o uso de lasers de alta potência, pois o aumento exagerado de temperatura pode trazer danos aos tecidos adjacentes. Quando ocorre aumento de temperatura entre 7 a 10 °C, há o início de desnaturação proteica nas células do tecido adjacente ao implante, com possível comprometimento metabólico das mesmas. Com o aumento de temperatura superior a 10 °C por longo período de tempo, os danos às células e aos tecidos pode ser mais severo, configurando evento irreversível com lesão permanente ao tecido biológico [17], [18]. Além disso, elevações severas de temperatura podem ocasionar danos à superfície dos implantes, o que pode comprometer a neo osseointegração dos mesmos.

Para análise de eficácia e segurança da não alteração da superfície implantar, o que assegura a biocompatibilidade do biomaterial no tecido alvo, podem ser utilizados ensaios de cultura celular. Estes ensaios, realizados *in vitro*, são rápidos, de relativo baixo custo, e permitem a análise da interação de células com a superfície do material de estudo, no caso deste estudo, os implantes. O

titânio grau IV, utilizado para a confecção dos implantes, é reconhecidamente biocompatível [7, 8, 18].

No entanto, alterações causadas ao implante, como pequenas deformações, aquecimento ou trincas podem alterar a condição de biocompatibilidade. Os estudos de cultura celular permitem verificar interação das células com o implante, resultando em avaliação de biocompatibilidade do tratamento em si. Podem ser analisadas condições de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, sendo o ensaio de adesão celular aquele que caracteriza a interação inicial das células com o implante.

Os ensaios em questão devem utilizar células compatíveis com aquelas encontradas *in vivo*, ou linhagens celulares estabelecidas e recomendadas por norma. A linhagem celular MC3T3 foi estabelecida a partir de células pré-osteoblásticas, condizente com o tecido ósseo periimplantar, e é utilizada em estudos de avaliação da interação celular com biomateriais, incluindo adesão e citotoxicidade. Pode-se, portanto, considerar o uso desta linhagem para os objetivos propostos neste estudo.

Embora tanto o laser de Diodo de alta potência quanto a PDT sejam técnicas eficazes para tratamento da periimplantite, pouco se sabe sobre as alterações morfológicas que tais terapias podem ocasionar na superfície do implante, além das elevações de temperatura que podem ser geradas durante os tratamentos. Ainda, não se sabe se os tratamentos podem interferir na nova osseointegração do implante, o que motivou a realização deste estudo.

2. OBJETIVO

Diante do exposto, este estudo objetiva avaliar as mudanças microestruturais promovidas em implantes dentários de titânio grau IV pela realização de laserterapia de alta potência com laser de diodo sob modo de emissão contínua ou pulsada, ou pela terapia fotodinâmica, assim como investigar se tais tratamentos interferem na adesão de células pré-osteoblásticas.

Objetivos específicos:

1 – Avaliar os aumentos de temperatura oriundos da irradiação de defeitos ósseos periimplantares com laser de diodo de alta potência sob a forma de emissão contínua ou pulsada;

2 – Avaliar os efeitos da irradiação com laser de diodo de alta potência contínuo ou pulsado e da terapia fotodinâmica com azul de metileno e laser de diodo de baixa potência de emissão vermelha na rugosidade e molhabilidade de discos de titânio grau IV tratados por subtração ácida;

3 – Avaliar os efeitos dos tratamentos propostos na adesão de células pré-osteoblásticas em discos e em parafusos de titânio grau IV tratados por subtração ácida comerciais.

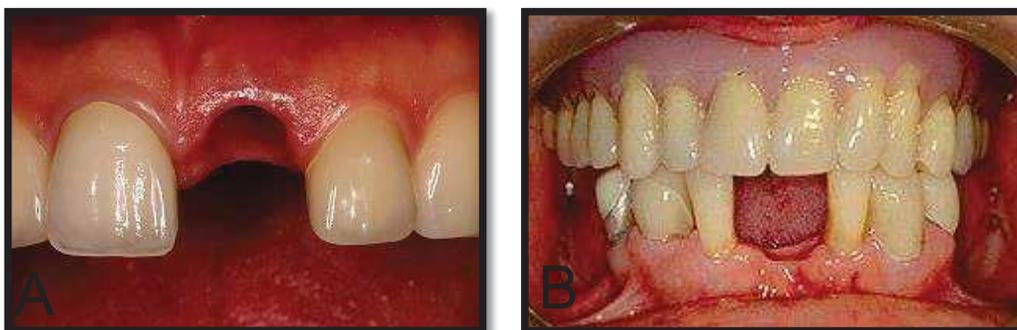
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Edentulismo

O edentulismo é uma condição irreversível altamente debilitante e tem sua descrição como o "marcador final da carga da doença para saúde bucal" [14]. O mesmo é caracterizado pela ausência de um ou mais dentes, sendo que tal condição é dada pela perda total do dente desde de seu ápice até sua raiz. Dentre as causas do edentulismo, destaca-se a falta de acesso à saúde bucal promovido por desigualdade social e econômica das populações. Além disso, a idade é outro fator que se faz fortemente ligada à ocorrência do edentulismo [16]. A Figura 1 ilustra dois exemplos de edentulismo em arcada superior e inferior.

O edentulismo pode ser classificado de acordo com as proporções de perda de dente, sendo esta classificação de dois tipos: edentulismo total e edentulismo parcial. No edentulismo total, temos a perda de todos os dentes da maxila ou mandíbula sendo, neste caso, proposto o uso de próteses removíveis completas (popularmente denominadas de dentaduras) ou implantes dentários, que podem suportar próteses totais ou unitárias.

Figura 1. Pacientes com edentulismo: A – em arcada superior; B – em arcada inferior.



Fonte: <https://bit.ly/2JbyeMv> / <https://bit.ly/2LhqA3K>.

Em contrapartida, no edentulismo parcial nota-se a ausência de alguns dentes, porém os dentes consecutivos ainda se fazem presentes. Deste modo é indicado o uso de próteses parciais fixas ou removíveis, ou o uso de implantes de titânio a qual substitui o dente totalmente, mimetizando sua função de sustentação óssea e mastigação [2].

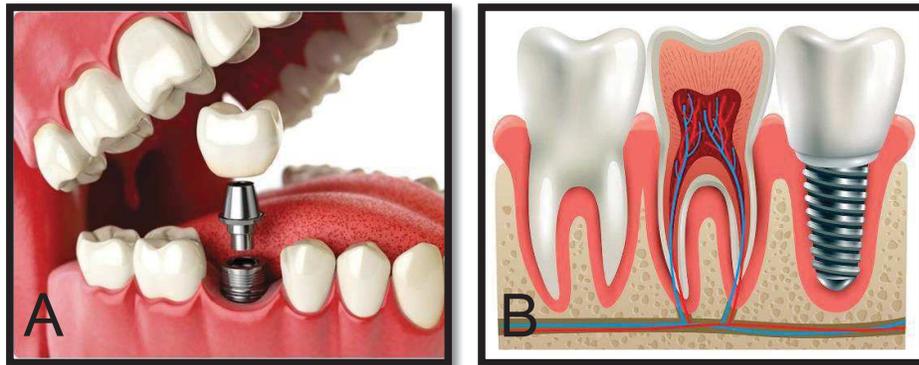
No Brasil, o edentulismo tem suas maiores taxas nos Estados de menor renda per capita, principalmente nos Estados das regiões Norte e Nordeste, não se fazendo exclusivo ao gênero, e acima de 65 anos. Tais dados demonstram que o edentulismo é uma doença com traços estritamente ligados a fatores socioeconômicos e educacionais [1].

3.2. Implantes dentários

Implantes são classificados como dispositivos permanentes ou transitórios que substituem total ou parcialmente um membro, órgão ou tecido [8]. Quando da perda total de um ou mais dentes, indica-se para este tipo de procedimento

implantes dentários constituídos por ligas de titânio, material que possui biocompatibilidade, resistência e desempenho mecânico compatíveis com os esforços e ambiente implantado, obtendo, assim, melhores resultados quanto a integração óssea do implante [8]. A Figura 2 ilustra exemplos de dois implantes dentários.

Figura 2.(A) Ilustração da inserção de um implante dental com coroa. (B) Ilustração de um dente saudável e seus canais e um implante dentário inserido ao lado.



Fonte: <https://bit.ly/2szHOS8> / <https://bit.ly/2srVgZb>.

Ao longo do tempo, diversos tipos de materiais foram utilizados para substituição das propriedades mecânicas do dente como um todo, tais quais metais (ouro, prata, bronze), madeiras e cerâmicas. Estas, por sua vez, mimetizavam a aparência dental, em alguns casos até obtinham um bom desempenho mecânico; porém algumas propriedades como alta fragilidade e baixa biocompatibilidade reduziam exacerbadamente o tempo de vida útil de tais implantes [3, 8].

Em 1952, um médico, pesquisador e professor, Dr. Per-Ingvar Branemark, que realizava pesquisas experimentais na Suécia, estudando a microcirculação e

os fenômenos da cicatrização por meio de uma câmera filmadora de titânio inserida na medula da tíbia de coelhos, descobriu “acidentalmente” um mecanismo alternativo de fixação e uma íntima afinidade óssea pelo titânio [8]. A partir de então, diversos tipos de implantes começaram a ser desenvolvidas à base de titânio o qual, além de apresentar osseointegração e biocompatibilidade, possui propriedades mecânicas, como módulo de elasticidade e ductilidade muito semelhantes ao do osso humano [8].

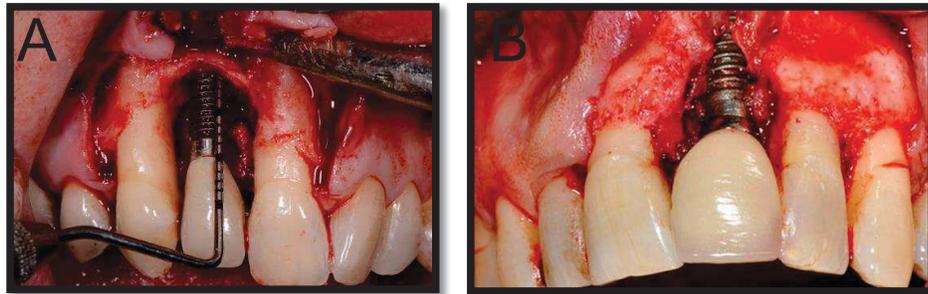
Com o passar dos anos, a tecnologia na fabricação de implantes é cada vez mais aprimorada, de modo que a superfície dos implantes foi modificada com o fim de auxiliar na ancoragem do implante ao osso e, principalmente, na adesão celular em sua superfície. O aumento de rugosidade e de ranhuras na superfície dos implantes retratam essas mudanças, demonstrando, dessa forma, considerável queda nas taxas de falhas de implantes dentais [19].

3.3. Periimplantite

A periimplantite, ou infecção da região periimplantar, é uma doença que acomete em torno de 5 a 8% de pacientes implantados, o que totaliza um número em torno de 160.000 implantes acometidos pela doença [20]. Ela se caracteriza por um processo inflamatório que acomete os tecidos periimplantares, neste caso a gengiva e o osso de suporte, categorizando uma das principais causas de insucesso de implantes dentais [21]. O termo periimplantite advém do final da década de 1980, onde há a definição da reação inflamatória com perda de suporte ósseo em tecidos vizinhos, com possível progressão ao implante funcional, perda

progressiva da ósseointegração e do osso de suporte. Esta doença é frequentemente associada à supuração e bolsas profundas, além mobilidade do implante, fortes dores e sensação de corpo estranho no local inflamado, conforme ilustrado na Figura 3 [22].

Figura 3. (A e B) Exposição do implante após periimplantite.



Fonte: <https://bit.ly/2szHOS8> / <https://bit.ly/2srVgZb>.

Há evidência científica de que a colonização bacteriana da periimplantite pode ser proveniente da mesma colonização bacteriana ligada a doenças periodontais que causaram o edentulismo do paciente, ou seja, em outras palavras, as bactérias residuais de uma doença periodontal prévia pode afetar e lesar o sulco periimplantar do paciente edêntulo [23]. Quando este tipo de colonização ocorre, as bactérias presentes no sulco periimplantar são em geral classificadas como Gram-negativas, podendo encontrar-se diferentes tipos de bactérias, tais quais *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Tannerella forsythensis* e *Fusobacterium nucleatum* [24]. No entanto, em sítios periimplantares saudáveis, são predominantemente encontradas bactérias do tipo Gram-positivas [25].

A qualidade e quantidade de invasão bacteriana ditam o quão severa a lesão de periimplantite será, assim como a capacidade de resposta imunológica do paciente [26]. Existem fatores que influenciam nos riscos da aparição da doença, tais quais como a carga biomecânica sobre o implante e principalmente a quantidade de gengiva ao redor do implante onde, quanto menor a quantidade de gengiva inserida, maior o risco da doença [27].

Por se tratar de uma doença assintomática, a periimplantite se desenvolve ao longo do tempo e apenas é detectada em consultas de rotina. Os sinais clínicos da doença são sangramento, supuração e aumento da profundidade de sondagem, seguido de posterior perda óssea ao redor do implante, a qual pode ser identificada apenas por exames radiográficos [28]. Edema e vermelhidão nem sempre são associados à infecção e a dor não é uma característica clínica que acompanha a periimplantite. Fatores que aumentam o risco da doença são má higiene oral, doença periodontal prévia, pacientes diabéticos não controlados, etilistas e fumantes [29].

3.4. Tratamentos da periimplantite

Durante o tratamento da periimplantite, objetiva-se restaurar a condição periimplantar saudável e eliminar a causa da doença, ou seja, extinguir o biofilme presente no sulco periimplantar. Para isso, são empregados diferentes tipos de tratamentos, sendo estes classificados em técnicas cirúrgicas, não cirúrgicas e a combinação das duas técnicas [9]. O objetivo principal do tratamento da

periimplantite é promover a remoção dos fatores etiológicos que causam a periimplantite prevenindo a perda óssea [30]. Na fase inicial da doença, a inflamação deve ser tratada com uma higienização de qualidade, por parte do paciente, junto com agentes antimicrobianos, priorizando-se o uso de substâncias como a clorexidina.

Na técnica não cirúrgica, a eliminação do biofilme ocorre por meio de raspagem local, associada ou não ao uso de agentes antimicrobianos, sem abertura de retalho. A utilização do tratamento mecânico pode ser considerada limitada, principalmente nas superfícies rugosas, pois dificilmente se consegue eliminar o biofilme que se encontra abaixo das espiras. O tratamento é realizado por meio do uso de curetas de teflon, plásticas, ou de carbono, as quais não geram modificações bruscas à superfície dos implantes [32]. É reportado que a utilização de curetas de metal podem causar ranhuras nas superfícies dos implantes quando comparadas a curetas de outros materiais menos agressivos, e tais ranhuras podem interferir na neo osseointegração [32].

