

333UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RENATA RODRIGUES DE FREITAS BLAGITZ

**Análise microbiológica comparativa da ação de diferentes agentes
descontaminantes sobre superfícies de titânio**

BAURU
2011

RENATA RODRIGUES DE FREITAS BLAGITZ

**Análise microbiológica comparativa da ação de diferentes agentes
descontaminantes sobre superfícies de titânio**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

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

BAURU
2011

B572a

Blagitz, Renata Rodrigues de Freitas
Análise microbiológica comparativa da ação de diferentes agentes descontaminantes sobre superfícies de titânio / Renata Rodrigues de Freitas Blagitz. – Bauru, 2011.

89 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 020/2011
Data: 30/03/2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

05 de julho de 1975

Nascimento: Botucatu – SP

1994-1997

Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo

1990-2002

Mestrado em Odontologia, área de concentração Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo

2007-2011

Doutorado em Odontologia (Reabilitação Oral), área de concentração Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

A TUDO de mais especial que tenho:

*Dahyl, Henrique e Ana
Clara*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao querido **André**, que me acolheu no departamento de microbiologia e possibilitou a concretização deste