Na técnica cirúrgica, ocorre a raspagem do implante, associada ou não ao uso de agentes antimicrobianos, por meio de abertura de retalho, conforme pode ser visualizado na Figura 4. O principal objetivo do tratamento é ter acesso à superfície do implante também em maior profundidade, para que seja feito o debridamento e a descontaminação completos, resultando na diminuição da inflamação no tecido periimplantar. O tratamento cirúrgico da periimplantite é realizado em casos de bolsas periimplantares acima de 5 mm de profundidade com perda óssea. O objetivo é a eliminação mecânica da inflamação, evitando a

progressão da doença, assim como manter o implante em sua plena função quanto aos tecidos periimplantares saudáveis. O tratamento visa também à regeneração do tecido periimplantar o qual foi perdido com a doença [35].

Figura 4. Raspagem mecânica com abertura de retalho em paciente acometido por periimplantite.



Fonte <https://bit.ly/2HfqZR>.

O tratamento da periimplantite também pode ser feito com o uso de agentes antimicrobianos locais e sistêmicos [33], dentre os quais podem ser empregados o hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio a 3%, clorexidina a 0,2%, e enxaguatórios como Listerine e Plax [34]. Normalmente, o uso destes agentes está associado à raspagem do local, de forma cirúrgica ou não.

Contudo, a eficácia dos tratamentos é ainda questionada. Em um estudo que retrata nove pacientes diagnosticados com periimplantite, foi proposta a terapia de cirurgia de retalho, com irrigação com peróxido de hidrogênio 10%. Logo após, os pacientes foram medicados com antibióticos e orientados a fazer bochecho com gluconato de clorexidina a 0,2%, de 12/12 horas. Os resultados das avaliações microbiológicas e radiográficas foram feitos nos períodos de seis

meses, um e cinco anos, e demonstraram que 7 implantes dos 26 analisados foram perdidos. Ainda, foi observado que 4 implantes continuaram com perdas ósseas, 9 não sofreram alterações e 6 obtiveram regeneração óssea. Desta maneira, concluiu-se que, a terapia combinada de tratamento antimicrobianos e cirurgia possibilitou um índice de sucesso de apenas 58% dos implantes [35].

Atualmente alguns tratamentos alternativos têm sido propostos, visando um tratamento que se utiliza de métodos menos invasivos. Em diversas especialidades da Odontologia os lasers são utilizados como terapia coadjuvante ao tratamento convencional, a escolha do tipo e dos parâmetros do laser é estritamente dependente da patologia e também do tecido alvo a ser tratado [36][37].

3.5. Laserterapia no tratamento da periimplantite

O laser é um acrônimo na língua inglesa que significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* que, em pode ser traduzido por “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”. Trata-se de um dispositivo que produz radiação eletromagnética a qual possui características diferentes da luz comum, tais como monocromaticidade, coerência e colimação.

Na utilização clínica em Odontologia, os lasers empregados possuem comprimento de onda entre o visível e o infravermelho, faixa a qual a radiação se denomina não-ionizante no espectro eletromagnético, ou seja, não origina mutações celulares ou evoluções levando a neoplasias [37, 38, 39].

A radiação laser, assim como qualquer outra luz, quando incidida sobre um material, pode sofrer reflexão, transmissão, espalhamento ou absorção, sendo esta última propriedade a mais importante para ação dos efeitos biológicos no tecido. Essas interações da luz com o tecido podem acontecer concomitantemente, onde a proporção em que cada uma delas ocorre irá depender de características do tecido alvo tais como sua composição, e das configurações da irradiação laser, tais como seu modo de irradiação (contínuo ou pulsado), potência pico, potência média, densidade de energia, densidade de potência, energia total entregue, tempo de irradiação, dentre outros [40].

Os lasers de baixa potência ou baixa intensidade compreendem os feixes emitidos na região do vermelho ou infravermelho próximo que não causam elevação de temperatura no tecido alvo. Estes feixes promovem ações de fotobiomodulação, sendo fortemente empregados da Odontologia como terapêutica analgésica e anti-inflamatória. Ainda, quando associados a um fotossensibilizador, podem atuar na descontaminação por meio da terapia fotodinâmica [41].

Os lasers de alta potência ou alta intensidade compreendem os feixes capazes de elevar a temperatura no tecido e, assim, podem promover ações de corte, vaporização e ablação. Estes lasers são amplamente utilizados em cirurgias, hemostasia, prevenção da cárie, ablação do tecido ósseo e dental, e na descontaminação [42]. Na implantodontia têm-se a utilização de lasers de alta intensidade para a modificação da superfície do implante, com o objetivo de aumentar a adesão celular, e também para vaporização do biofilme e do tecido de granulação [43].

A avaliação dos efeitos da irradiação com lasers de alta potência (CO₂ e Er,Cr:YSGG) na adesão de osteoblastos em discos de titânio com superfícies diferentes (usinada, revestida por hidroxiapatita, jateada por areia e jateada por spray de plasma de titânio) mostrou que os osteoblastos cresceram em todas as superfícies de implantes; porém, a diferenciação celular nestas superfícies só pôde ser observada nos grupos previamente irradiados [41][42]. Em um estudo clínico com 15 pacientes, foi avaliado o efeito do laser de CO₂ para a descontaminação de defeitos ósseos periimplantares. Após irradiação laser, o defeito ósseo foi preenchido com enxerto ósseo (BioOss®) e coberto com uma membrana de colágeno. Os pacientes ficaram em observação por um período de 27 meses, onde foi demonstrado que a grande maioria dos defeitos ósseos foram preenchidos. Os autores concluíram, desse modo, que a associação da técnica de enxerto ósseo com uso laser de CO₂ para descontaminação dos defeitos pode ser um método bastante efetivo no tratamento da periimplantite [43].

Varela *et al.* afirmam que uso do laser de diodo de alta potência não danifica a superfície dos implantes, até mesmo quando utilizado em altas densidades de energia [44]. Estes autores afirmam que, para o uso de lasers com comprimento de onda entre 800 nm a 810 nm, é necessário se considerar o aumento de temperatura durante as irradiações, assim como a capacidade em causar alguns danos permanentes à região.

3.6. A Terapia Fotodinâmica como tratamento da periimplantite

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica em que são geradas espécies reativas de oxigênio e/ou radicais livres citotóxicos por meio da associação de oxigênio molecular, uma molécula fotossensibilizadora (FS) e uma fonte de luz de baixa potência que seja absorvido por ela. Esta fonte de luz normalmente pode ser oriunda de um laser ou um LED (*light emitting diode*) de baixa potência. Para as aplicações clínicas em Odontologia, são frequentes os feixes emissores no vermelho ou infravermelho próximo, por sua boa penetração nos tecidos moles.

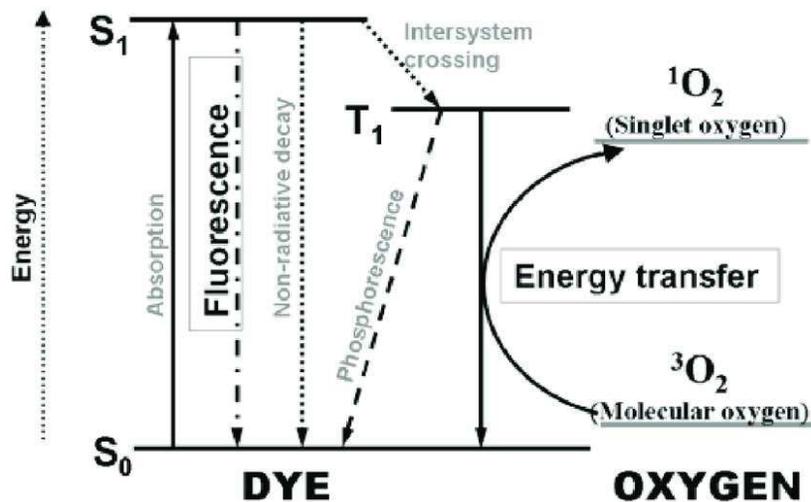
A eficácia do tratamento se dá através da produção de espécies reativas de oxigênio que, em altas concentrações, são tóxicas para bactérias, fungos e vírus [44]. A PDT é uma técnica que têm o potencial de atingir microrganismos e células prejudiciais, sem que o tecido saudável seja danificado. Inicialmente, o desenvolvimento da terapia fotodinâmica se deu com o enfoque no tratamento do câncer, baseada na observação de que algumas moléculas não tóxicas – os fotossensibilizadores, como os derivados de porfirina – se tornavam tóxicas na presença de luz. A efetividade da PDT advém de dois princípios: o acúmulo preferencial de fotossensibilizador nas células alvo e a precisão quando da irradiação da luz, possibilitando, assim, a ação seletiva e localizada da terapia [45].

O uso da terapia fotodinâmica tem sido realizado em diversas especialidades da Odontologia, como por exemplo na endodontia, na periodontia e na implantodontia, com o objetivo de redução microbiana. Os resultados clínicos são bastante satisfatórios, sendo reportada uma redução bacteriana muito similar

ao laser de alta potência, com a vantagem de não promover aumento da temperatura, possuir um custo reduzido [46, 47, 48]. Além disso, não são relatados na literatura indícios de reações sistêmicas ou fenômeno de resistência bacteriana após o uso da PDT, o que representa uma boa vantagem em relação aos antibióticos.

O mecanismo de ação da PDT se dá quando a molécula do fotossensibilizador se torna mais energizada após absorver um fóton da fonte de luz. Neste momento, a molécula sai do seu estado fundamental e vai para o estado singleto (S_n) mais excitado que, por sua vez, é muito instável. Assim, a molécula tende a retornar ao seu estado fundamental, usando, para isto, de dois mecanismos distintos: ou pelo processo radioativo de emissão de luz (fluorescência) ou pelo processo de relaxação física (conversão interna). Durante a PDT, a molécula do FS transaciona para o estado tripleto excitado durante a conversão de spin eletrônico. Este estado tripleto, com energia mais baixa que o singleto e tempo de vida mais longo) pode retornar ao estado fundamental perdendo a energia sob a forma de fosforescência, ou pode transferir sua energia para o oxigênio molecular presente, levando à formação de oxigênio singleto. Além disso, pode haver reações de transferência de elétrons com as macromoléculas biológicas que estiverem presentes, ocasionando a formação de radicais livres e/ou íons radicais. Tanto o oxigênio singleto quanto os radicais livres podem gerar morte celular [49]. Tais processos encontram-se resumidos no Diagrama de Jablonski representado na Figura 5.

Figura 5. Diagrama de Jablonski simplificado.



Fonte: Zheng, Gang & Chen, Juan & Stefflova, Klara. Near-Infrared Fluorescence Imaging Guided Therapy: Molecular Beacon-Based Photosensitizers Triggered by Breast Cancer-Specific mRNA. *Front. Biosci.* 2007, 12: 4709-21.

Atualmente, mais de 400 substâncias são conhecidas como fotossensibilizadoras, 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 protoporfirinas [51,52]. Contudo, há indícios de que algumas bactérias, como *Actinomyces odontyculus* e *Porphyromonas gingivalis*, não necessitam do uso adicional de corantes, pois são capazes de sintetizar protoporfirina, um dos corantes mais utilizados na PDT. Desse modo, apenas com a irradiação de uma fonte de luz com comprimento de onda na faixa do vermelho pode levar a morte desses microrganismos e, assim, resultar na substancial melhora da inflamação no tecido gengival [53].

Van Straten *et al.* (2017), em uma revisão de literatura sobre o uso da PDT em implantodontia, citou os fotossensibilizadores disponíveis para utilização

contra microorganismos patogênicos. O autor afirma que a PDT é uma técnica bastante eficaz contra bactérias e dificilmente as cepas apresentam resistência ao tratamento; além disso, os autores relatam que esta técnica não danifica a superfície do implante, tal como pode ocorrer com o uso de laser de alta potência, por exemplo. 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 não exercer efeito colateral sobre o tecido ao redor da região tratada [54].

Buscando avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de orto-toluidina quanto à ação sobre diversas bactérias (entre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) os autores Usacheva, Teichert e Biel (2001) utilizaram diferentes concentrações deste FS, paralelamente com o uso do lasers de diferentes comprimentos de onda (630nm e 664nm), com variações de densidade de energia de 10 a 60 J/cm², e intensidades de 50 a 100 mW/cm². Os resultados demonstraram que todos os microorganismos foram eliminados em porcentagens diversas. Entretanto, a ação da PDT foi dependente do corante utilizado, assim como de sua concentração, densidade de potência do laser, bem como o tipo de bactéria envolvida [55].

Em um estudo com 15 pacientes, onde foi aplicada a PDT com azul de orto-toluidina e laser de comprimento de onda na faixa de 660 nm, foi demonstrado redução bacteriana em diferentes superfícies de implantes com redução média de 92%, sendo 97% desta redução principalmente da bactéria *P. gingivalis*, utilizando-se de aplicações de 1 minuto de irradiação [55, 56].

Outro estudo comparou os efeitos da PDT com a terapia convencional (raspagem e irrigação com clorexidina a 0,12%), quanto à redução microbiana em periimplantite induzida por ligadura em cachorros. Para isto foi utilizado um laser de GaAsAl (660 nm), com potência de 49 mW, energia de 7,2 J durante 3 minutos. Os autores concluíram que a PDT é um método não-invasivo e efetivo no tratamento da periimplantite quando 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 [57].

Alguns fatores podem influenciar no sucesso da PDT, dentre os quais se destacam o pH do meio, a porcentagem de água, a 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 [58]. Em um estudo de Chan *et al.*, foram analisadas culturas bacterianas de *P. gingivalis*, *Bacteroides 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 azul de metileno [59].

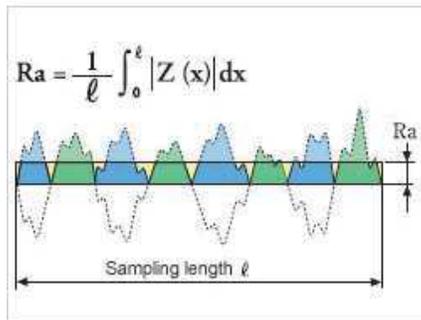
3.7. Influência da superfície e adesão celular

Atualmente, os experimentos que se utilizam de cultura celular têm ganhado grande destaque por reproduzirem de uma maneira melhor as interações interfaciais diretas entre células e superfícies de diferentes biomateriais. Particularmente, osteoblastos têm sido amplamente utilizados na avaliação dos efeitos da adesão e proliferação celular em superfícies de implantes dentários modificados via diferentes tratamentos [60]. As células presentes no tecido são cruciais para a osseointegração, pois são as principais reguladoras da resposta tecidual óssea na superfície do biomaterial [61].

Características da superfície do implante como topografia, rugosidade, propriedades químicas e físicas e até mesmo a energia de superfície do material apresentam grande importância na adesão de osteoblastos em biomateriais, principalmente no que se trata das fases iniciais de adesão celular, pois esta fase influenciará certamente em etapas posteriores de proliferação e diferenciação celular [63]. A rugosidade tem papel importante no primeiro contato do implante com a célula, ou seja, influencia a ancoragem celular. A rugosidade superficial adequada pode ocasionar melhores resultados em relação à força de ancoragem e travamento mecânico nos estágios iniciais da osseointegração [63].

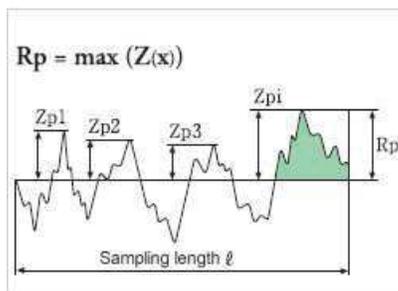
Pode-se avaliar a rugosidade de um material da seguinte forma:

- Rugosidade média (Ra)*



Projeta-se a superfície que se encontra abaixo da linha média para cima desta mesma linha e calcula-se a média desses novos valores (picos verdes e azuis).

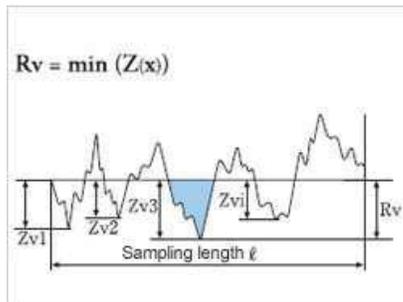
- Altura máxima de pico (Rp)*



Corresponde à maior altura de pico ao longo do comprimento medido (l_m), sendo calculada em relação à linha média.

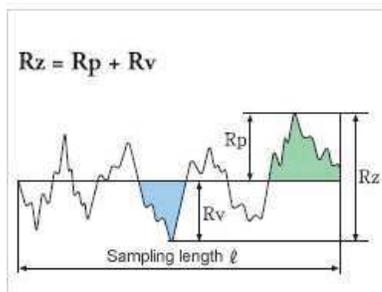
(*Disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie/> acesso em 20 de abril de 2018).

- Profundidade máxima de vale (R_v)*



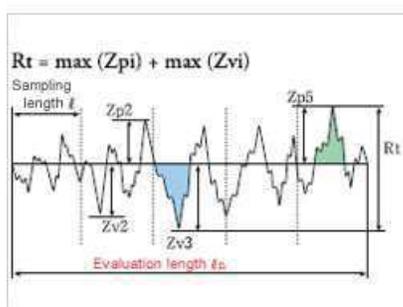
Semelhante ao R_p , no entanto em relação ao vale, isto é, regiões abaixo da linha média.

- Altura máxima do perfil de rugosidade (R_z)*



Soma de R_p com R_v , isto é, do tamanho do maior vale e do maior pico ao longo do comprimento de medição (l_m).

- Altura total do perfil de rugosidade (R_t)*



Semelhante ao R_z , no entanto os picos e vales máximos levados em consideração devem pertencer a uma região de amostragem (l_e) especificamente, e não a todo o comprimento de medição.

*Disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie/>

No processo da adesão celular estão envolvidas diversas moléculas, assim como componentes da matriz extracelular. Tal processo em geral é iniciado pela mediação da proteína integrina, presente na superfície das células, e sua interação com fibronectina na matriz extracelular, formando inicialmente o processo de adesão focal. A principal subunidade dentre as integrinas participantes do processo de adesão de osteoblastos na superfície de biomateriais é a integrina $\beta 1$, enquanto a adesão celular inicial é mediada por diversas proteínas de ligação [64].

O processo inicial de adesão celular, em geral, é seguido por espalhamento, com intensificação das adesões focais. Uma vez aderidas a determinada superfície, as células podem ter diferentes comportamentos, tais como migração, proliferação ou diferenciação. O acompanhamento da diferenciação osteoblástica pode ser realizado com a observação da atividade enzimática específica, a fosfatase alcalina, e a presença de proteínas características do tecido ósseo, como osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I. Estas proteínas estão presentes na matriz extracelular óssea juntamente com outros componentes. A osteonectina, especificamente, está envolvida na ligação de íons Ca^{2+} e hidroxiapatita durante o processo de mineralização óssea, e é um importante marcador de diferenciação celular e modulador do mecanismo de adesão osteoblástica [65].

Como amplamente difundido em diversos estudos, sabe-se que as características físico-químicas da superfície de interação com as células direcionam o comportamento das mesmas, a exemplo do que ocorre naturalmente

no organismo, na interação de células e matriz extracelular. Da mesma forma, as características superficiais de determinado material estão intimamente ligadas à resposta celular. Osteoblastos, por exemplo, possuem respostas diretas para diferentes níveis de rugosidades em superfícies de biomateriais metálicos, inclusive implantes dentais. Seguindo a mesma dinâmica, outra propriedade muito importante é quanto à hidrofiliabilidade da superfície do material, que pode favorecer a interação celular [66, 67].

A interação celular com a superfície do biomaterial é de grande importância para osseointegração de um implante odontológico; desse modo, toda e qualquer modificação de superfície tem de ser estudada e monitorada a fim de que as interações do tecido ao implante, por exemplo, tenham a sua chance de sucesso estimadas [68, 69, 70]. Os estudos *in vitro* permitem o estudo das interações entre células e biomateriais, inclusive a caracterização da adesão celular. Para tanto, devem ser utilizadas células com determinadas características. No caso do estudo de osseointegração, recomenda-se o uso de células de linhagens osteoblásticas, tais como células osteoblastos ou pré-osteoblásticas, que podem se diferenciar em osteoblastos dependendo das condições de cultura celular. A linhagem celular pré-osteoblástica MC3T3 foi estabelecida a partir de células de tecido ósseo de camundongo, e é considerada um dos modelos para estudar a resposta celular óssea *in vitro* [71].

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Delineamento Experimental

Foi realizado um estudo *in vitro* randomizado composto por três fases experimentais distintas, conforme a seguir:

- **FASE 1:** Avaliação dos aumentos de temperatura superficial promovidos pela irradiação de implantes de titânio com laser de diodo de alta potência;
- **FASE 2:** Avaliação dos efeitos microestruturais em discos de titânio – rugosidade e molhabilidade – promovidos pelos diferentes tratamentos propostos para periimplantite;
- **FASE 3:** Avaliação da adesão celular pré-osteoblástica em discos e implantes de titânio submetidos a 5 diferentes tratamentos propostos para periimplantite.

Para a primeira fase experimental, 5 implantes odontológicos comerciais de titânio grau IV foram instalados em blocos de tecido ósseo bovino com simulação de perda óssea decorrente de periimplantite. As amostras foram distribuídas em 2 grupos experimentais para serem tratadas com laser de alta potência sob modo de emissão contínua e pulsada e, durante as irradiações, a temperatura superficial decorrente das irradiações foi mensurada com termopares de resposta rápida.

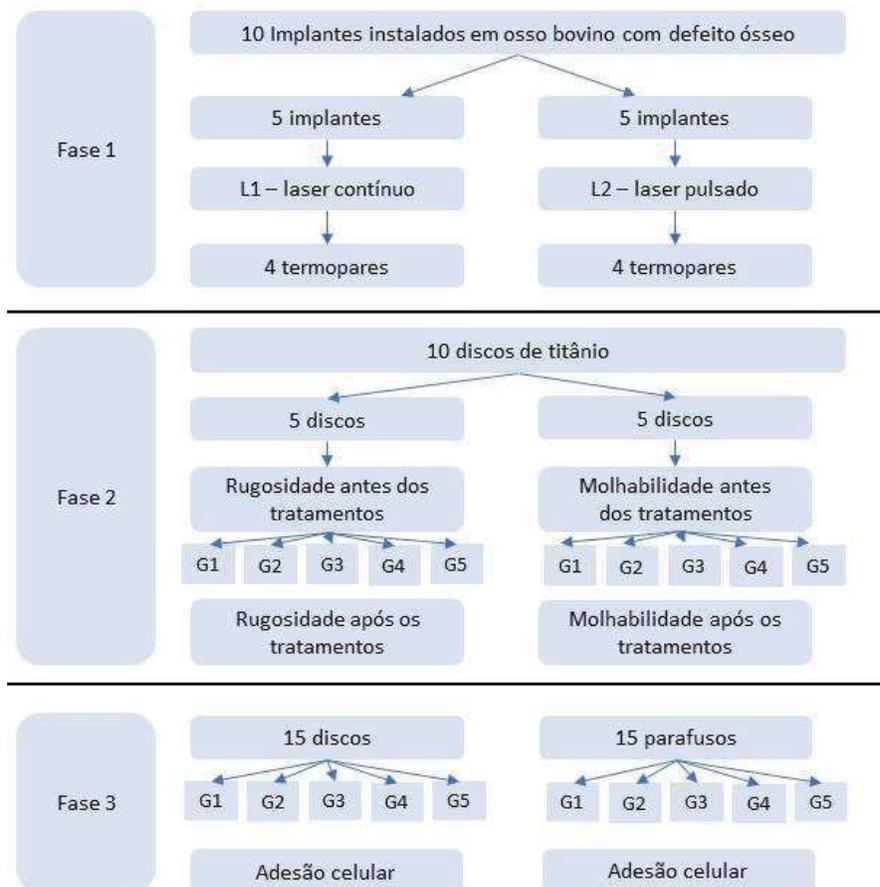
Para a segunda fase experimental, discos de titânio foram submetidos aos 5 tratamentos propostos na fase anterior, sendo avaliadas a rugosidade e molhabilidade decorrentes dos tratamentos.

Para a terceira fase experimental, amostras sob a forma de discos de titânio, assim como de implantes comerciais, foram submetidas a cinco tratamentos de periimplantite: G1- raspagem mecânica seguida de irrigação com clorexidina

(controle positivo); G2 – terapia fotodinâmica (PDT, azul de metileno 0,01% seguida da irradiação com laser de baixa potência vermelho); G3 – irradiação com laser de diodo de baixa potência (1W) sob modo contínuo; G4 - irradiação com laser de diodo de baixa potência (1W) sob modo pulsado (20 Hz); G5 – sem tratamento (controle negativo). Em seguida, foram inoculadas células MC3T3 e avaliada a adesão celular.

O fluxograma da Figura 6 ilustra as diferentes fases experimentais do presente estudo.

Figura 6: Fluxograma das diferentes fases experimentais do presente estudo.



Fonte: Própria.

A análise estatística foi efetuada individualmente para cada variável resposta quantitativa (temperatura, rugosidade e molhabilidade), sendo efetuado o teste estatístico mais apropriado de acordo com a normalidade e homogeneidade que os dados apresentaram. O nível de significância estatístico adotado foi de 5%.

5.1. Fase 1: Avaliação da temperatura superficial durante a irradiação de implantes com laser de diodo de alta potência

Após aprovação do presente estudo pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFABC (CEUA-UFABC 1362120915), blocos de tecido ósseo provenientes de fêmur bovino, doado por frigorífico certificado (Angelelli, Piracicaba, SP), com dimensões de 2 x 1,5 x 2 cm, foram preparados, de forma que fossem instalados implantes de titânio grau IV odontológicos, conforme protocolo cirúrgico recomendado pelo fabricante dos implantes utilizados.

Os implantes empregados apresentavam dimensões de 4,0 mm de diâmetro e 13 mm de comprimento, com superfície porosa (diâmetro dos seus poros variando entre 1,5 e 2 μm , de acordo com as especificações do fabricante). Antes da instalação dos implantes, foi feita uma perfuração circular de 1 mm de diâmetro no osso, na região apical do implante, para possibilitar a passagem de termopares (Figura 7). Por último, foram criados defeitos ósseos na superfície vestibular coronal dos implantes com dimensões de 3 x 3 mm, visando-se simular uma perda óssea característica de periimplantite (Figura 7).

Figura 7. Osso bovino com implante odontológico instalado, demonstrando a localização do defeito ósseo para irradiação laser e do orifício apical para colocação de um dos termopares.



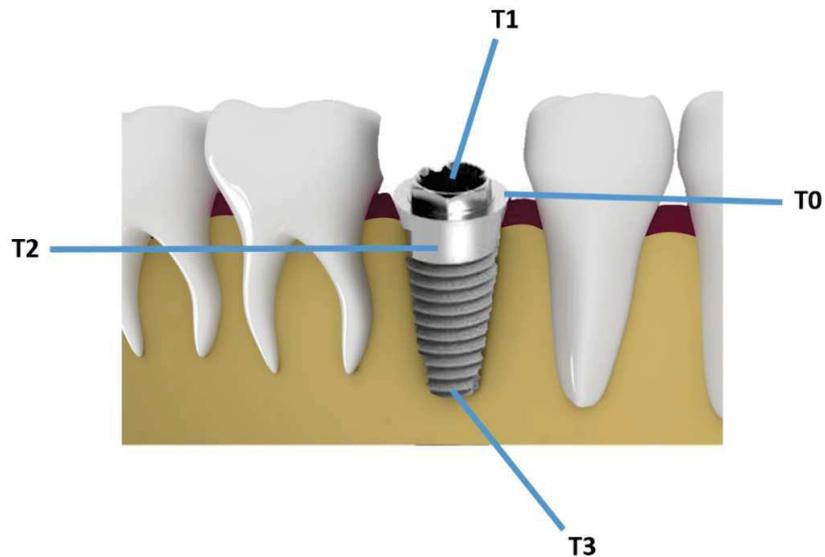
Fonte: própria.

Para a análise da elevação de temperatura na superfície dos implantes atingida durante as irradiações, foram posicionados quatro termopares tipo K (chromel-alumel – NiCr-NiAl, Omega Eng. Inc., EUA) com espessura de 127 μm e resolução de 0,1 $^{\circ}\text{C}$) nas regiões listadas na Tabela 1, com seus posicionamentos ilustrados de acordo com a Figura 8, de forma que as extremidades dos termopares estivessem em contato com a superfície dos implantes. Após posicionamento dos termopares, a porção externa dos orifícios foi selada com cera utilidade. Os termopares foram conectados a um sistema de monitoração de temperatura composto de um registrador, com resolução temporal de 0,05 segundos (NI 9213, National Instruments, EUA), onde o tempo em que o termopar continuou a ser monitorado após o fim da irradiação foi de 3 minutos (180 s).

Tabela 1. Relação termopar e sua localização no implante/osso.

Termopar	Localização
T₀	Atrás do implante, junção Implante-osso
T₁	Dentro do implante
T₂	Defeito (osso-implante)
T₃	Ápice do implante

Figura 8. Representação da localização dos termopares.



Fonte: própria.

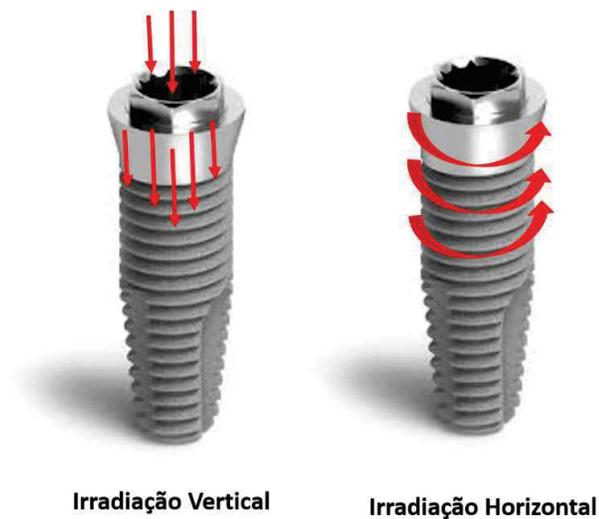
A superfície dos implantes exposta nos defeitos ósseos criados foi irradiada com laser de diodo de alta potência [46] (Thera Lase Surgery, DMC Equipamentos, Brasil, $\lambda = 808 \text{ nm}$) focalizado sob modo contato, de maneira manual por um único operador calibrado por 60 s, sendo 30 s de maneira vertical e 30s de maneira horizontal no defeito criado, de acordo com os grupos experimentais listados na Tabela 2 e conforme as direções adotadas na Figura 9.

Para as irradiações, foi empregada fibra óptica de diâmetro de 400 μm , clivada a cada irradiação, e a potência foi aferida com medidor de potência (FieldMaster II, Coherent, EUA). Para o grupo irradiado sob modo pulsado (L2), foi empregada taxa de repetição de 20 Hz, de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 2. Grupos experimentais da primeira fase do presente estudo.

Grupo experimental	Potência média (W)	Intensidade (W/cm^2)	Densidade de Energia (J/cm^2)	Modo de emissão	Energia entregue (J)
L1	1,0	793,65	$47,61 \cdot 10^3$	Contínuo	60
L2	1,0	793,65	$23,80 \cdot 10^3$	Pulsado	30

Figura 9. Esquemática das duas formas de varredura, horizontal e vertical.



Fonte: própria.

As curvas de temperatura obtidas foram traçadas graficamente empregando-se software Origin Pro 8. Os valores médios de variação de temperatura obtidos em cada região do tecido ósseo. Os dados foram analisados estatisticamente empregando-se o teste de Mann-Whitney, considerando-se o nível de significância estatística de 5%.

4.2. Fase 2: Avaliação dos efeitos microestruturais dos tratamentos sobre os discos de titânio

Para esta fase experimental, 10 amostras de discos de titânio grau IV com ataque químico comercial, advinda de mesmo material que o implante odontológico comercial, cedido pela empresa Signo Vines (Curitiba, Brasil), foram submetidas ao ensaio de rugosidade e molhabilidade (medição do ângulo de contato direito e esquerdo na amostra).

4.2.1. Ensaio de Rugosidade

Para o ensaio de rugosidade, foram destinadas 5 amostras de discos de titânio, as quais foram aleatoriamente submetidas aos tratamentos propostos na Tabela 3 (1 amostra para cada tratamento proposto).

Tabela 3: Relação de grupos versus tratamentos para o experimento de adesão celular.

GRUPO	Tratamento
G1	Raspagem com cureta metálica + Clorexidina
G2	PDT (terapia fotodinâmica, Azul de Metileno + Laser Vermelho de baixa potência, $\lambda = 660\text{nm}$)
G3	Laser de alta potência, 1,0 W, contínuo
G4	Laser de alta potência, 1,0 W, pulsado
G5	Sem tratamento (controle)

Os tratamentos foram realizados como descritos a seguir para cada um dos grupos:

- G1 (controle positivo): a superfície das amostras foi raspada manualmente empregando-se uma cureta periodontal metálica (Duflex, Brasil), previamente esterilizada na autoclave, utilizando-se dos movimentos horizontais e verticais por 30s durante a raspagem. Após, as peças foram posicionadas em uma placa de cultura celular de 24 poços; na sequência, foram inoculados 700 μL de clorexidina (0,02%) em sua superfície, de modo que as amostras fossem totalmente encobertas. As amostras ficaram imersas na solução de clorexidina por 5 minutos e foram, então, lavadas com 2100 μL de soro fisiológico filtrado, sendo transferidas no final para uma nova posição da placa de cultura para secagem.
- G2: foi utilizado o corante azul de metileno [0,01%] (Sigma Aldrich, EUA), filtrado, como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica. Para tal, as 3 amostras deste grupo foram totalmente imersas em 700 μL de fotossensibilizador, aguardando-se o tempo de pré-irradiação de 5min para

cada amostra. Em seguida, as amostras foram irradiadas com laser de baixa potência (Arseneto de gálio alumínio, $\lambda = 660\text{nm}$, DMC Equipamentos, Brasil) por 6min40s, com uma energia total entregue de 12J e uma dose de 425 J/cm².

- G3: foi utilizado o laser de alta potência de diodo (Thera Lase Surgery, DMC Equipamentos, Brasil, $\lambda = 808\text{ nm}$) sob modo de emissão contínua, com potência de 1,0W por 60s, tendo padronizada a aplicação de 30s na posição vertical e 30s na posição horizontal, ocorrendo a varredura manual de toda a amostra.
- G4: foi empregado o laser de diodo de alta potência (Thera Lase Surgery, DMC Equipamentos, Brasil, $\lambda = 808\text{ nm}$) sob modo de emissão pulsada, com potência média de 1,0W por 60s, tendo padronizada a aplicação de 30s na posição vertical e 30s na posição horizontal ocorrendo a varredura manual de toda a amostra.
- G5 (controle negativo): não houve nenhum tipo de tratamento.

Após os tratamentos, a rugosidade das amostras foi mensurada empregando-se Rugosímetro Instrutherm RP-200 (Instrutherm – São Paulo, Brasil), em triplicata em cada amostra. Foram obtidos os parâmetros de Ra, Rq, Rz, Rp e Rv, em μm . Os dados foram analisados estatisticamente empregando-se os testes de Kruskal-Wallis e Student Newman Keuls, ao nível de significância de 5%.

4.2.2. Ensaio de Molhabilidade

Outros 5 discos tiveram seu ângulo de contato mensurado através do uso do equipamento Attension. Antes das medidas, as amostras foram lavadas com detergente enzimático (Dental Cremer, São Paulo – Brasil) em lavadora ultrassônica (Cristófoli, Paraná, Brasil), secas, embaladas em papel grau cirúrgico e esterilizadas em autoclave por 30min a uma temperatura de 120 °C. Todas as amostras foram manuseadas sempre com luvas de procedimento, evitando que possíveis agentes de gordura pudessem interferir na superfície das mesmas.

A molhabilidade é calculada de acordo com o ângulo formado entre a amostra e a gota de água depositada sobre a amostra. A partir de interações atômicas e moleculares, se mantém a um determinado ângulo Θ em suas duas extremidades, direita e esquerda, a qual determina seu grau de hidrofiliicidade, ou molhabilidade. Após medida inicial da molhabilidade em cada uma das amostras, as mesmas foram submetidas aos tratamentos propostos (1 amostra para cada tratamento proposto), conforme Tabela 3. Na sequência, a molhabilidade foi mensurada novamente. Todas as medidas foram feitas em triplicata. Para análise estatística, foi empregado o teste de Wilcoxon, ao nível de significância de 5%.

4.3. Fase 3: Inoculação pré-osteoblástica e avaliação da adesão celular

Nesta fase experimental, foram utilizadas 8 amostras de implantes comerciais (parafusos) e 8 amostras de discos de titânio. Todas as amostras (discos e parafusos) são de titânio grau IV, da marca Signo Vinces® (Curitiba, Brasil). Os parafusos tinham as dimensões de 3,8 mm de diâmetro por 15 mm de altura, enquanto que os discos possuíam diâmetro de 10 mm e espessura de 3

mm. Todos os parafusos e discos foram seccionados empregando-se cortadeira metalográfica de precisão sob refrigeração em água destilada (Isomet 1000, Buehler, EUA), resultando em 15 amostras de parafusos e 15 amostras de discos, conforme Figura 10. Em seguida, as amostras assim obtidas foram lavadas com detergente enzimático (Dental Cremer - São Paulo, Brasil) em água bidestilada por meio do uso de lavadora ultrassônica em 3 ciclos de lavagem de 450s com aquecimento (37 °C).

Após a lavagem, todas as amostras tiveram sua secagem natural e foram esterilizadas em autoclave (Stermax, Spence – Curitiba, Brasil), em um ciclo de 30 min a uma temperatura de 120 °C. Em seguida, as amostras foram aleatoriamente distribuídas entre os 5 grupos experimentais distintos (3 amostras de parafusos e 3 amostras de discos por grupo experimental). Os tratamentos foram efetuados conforme grupos experimentais descritos na Tabela 3. Todos os tratamentos foram realizados no interior da cabine de segurança biológica (Filter Flux), com cuidados de manipulação asséptica para a manutenção das condições de esterilidade de todo processo.

Figura 10. Discos e parafusos de titânio após o corte.

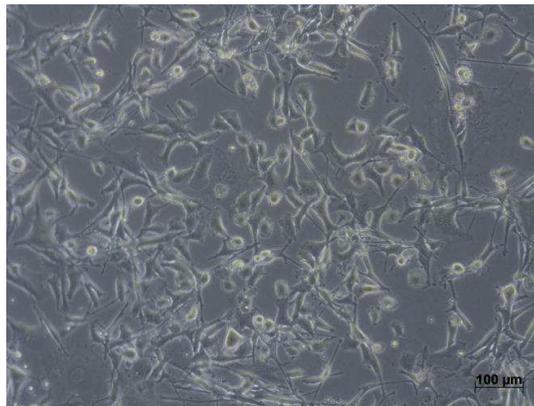


Fonte: própria.

Após a execução dos tratamentos, foi inoculado 100 μ L de uma suspensão de células pré-osteoblásticas MC3T3, contendo 1500 células, sobre cada uma das amostras. As células utilizadas apresentaram viabilidade de 90,9%.

Na figura 11 está representada a cultura de células MC3T3 -E1 Subclone 14 (ATCC CRL-2594, BCRJ 0285) utilizada para a realização do experimento de adesão celular. Para a manutenção da cultura antes e durante o experimento de adesão celular, foi utilizado meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e 100 μ g/mL de penicilina/estreptomicina. A cultura foi mantida a uma temperatura de 37 $^{\circ}$ C, com 5% de CO₂. O tempo de experimentação para adesão celular foi de 4 horas. Uma hora após a inoculação celular, foi inserido 710 μ L de meio de cultura aos poços contendo as amostras de ensaio.

Figura 11. Linhagem MC3T3 momentos antes da preparação do inoculo celular. As células apresentam formação de monocamada semiconfluente, com morfologia tipo fibroblasto, característica para a linhagem. Microscopia de luz, com contraste de fase (AxiovertA1, Zeiss).



Fonte: própria.

Após 4 horas de inoculação celular, as amostras foram retiradas da condição de incubação e foram colocadas em frascos contendo solução fixadora de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato, tendo estas sido mantidas nesta solução durante 7 dias.

Após este período, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, submetidas ao secador de ponto crítico (Leica-Wetzlar, Alemanha). Finalmente, as amostras receberam o recobrimento com ouro, com 15nm de espessura, com o equipamento de *sputtering* (Leica-Wetzlar, Alemanha), para que as amostras fossem observadas no microscópio de varredura eletrônica (FEI Quanta 250 – Oregon, EUA). A adesão de células MC3T3 aos diferentes grupos experimentais foi analisada qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura após 4 horas de ensaio.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação da temperatura superficial durante a irradiação de implantes com laser de diodo de alta potência

A Tabela 4 mostra os valores médios da variação de temperatura (em °C) e respectivos valores de desvio-padrão obtidos em todas as regiões mensuradas. Foi observado que o maior aumento de temperatura durante as irradiações se deu na região do defeito ósseo (junção osso-implante), onde localizava-se o termopar T_2 , seguido da região da junção implante-osso na superfície cervical do implante atrás do defeito ósseo (onde localizava-se o termopar T_0); seguido da região dentro do implante (onde havia o termopar T_1) e, por fim, a região de ápice do implante (onde localizava-se o termopar T_3). Tal fenômeno é esperado, pois as irradiações foram efetuadas na região do defeito ósseo e, por esta razão, a elevação de temperatura foi maior nesta região. Ainda, foi possível notar que o calor originado se propaga mais rapidamente na mesma direção do feixe laser, atingindo a região cervical do parafuso. A região do ápice do parafuso, por estar mais distante do feixe laser, é a que demora mais para aquecer, como esperado.

Ainda, após a análise estatística, foi possível observar que a irradiação dos implantes com laser de diodo de alta potência sob modo contínuo aumentou significativamente a temperatura dos mesmos quando comparado com a irradiação efetuada com o laser sob o modo pulsado, em todas as regiões analisadas. Tal fato também é esperado, pois a irradiação de forma contínua faz com que o calor seja gerado de forma constante, acumulando-se na área irradiada. A irradiação com feixes emitidos de forma pulsada permite o

resfriamento da região no momento entre os pulsos e, desta forma, o acúmulo de calor na superfície é menor.

Tabela 4. Valores das variações de temperatura médios e respectivos valores de desvio-padrão obtidos para cada termopar, na potência de 1,0 W nos modos contínuo e pulsado. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Mann-Whitney. A comparação estatística foi efetuada apenas entre as linhas da coluna.

Termopar	$\Delta T \pm \sigma$	
	<i>Contínuo</i>	<i>Pulsado</i>
0	18,9 \pm 2,6 ^a	8,9 \pm 1,1 ^b
1	21,5 \pm 1,0 ^c	12,5 \pm 1,0 ^d
2	33,1 \pm 9,9 ^e	12,7 \pm 1,9 ^f
3	5,1 \pm 0,3 ^g	1,4 \pm 0,2 ^h

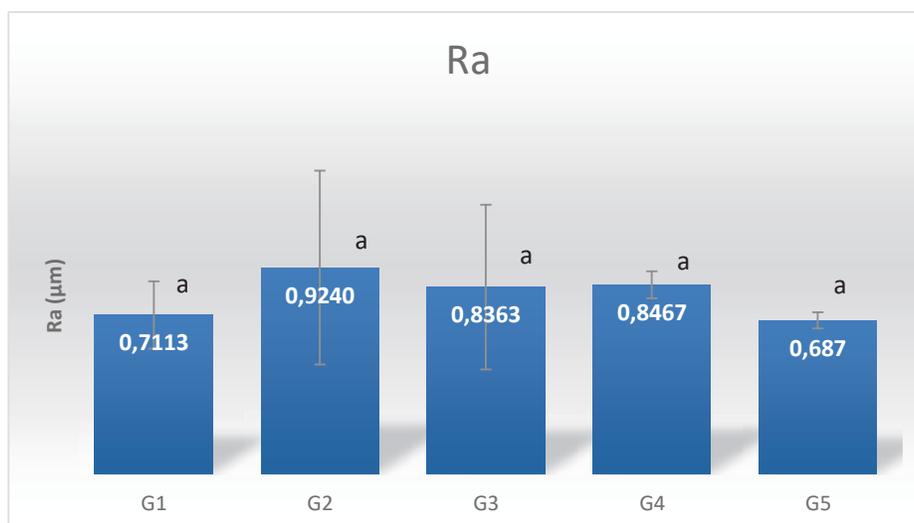
Os valores médios de temperatura encontrados durante a irradiação sob modo contínuo ultrapassam o limiar crítico de 10 °C [77] nos termopares 0, 1 e 2 (regiões atrás do defeito ósseo, dentro do implante e dentro do defeito ósseo) ao longo dos 60s de irradiação. Isso pode ter efeitos dramáticos durante a aplicação clínica pois, se esta temperatura for mantida por mais de 1 minuto, há grande probabilidade de ocorrência de necrose do tecido ósseo adjacente. Durante a irradiação com laser operando sob modo pulsado, embora as elevações de temperatura sejam estatisticamente inferiores às obtidas quando usado o modo contínuo, o limiar crítico de temperatura foi atingido nos termopares 1 (dentro do implante) e 2 (dentro do defeito ósseo), o que é crítico para a reparação óssea. Desta forma, mesmo sob modo pulsado, é recomendado que o tempo de irradiação seja diminuído em futura aplicação clínica.

6.2. Avaliação Morfológica da Superfície dos implantes

6.2.1. Rugosidade

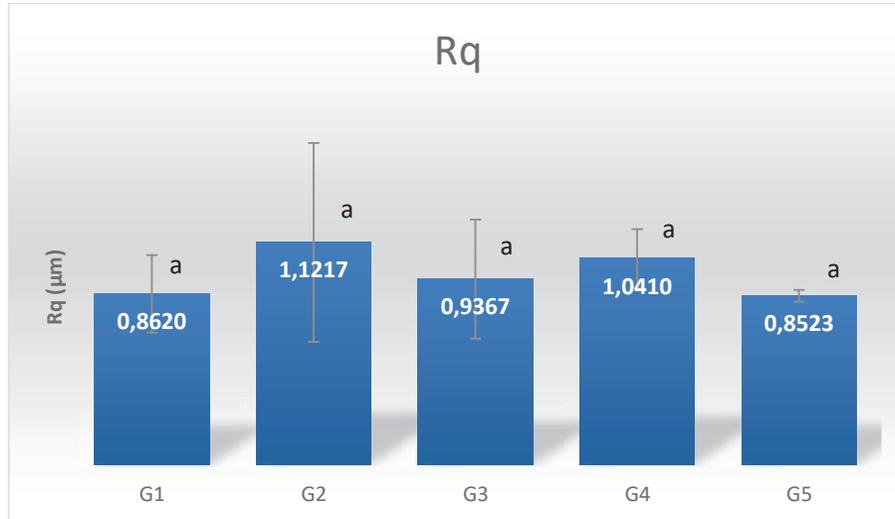
Os valores médios de rugosidade obtidos após os cinco tratamentos propostos estão ilustrados nas figuras 12 a 16 a seguir.

Figura 12. Valores médios de Ra obtidos nos discos de titânio após os diferentes tratamentos propostos para a periimplantite. As barras evidenciam desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os grupos ao nível de 5% de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.



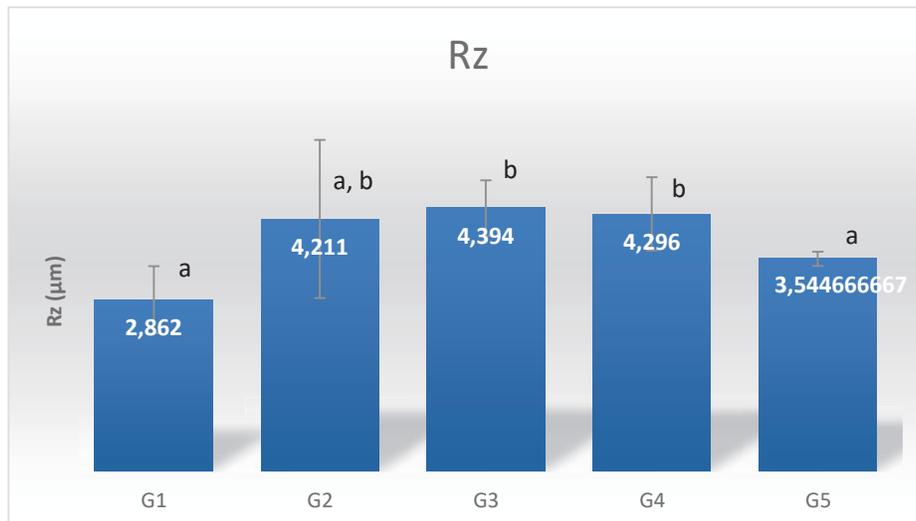
Fonte: própria.

Figura 13. Valores médios de Rq obtidos nos discos de titânio após os diferentes tratamentos propostos para a periimplantite. As barras evidenciam desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os grupos ao nível de 5% de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.



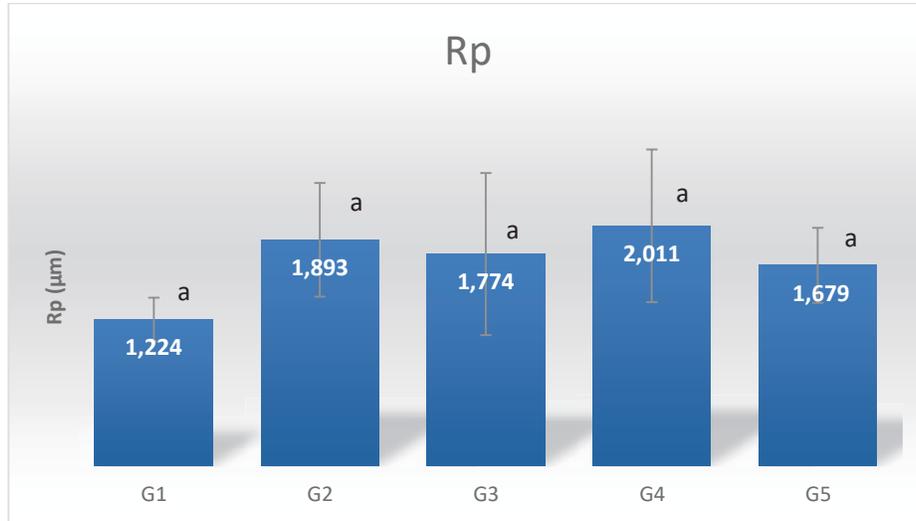
Fonte: própria.

Figura 14. Valores médios de Rz obtidos nos discos de titânio após os diferentes tratamentos propostos para a periimplantite. As barras evidenciam desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os grupos ao nível de 5% de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.



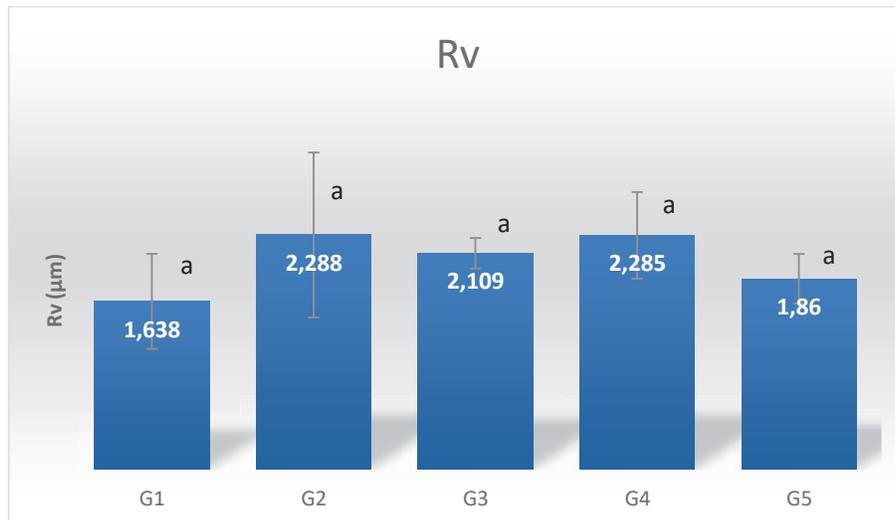
Fonte: própria.

Figura 15. Valores médios de Rp obtidos nos discos de titânio após os diferentes tratamentos propostos para a periimplantite. As barras evidenciam desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os grupos ao nível de 5% de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.



Fonte: própria.

Figura 16. Valores médios de Rv obtidos nos discos de titânio após os diferentes tratamentos propostos para a periimplantite. As barras evidenciam desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os grupos ao nível de 5% de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.



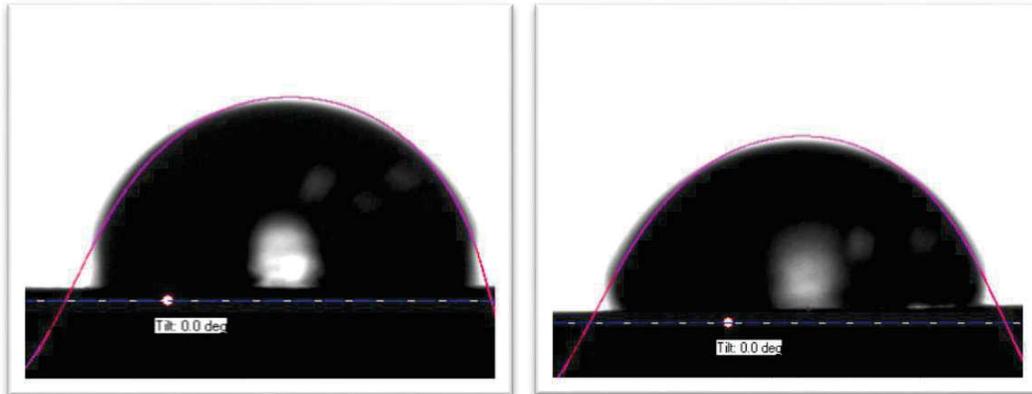
Fonte: própria.

Diante dos resultados expostos podemos notar que os grupos G3 (irradiado com laser de alta potência sob modo contínuo) e G4 (irradiado com laser de alta potência sob modo pulsado) aumentam significativamente os valores de Rz (altura máxima do perfil de rugosidade para a amostra como um todo). Este resultado sugere que o calor gerado durante as irradiações, mesmo de pequena magnitude, pode modificar a superfície dos implantes. Embora a temperatura de fusão do titânio (1725 °C) seja muito superior às temperaturas atingidas durante as irradiações, sugere-se que o calor gerado durante a irradiação laser possa ter modificado o tratamento desta superfície, tornando-a ligeiramente mais rugosa. Ressalta-se que os implantes odontológicos comerciais são tratados superficialmente com um processo físico-químico de subtração, por meio de jato abrasivo e tratamentos ácidos, que condicionam a superfície e proporcionam uma porosidade para favorecer a osseointegração. Contudo, em relação à rugosidade média, o parâmetro mais importante a ser avaliado, observa-se que nenhum dos tratamentos propostos promoveu alterações significativas, o que sugere que não haveria alteração da neo osseointegração nos implantes tratados, no caso de uma futura aplicação clínica.

6.2.2. ÂNGULO DE CONTATO

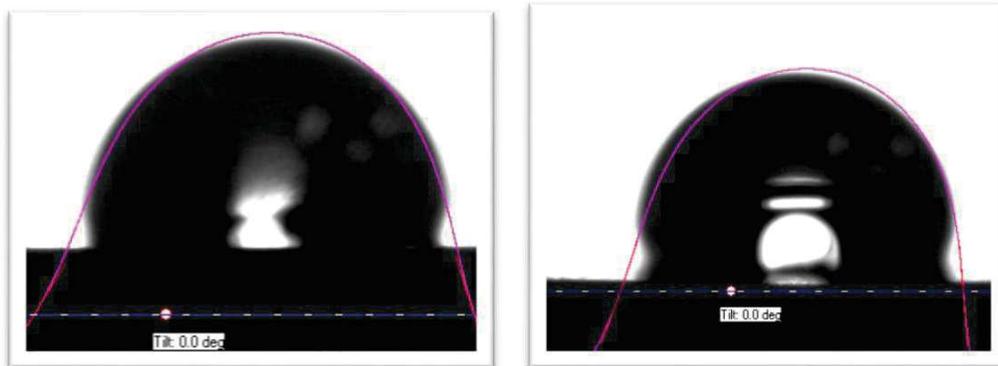
As Figuras 17 e 18 ilustram os ângulos de contato observados nos diferentes grupos experimentais antes dos tratamentos, cujos valores de média e desvio padrão encontram-se na Tabela 5.

Figura 17. Discos 1(Grupo G1) e 2(Grupo G2) antes do tratamento, apresentando respectivamente os ângulos de contato mostrados na Tabela 5.



Fonte: própria.

Figura 18. Discos 3 (Grupo G3) e 4 (Grupo G4) antes do tratamento, apresentando respectivamente os ângulos de contato mostrados na Tabela 5.



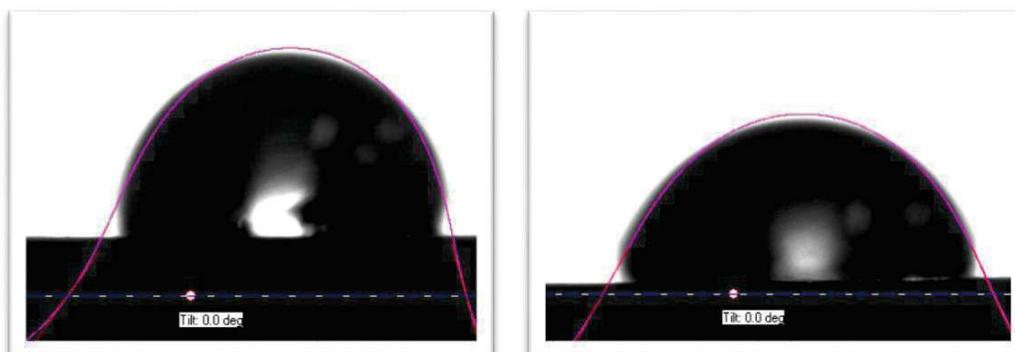
Fonte: própria.

Tabela 5. Valores de médias e desvios-padrão para cada um dos discos antes do tratamento. θ_L = ângulo de contato do lado esquerdo; θ_r = ângulo de contato do lado direito.

Ângulo de contato antes do tratamento		
Grupo	média θ_L	média θ_r
G1	69,31 \pm 1,75	73,15 \pm 2,52
G2	85,66 \pm 2,35	78,73 \pm 4,91
G3	74,60 \pm 3,73	76,35 \pm 1,25
G4	76,51 \pm 2,83	79,53 \pm 1,70

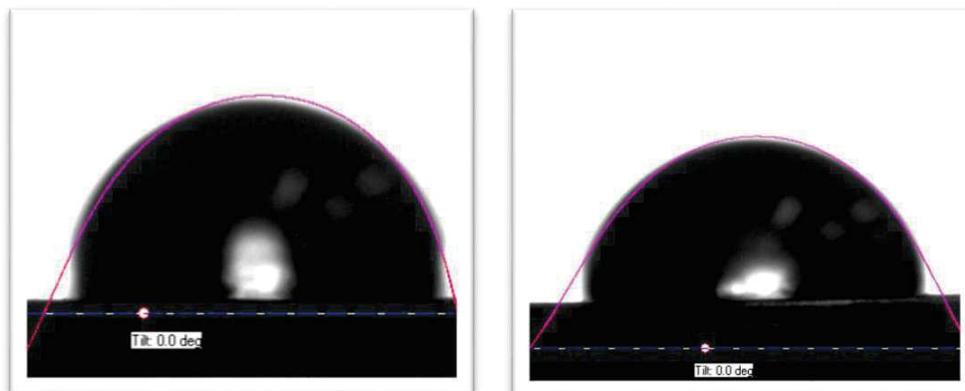
As Figuras 19 e 20 ilustram os ângulos de contato observados após os tratamentos propostos, assim como a Tabela 6 apresenta os valores de média e desvio-padrão obtidos.

Figura 19. Discos 1(Grupo G1) e 2(Grupo G2) após o tratamento, apresentando respectivamente os ângulos de contato mostrados na tabela 6.



Fonte: própria.

Figura 20. Discos 3(Grupo G3) e 4(Grupo G4) após o tratamento, apresentando respectivamente os ângulos de contato mostrados na tabela 6.



Fonte: própria.

Tabela 6. Valores de média e desvio padrão para cada um dos discos após o tratamento. θ_L = ângulo de contato do lado esquerdo; θ_r = ângulo de contato do lado direito.

Ângulo de contato <u>após</u> o tratamento		
Grupo	Média $\theta_L \pm \delta$	Média $\theta_r \pm \delta$
G1	72,30 \pm 3,69	77,31 \pm 6,83
G2	87,15 \pm 2,11	80,66 \pm 5,41
G3	75,59 \pm 3,63	78,68 \pm 0,69
G4	78,17 \pm 2,94	81,50 \pm 1,38

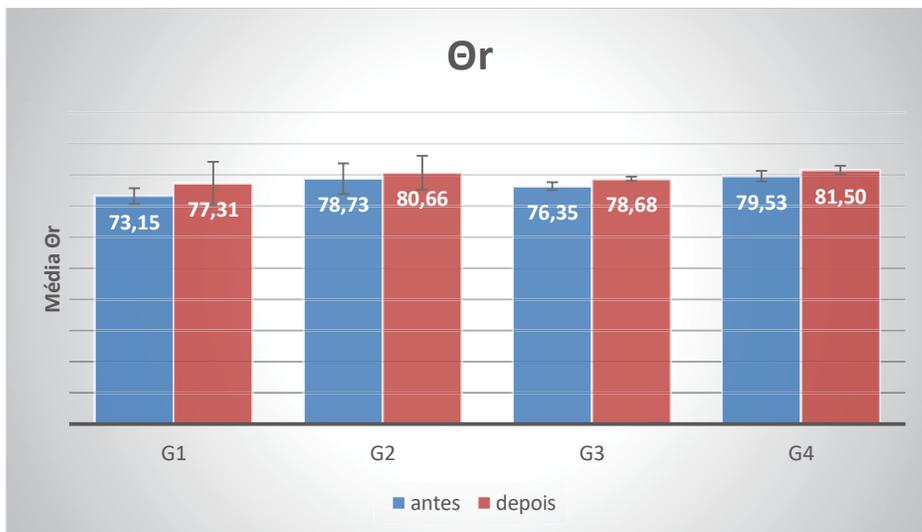
As Figuras 21 e 22 a seguir ilustram a comparação entre os valores de ângulo de contato direito e esquerdo obtidos antes e depois os tratamentos. É possível observar que nenhum dos tratamentos promoveu alterações significativas nestes valores ($p > 0,05$ em todas as comparações estatísticas efetuadas), o que implica dizer que não há alterações na molhabilidade do titânio decorrentes dos tratamentos propostos neste estudo.

Figura 21. Valores médios de Θ_L obtidos nos discos de titânio após os diferentes tratamentos propostos para a periimplantite. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: própria.

Figura 22. Valores médios de Θ_r obtidos nos discos de titânio após os diferentes tratamentos propostos para a periimplantite. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: própria.

A molhabilidade de um material diz muito sobre a composição e morfologia de sua superfície. É importante considerar que os ângulos tomados no intervalo

de 0 a 90° são considerados molhamentos parciais; por outro lado, para ângulos de 0° há o molhamento completo e 180° molhamento ausente [75]. Analisando os resultados obtidos neste estudo, foi possível observar que antes e depois dos tratamentos a molhabilidade das amostras analisadas foi parcial, ou seja, tais superfícies permanecem hidrofílicas após os tratamentos.

A literatura reporta que as superfícies hidrofílicas mantêm a conformação e a função das proteínas séricas durante o processo de osseointegração, enquanto que os implantes hidrofóbicos podem promover desnaturação das mesmas ao exercer alterações conformacionais [78]. Além disso, um alto grau de hidrofílicidade pode promover a diferenciação e a maturação dos osteoblastos, contribuindo para uma aceleração da osseointegração [79]. Desta forma, os resultados observados no presente estudo sugerem que tanto a irradiação com laser de alta potência quanto a terapia fotodinâmica não alteram as características iniciais dos implantes e, desta forma, parecem não exercer influência na neo osseointegração.

Levando-se em conta que as características físico-químicas da superfície do substrato têm ligação direta à aderência e proliferação celular [76], ou seja, de sua biocompatibilidade e, assim, interferem na sua osseointegração, os resultados para a não alteração do ângulo de contato são importantes uma vez que o material dos discos, assim como dos parafusos, possuem tratamento comercial para que haja a adesão celular e osseointegração ainda mais facilitada, tratamento que faz com que o uso de uma marca seja mais atrativa que outra, ou que seja reduzido o tempo de osseointegração. Quando temos resultados onde todos os ângulos de

molhamento (tanto direito quanto esquerdo) se mantem dentro do range de molhamento parcial, ainda que considerando os desvios padrão para cada uma das médias, podemos inferir que nenhum dos tratamentos propostos altera a hidrofiliçidade do material, não prejudicando ou inibindo a adesão celular.

De acordo com a hipótese proposta no início deste estudo, em nenhuma das fases experimentais foi constatado que a irradiação com laser de diodo de alta potência ou terapia fotodinâmica, sob as condições testadas, inibam ou causem mudanças microestruturais superficiais suficientes para que a adesão e proliferação celular seja prejudicada [72].

6.3. Avaliação de Adesão Celular

A descrição dos resultados de adesão celular será efetuada separadamente para cada grupo experimental.

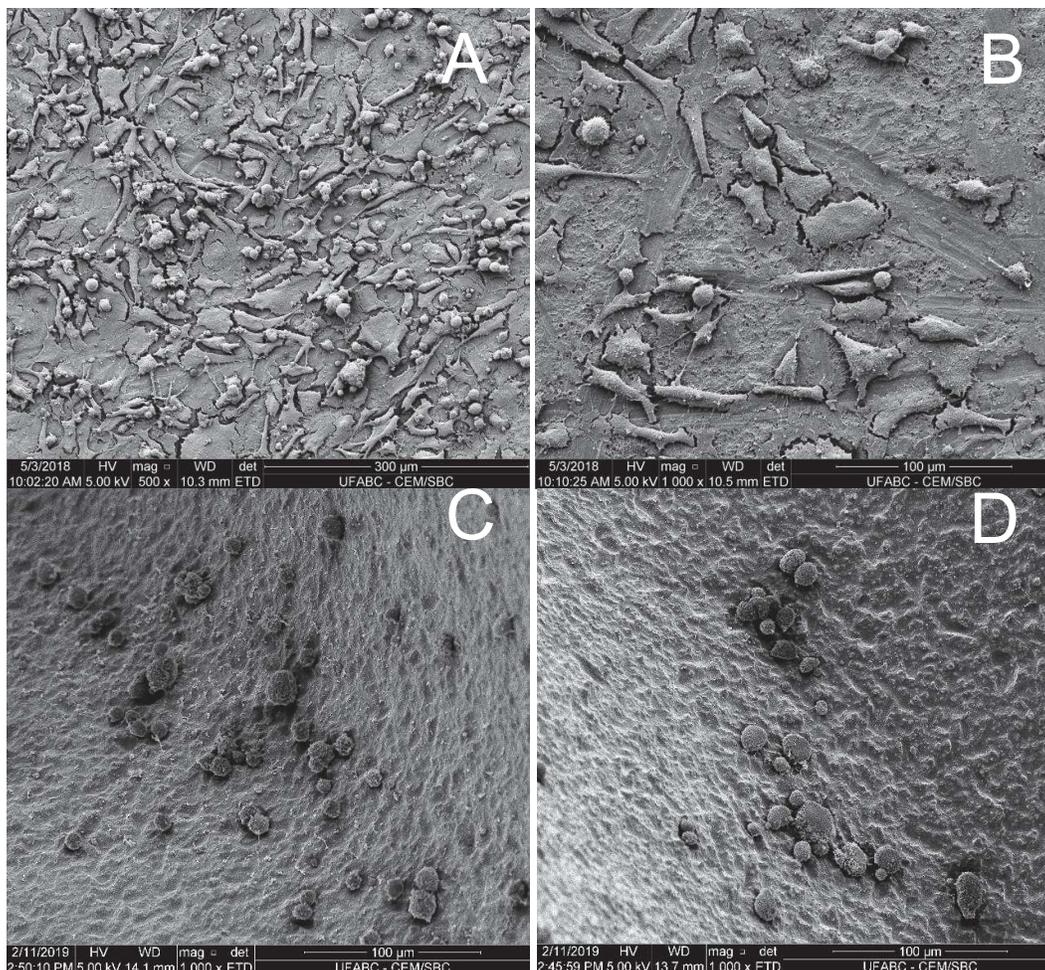
- **GRUPO 1 (Tratamento com raspagem com cureta metálica + clorexidina 0,02% - controle positivo)**

A Figura 23 evidencia a interação de células tanto nos discos de titânio (Figuras 23 A, B) quanto nos parafusos de mesmo material (Figuras 23 C, D), porém em densidades menores quando comparados os parafusos em relação aos discos.

Quanto à adesão celular, sabe-se que pré-osteoblastos, do tipo MC3T3, têm preferência em adesão para materiais que apresentem maiores rugosidades,

as quais facilitam a ancoragem celular [74]. Tais rugosidades podem ser causadas de maneira física ou química, sendo estas causados pelo tratamento superficial do implante, isto é, a subtração ácida específica, tratamento que diferencia os implantes comercialmente. O aumento da rugosidade e, por sua vez, da molhabilidade, podem proporcionar uma superfície mais convidativa à adesão e proliferação da célula.

Figura 23. Eletromicrografias representativas obtidas para o Grupo G1 (Raspagem e clorexidina – controle positivo). Adesão de células MC3T3. A, B: Discos de Titânio; C, D: Parafusos. Magnificação original = 500 x (A e C) e 1000 x (B e D).



Fonte: própria.

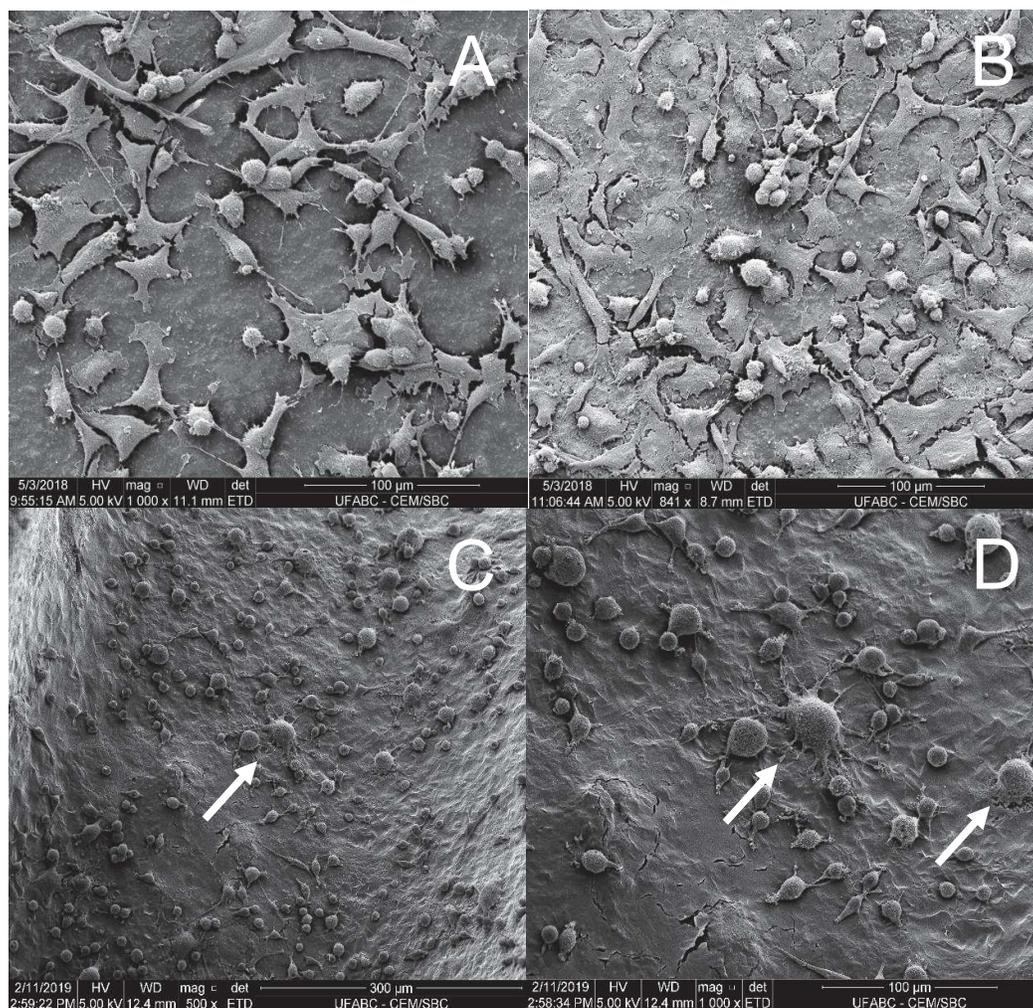
Podemos notar que, no grupo G1, tanto no disco de titânio quanto no parafuso de mesmo material, houve adesão celular; no entanto, para cada superfície, é notável a diferença morfológica das amostras analisadas (discos x parafusos comerciais) e da interação celular com as superfícies. Nos discos de titânio (imagem A e B da figura 23), podemos notar uma adesão celular de maneira mais densa com morfologia celular mais espalhada, como se desse início à uma camada celular de interface (osso-implante). Já, para o parafuso, é notável que a afinidade celular se dá na região dos sulcos, demonstrando ainda neste estágio a fixação, porém sem apresentação de espalhamento celular. De acordo com Killian *et al.* [77], isto pode ocorrer porque a geometria do substrato pode alterar a diferenciação celular, não só quanto à sua morfologia, porém também quanto ao seu tempo de adesão e proliferação. Em geometrias mais irregulares, as células demandam mais energia em sua contratilidade e aderência que quando em superfícies planas, além da competição espacial para geometrias menores [77].

- **GRUPO 2 (Tratamento com terapia fotodinâmica)**

Neste grupo experimental, as diferenças entre a adesão nas amostras de discos (Figuras 24 A, B) e de parafusos (Figuras 24 C, D) também pode ser verificada, em padrão similar ao descrito para o grupo G1. Em G2 podemos observar igual adesão celular; no entanto, pode-se observar maior número de células aderidas e com maior interação com os parafusos. Algumas células apresentam protruções citoplasmáticas características de ancoragem ao

substrato. Este padrão não foi observado para as células aderidas aos parafusos no grupo G1; porém, a localização preferencial nos sulcos foi mantida.

Figura 24. Eletromicrografias representativas obtidas para o Grupo G2 (terapia fotodinâmica). Adesão de células MC3T3. A, B: Discos de Titânio; C, D: Parafusos. Magnificação original = 500 x (A e C) e 1000 x (B e D). As setas evidenciam os prolongamentos citoplasmáticos das células.



Fonte: própria.

A terapia fotodinâmica tem se mostrado como uma terapia adjunta eficiente no tratamento da periimplantite [80]. Para isso, a eliminação de microrganismos

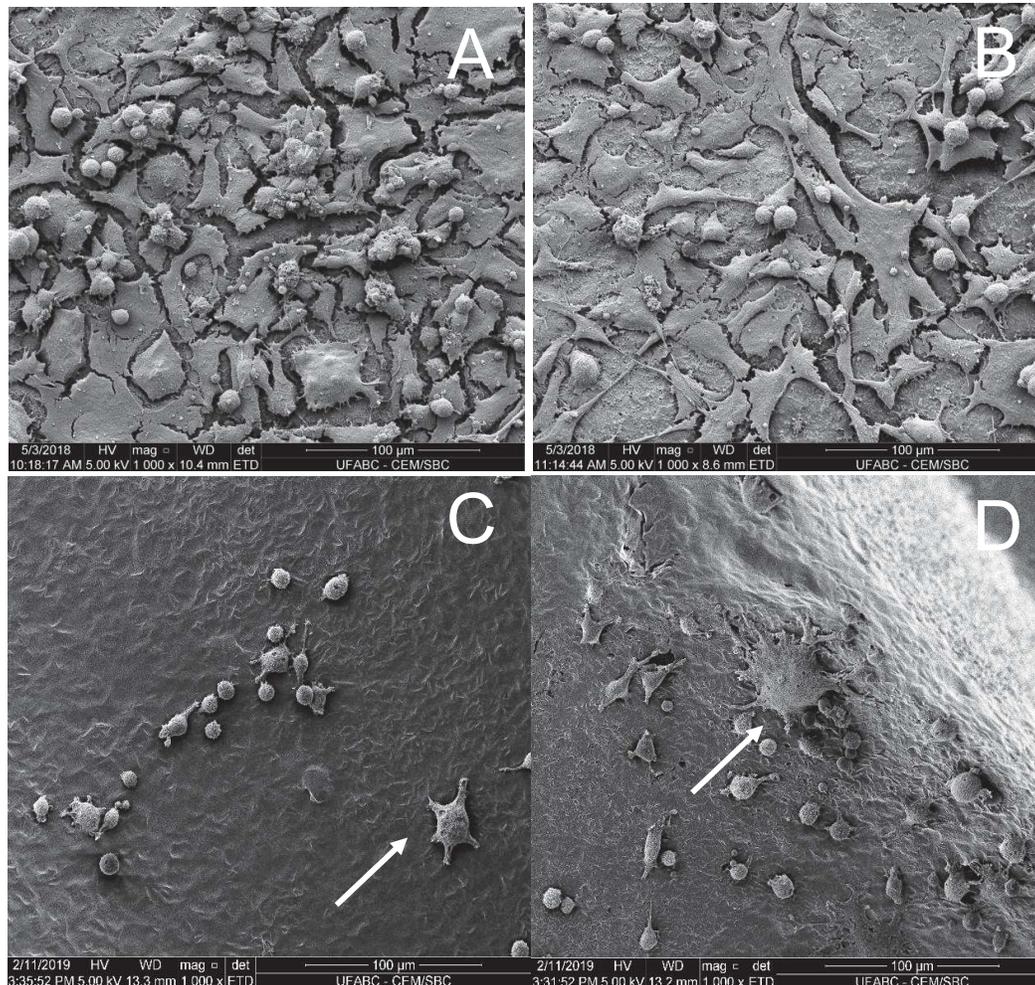
presentes localmente se dá através da geração de substâncias tóxicas, tais como espécies reativas de oxigênio e radicais livres. No presente estudo, comprovou-se que a PDT não influenciou a adesão de pré-osteoblastos, pois tais substâncias tóxicas parecem já ter sido completamente eliminadas da superfície no momento do cultivo celular. Ainda, o tratamento com PDT parece ter favorecido a adesão celular, pois há maior número de células aderidas quando comparado com o grupo G1. Desta maneira, pode-se inferir que o tratamento da periimplantite com PDT, usando-se azul de metileno e laser vermelho, favorece a neo osseointegração.

- **GRUPO G3 (Tratamento com laser diodo de alta potência com emissão contínua)**

Na Figura 25 pode-se observar a adesão celular de maneira espalhada nos parafusos conforme indicado nas eletromicrografias (C e D), com células com prolongamentos (setas), o que indica afinidade celular quanto à superfície.

No grupo experimental G3, as diferenças entre a adesão celular nas amostras de discos (Figuras 25 A, B) e de parafusos (Figuras 25 C, D) também podem ser verificadas; no entanto, com padrão distinto ao descrito para o grupo G1. Nas amostras de disco (Figuras 25 A, B), pode ser verificada uma quantidade maior de células, bastante alongadas, formando uma monocamada de células aderidas e espalhadas sobre o material, permitindo inferir que o tratamento com laser de alta potência sob o modo contínuo parece ter favorecido o processo de interação com as células MC3T3.

Figura 25. Eletromicrografias representativas obtidas para o Grupo G3 (tratamento com laser de diodo de alta potência emissão contínua). Adesão de células MC3T3. A, B: Discos de Titânio; C, D: Parafusos. Magnificação original = 1000 x. As setas evidenciam os prolongamentos citoplasmáticos das células.



Fonte: própria.

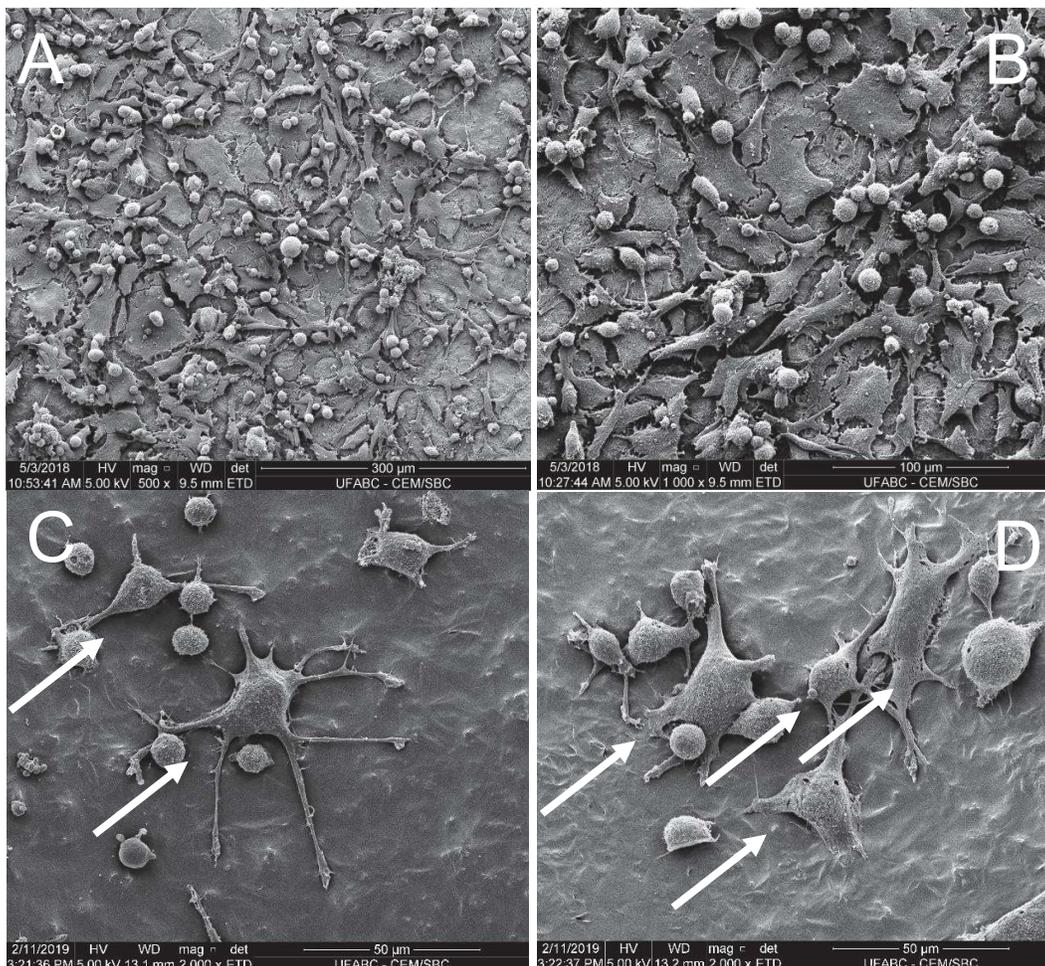
De forma similar, a adesão e o espalhamento das células sobre os parafusos também foram favorecidos pelo tratamento proposto para o grupo G3. Apesar da menor quantidade de células em relação aos discos, estas se localizam preferencialmente nos sulcos dos parafusos e apresentam prolongamentos nos locais de adesão ao biomaterial, em padrão distinto daquele observado nos grupos anteriores, caracterizando maior interação celular (Figuras 25 C, D). Esta

adesão pode ter sido favorecida pelas alterações promovidas pelo aquecimento na superfície dos implantes, já demonstrada também na análise de rugosidade (aumento do parâmetro Rz). Tal parâmetro reflete em picos e vales maiores, fazendo com que a seção de interface do substrato se torne de certa forma mais convidativo à adesão celular, uma vez que sabemos que a adesão celular se dá preferencialmente em superfícies mais rugosas [74]. Desta forma, parece que a irradiação da superfície com laser de diodo de alta potência, nos parâmetros estudados, pode favorecer a neo osseointegração. Contudo, deve-se levar em consideração que as elevações de temperatura detectadas neste estudo podem ser danosas para a vitalidade celular e, assim, comprometer tal neo osseointegração. Para que isso não ocorra em uma futura aplicação clínica, sugere-se duas estratégias: ou realizar as irradiações sob modo pulsado ou diminuir o tempo de irradiação, fazendo com que o calor gerado na superfície seja minimizado. Contudo, novas avaliações tanto de temperatura quanto microbiológicas e de adesão celular se fazem necessárias.

- **GRUPO G4 (Tratamento com laser diodo de alta potência com emissão pulsada)**

No grupo G4, podemos observar que, após a inoculação celular, a adesão celular é abundante, com células de morfologia alongada demonstrando afinidade celular quanto ao substrato, o titânio, tanto nas amostras de discos quanto nas amostras de parafusos de mesmo material. Na figura 26, podemos notar prolongamentos citoplasmáticos, os quais sinalizam espalhamento celular, com o intuito de criar uma camada celular para revestir a superfície.

Figura 26. Eletromicrografias representativas obtidas para o Grupo G4 (tratamento com laser de diodo de alta potência com emissão pulsada). Adesão de células MC3T3. A, B: Discos de Titânio; C, D: Parafusos. Magnificação original = 500 x (A), 1000 x (B) e 2000 x (C e D). As setas evidenciam os prolongamentos citoplasmáticos das células.



Fonte: própria.

Para G4 as diferenças entre a adesão nas amostras de discos (Figuras 26 A, B) e de parafusos (Figuras 26 C, D) foram observadas em padrão similar ao descrito para o grupo G3. Nas amostras de disco, pode ser verificada uma quantidade ainda maior de células, bastante alongadas, formando uma monocamada aderente, inclusive com células sobrepostas à monocamada, indicativo de intensa interação com o substrato (disco de titânio), permitindo

observar que o tratamento com laser de alta potência em modo pulsado favoreceu ainda mais o processo de interação com as células MC3T3 (Figuras 26 A, B), em relação ao laser de emissão contínua. De forma similar, a adesão e o espalhamento das células sobre os parafusos também foram favorecidos pela aplicação do laser pulsado no grupo G4. As células ficaram aderidas preferencialmente nos sulcos dos implantes, e apresentam longos prolongamentos citoplasmáticos, bom espalhamento e regiões similares ao padrão observado para os discos de titânio, resultando no melhor resultado de interação celular avaliado por este estudo (Figuras 26 C, D).

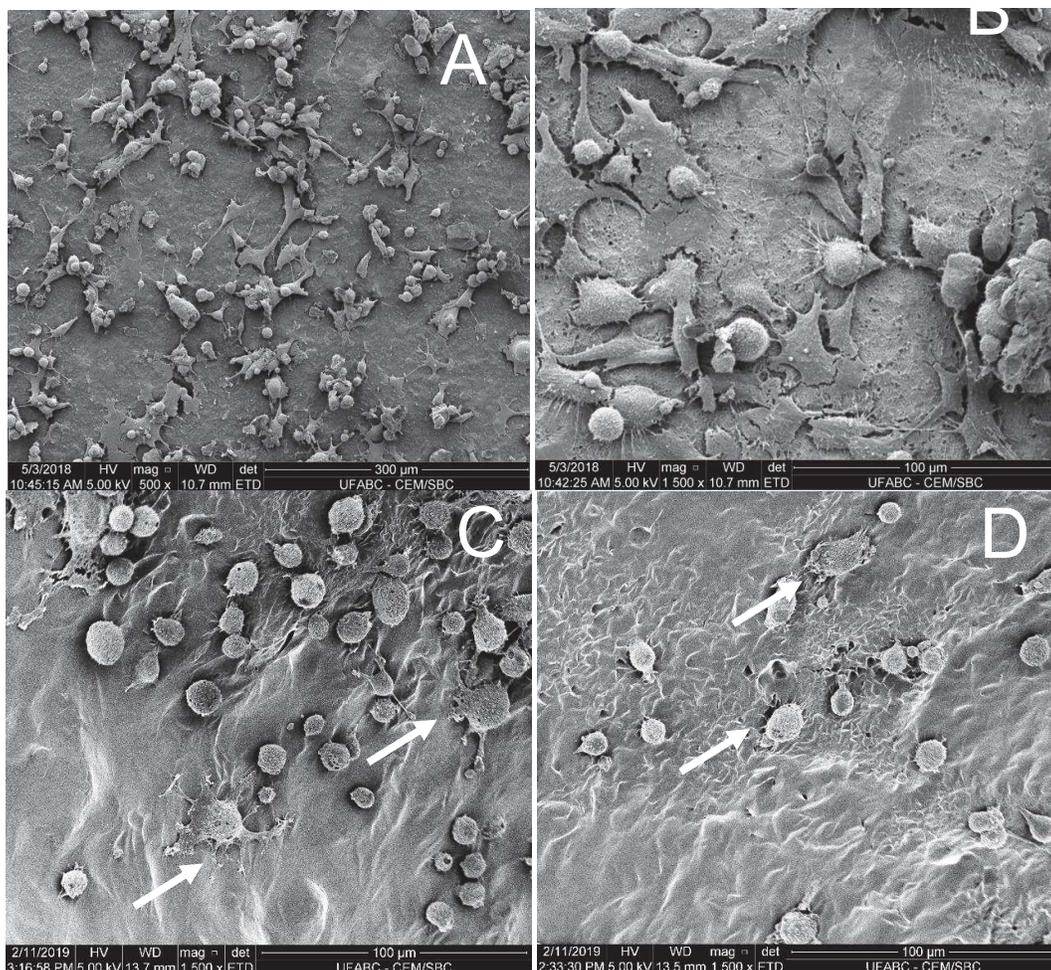
Conforme elucidado anteriormente, a irradiação com laser de alta potência, seja sob a forma pulsada ou contínua, resultou em alteração na rugosidade do material (aumento do parâmetro Rz), com uma tendência de aumentar também a molhabilidade, embora não sendo observada diferença significativa em relação à amostra sem tratamento. Assim, sugere-se que o calor gerado pela irradiação sob modo pulsado, embora de menor magnitude que o gerado durante a emissão contínua, também causou modificações no tratamento superficial do titânio, favorecendo a adesão celular. Ainda, considerando os resultados de temperatura obtidos neste estudo, sugere-se que o tempo de irradiação seja diminuído (menor que 60s), para que não seja gerado calor tal que prejudique a vitalidade celular em uma futura aplicação clínica.

- **GRUPO G5 (Sem tratamento - controle negativo)**

A Figura 27 ilustra a adesão celular tanto nos discos quanto nos parafusos de titânio sem qualquer tratamento. É possível evidenciar que há adesão celular

também neste grupo, porém em menor grau como observados nos grupos G3 e G4. As células apresentam, como nos outros grupos, prolongamentos citoplasmáticos, o que indica o início da atividade celular a fim de não só aderir como também recobrir a superfície do substrato com uma camada celular. Este mecanismo é o que caracteriza o primeiro estágio da osseointegração, a criação de uma densa camada de células aderidas ao material interagindo entre si.

Figura 27. Eletromicrografias representativas obtidas para o Grupo G5 (sem tratamento – controle negativo). Adesão de células MC3T3. A, B: Discos de Titânio; C, D: Parafusos. Magnificação original = 500 x (A) e 1500 x (B, C e D).



Fonte: própria.

A observação da adesão celular ao grupo controle (G5) foi distinta para os discos de titânio (Figuras 27 A, B) e parafusos do mesmo material (Figuras 27 C, D), conforme reportado anteriormente. O padrão observado no grupo G1 de tratamento, raspagem e irrigação com clorexidina, se assemelha ao grupo controle negativo, ou seja, o primeiro tratamento proposto, considerado como principal alternativa clínica no tratamento da periimplantite, não altera a neo osseointegração pois não modifica a rugosidade nem a molhabilidade do material, conforme demonstrado nas análises anteriores. As células aderidas aos implantes apresentam morfologia arredondada, adesão celular inicial, com poucas exceções (Figuras 27 C, D).

Desta maneira, de acordo com as análises efetuadas, foi possível comprovar que nenhum dos tratamentos propostos para tratamento da periimplantite prejudica a neo osseointegração. Contudo, a irradiação com laser de alta potência ou tratamento com terapia fotodinâmica parecem ter favorecido este processo. Contudo, ressalta-se a necessidade de se avaliar menores tempos de irradiação para o laser de alta potência, ou mesmo efetuar as irradiações adicionando um intervalo entre as varreduras horizontal e vertical, de forma que a geração e, conseqüentemente, propagação do calor pelo implante e pelo tecido ósseo sejam minimizadas. Com isso, pode-se estabelecer parâmetros seguros e eficazes para tratamento clínico.

7. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia proposta e os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que a irradiação de implantes odontológicos de titânio grau IV com laser de diodo de alta potência ou terapia fotodinâmica favorecem a adesão de células pré-osteoblásticas, sendo o tratamento com laser de alta potência o que possibilitou maior adesão celular. Tal efeito pode estar relacionado ao aumento do parâmetro Rz decorrente do aumento de temperatura local; porém, nenhum dos tratamentos propostos alterou a molhabilidade do material. Para futura aplicação clínica, sugere-se que o laser de alta potência seja aplicado de forma pulsada e com menor tempo de irradiação, evitando-se o acúmulo de calor que possa ser nocivo ao tecido adjacente.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal - Resultados Principais. Ministério da Saúde [internet]. 2011 1(1):22-23 [citado em 5 de março de 2019]. Disponível em: http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf
2. Enami E, Souza RF, Kabawat M. The Impact of Edentulism on Oral and General Health. *International Journal of Dentistry*. 2013; 6(10):1-2.
3. Faverani LP. Implantes osseointegrados: evolução e sucesso. 2011; 30(1):47-58.
4. Taylor TD, Agar JR. Twenty years of progress in implant prosthodontics. *J Prosthodontics*. 2002; 88:89-95.
5. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000; 21(7):667-81.
6. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983; 50(3):399-410.
7. Schroeder A. The reaction of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with plasma-sprayed titanium surfaces. *J Maxillofac Surg*. 1981; 9(1):15-25.
8. Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*. 1983; 4(1):25-8.
9. Kreisler M, Götz 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.
10. Gómez-Santos L, Arnabat-Domínguez J, Sierra-Rebolledo A, Gay-Escoda C. Thermal increment due to ErCr:YSGG and CO₂ laser irradiation of different implant surfaces. A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15(5):e782-7.
11. Kreisler M, Al Haj H, Götz H, Duschner H, d'Hoedt B. Effect of simulated CO₂ and GaAlAs laser surface decontamination on temperature changes in Ti-plasma sprayed dental implants. *Lasers Surg Med*. 2002; 30(3):233-9.

12. Pompa CC, Ribeiro EDP. Periimplantite: Diagnóstico e tratamento. *Innov. Implant J., Biomater.* 2009; 4(1):52-57.
13. Hemlata G. Periimplantitis and Lasers – A Review. *Int J Biol Med Res.* 2012; 3(3):2302-2305.
14. Andrade AKP, De Michele G, Feist IS. Utilização do laser de diodo de alta potência em periodontia e implantodontia: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo* 2007 set-dez; 19(3):312-9
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 Implant.* 2003; 14:91–96.
16. Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent.* 1983; 50:101-107.
17. Cunha-Cruz J, Hujoel PP, Nadanovsky P. Secular trends in socio-economic disparities in edentulism: USA, 1972–2001. *Journal of Dental Research.* 2007; 86(2)131-136.
18. Muller F, Naharro M, Carlsson GE. What are the prevalence and incidence of tooth loss in the adult and elderly population in Europe?. *Clinical Oral Implants Research.* 2007; 18(3)2-14.
19. 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.
20. Fandrilis J, Papadopoulos T. Surface characterization of three titanium dental implants. *Implant Dent.* 2008; 17(1):91-99.
21. Bjorn K., Hultin M, Berglundh T. Periimplantitis. *Dent Clin.* 2005; (49):661-676.
22. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 1998; (17):63-76.
23. Hwar, F, Nuesry E, Bieling K, Herten M, Becker JJ. Influence of an erbium-doped yttrium, scandium, gallium, and garnet (Er,Cr:YSGG) laser on the reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium implant surface. *Periodontol.* 2006; 77(11):1820-1827.

24. Tallarico M, Canullo L, Caneva L, Özcan M. Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on periimplantitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Prosthodontic Research*. 2017(61):3, 233-241.
25. Martins MC, Shibli JÁ, Abi-rached RS, Marcantonio E JR. Progression of experimental chronic peri-implantitis in dogs: clinical and radiographic evaluation. *J Periodontol*. 2005; 76(8):1367-1373.
26. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 1998; 17:63-76.
27. Tillmanns HW, Hermann, JS, Tiffée JC, Burgess AV, Meffert RM. Evaluation of three different implants in ligature-induced peri-implantitis in the beagle dog. Part II. Histology and microbiology. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 1998; 13(1):59-68.
28. Moreira RCQ. Abordagem clínica da periimplantite, *Rev Bras Implantodon Protese Implant*. 2006; 13(51):150-154.
29. Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby, L. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12(6):366-372.
30. Moreira NA, Ferreira RQ. Periimplantites: etiologia e diagnóstico. *Arq Odontol*. 2000; 36:123-130.
31. Baron M, Haas R, Dörtbudak O, Watzek G. Experimentally induced peri-implantitis: a review of different treatment methods described in the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15(4):533-544.
32. 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; 19:150-154.
33. Renvert S, Roos-Jansaker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of periimplant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol* 2008;35(8 Suppl):305-15.

34. Duarte P, Reis AF, De Freitas PM, Ota-Tsuzuki C. Bacterial adhesion on smooth and rough surfaces after treatment with different instruments. *J Periodontol.* 2009; 80(11): 1824-1832.
35. Heitz M, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant disease. *Int J Maxillofac Implants.* 2004; (suppl19):128-139.
36. Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Maxillofac Implants.* 2004; 19:140-149.
37. Gutknecht, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence, 2004:320p.
38. Renvert S, Lessem J, Dahlén 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):836-844.
39. Deppe H, Horch H. Laser applications in oral surgery and implant dentistry. *Laser Med Sci* 2007; 22(4):217-221.
40. Jorge ACT, Cassoni A, Rodrigues J A. APLICAÇÕES DOS LASERS DE ALTA POTÊNCIA EM ODONTOLOGIA. *Revista Saúde – UNG –SER* 2010; 4(3).
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Zanin ICJ, Brugnera Jr A. Terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal. *Rev PerioNews* 2007;1(1):79-85.

46. Alshehri FA. The role of lasers in the treatment of peri-implant diseases: A review, *The Saudi Dental Journal*. 2016 (28):3,103-108.
47. MAROTTI J, TORTAMANO-NETO P, WEINGAR D. Aplicação da Terapia Fotodinâmica e Laserterapia em Implantodontia. [Dissertação de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2015.
48. 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; 25(2):124-8.
49. Leja C, Geminiani A, Caton J, Romanos GE. Thermodynamic effects of laser irradiation of implants placed in bone: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(6):1435-40.
50. Tavares LJ, Pavarina AC, Vergani CE, Avila ED. The impact of antimicrobial photodynamic therapy on peri-implant disease: What mechanisms are involved in this novel treatment?. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2017 (17):236-244.
51. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001;74(5):656-69.
52. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005;79(2):159-70.
53. 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.
54. Van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel)*. 2017 Feb 18;9(2).
55. 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.
56. 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.

57. 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.
58. 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.
59. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18(1):51-5.
60. Gowri Sivaramakrishnan, Kannan Sridharan, Photodynamic therapy for the treatment of peri-implant diseases: A network meta-analysis of randomized controlled trials, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018; (21) 1-9.
61. Garcia VG, Theodoro LH, Almeida JM. Considerações atuais dos lasers no tratamento periodontal. *Rev PerioNews* 2007;1(1):52-8.
62. Romanos G, Crespi R, Barone A, Covani U. Osteoblast attachment on titanium disks after laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006 Mar-Apr; 21 (2): 232-6.
63. Depprich, R., Ommerborn, M., Zipprich, H., Naujoks, C., Handschel, J., Wiesmann, H.P., Kübler, N.R., Meyer, U. (2008) Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head & Face Medicine* 8: 4-29.
64. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000 Apr; 21 (7): 667- 81. Review.
65. Kohal, R.J., Weng, D., Bächle, M. & Strub, J.R. (2004) Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *Journal of Periodontology* 75: 1260–1266.
66. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int* 1994 Jun; 18 (6): 617-28

67. CRAIGHEAD, H. G., JAMES, C. D., TURNER, A. M. P. Chemical and topographical patterning for direct cell attachment. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. 2001; 5 (2-3): 177-84.
68. AMARANTE, E. S., LIMA, L. A. Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido-estado atual. *Pesqui. Odonto. Brás*. 2001; 15 (2): 166-73.
69. ANSELME, K., BIGERELLE, M., NOEL, B. et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J. Biomed. Mater. Res*. 2000a.;49: 155-66.
70. NEBE, J. G. B., LUETHEN, F., LANGE, R. et al. Cellular activity and biomaterial's surface topography. *Mater. Sci*. 2007; 539-43.
71. WANG, D. et al. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Min Res*, v.14, p. 893-903, 1999
72. 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.
73. MAIORANA, C.; SALINA, S.; SANTORO, F. Treatment of periimplantitis with diode laser: A clinical report. *J Oral Laser ns*. 2002
74. Lagonegro P, Trevisi G, Nasi L, Parisi L, Manfredi E, Lumetti S, Rossi F, Macaluso GM, Salviati G, Galli C. Osteoblasts preferentially adhere to peaks on micro-structured titanium. *Dent Mater J*. 2018 Mar 30;37(2):278-285.
75. R. Voytovych, F. Robaut, N. Eustathopoulos, "The relation between wetting and interfacial chemistry in the CuAgTi/alumina system". *Acta Mater*. 54, 8 (2006) 2205-2214.
76. Aires M, Rocha H, Galvao N, Neto C, Junior C. Analysis of the cell preference in different Ti surfaces exposed to the same culture environment. *Rev. bras. Odontol*. Jan./jun. 2011v. 68, n. 1, p. 110-4.
77. Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* 1983;50:101-107.

78. Osseointegration--communication of cells. Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Oct; 23(10):1127-35.
79. Zhao G., Schwartz Z., Wieland M., et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research—Part A.* 2005;74(1):49–58. doi: 10.1002/jbm.a.30320.
80. Wang H, Li W, Zhang D, Li W, Wang Z. Adjunctive photodynamic therapy improves the outcomes of peri-implantitis: a randomized controlled trial. *Aust Dent J.* 2019 Sep;64(3):256-262.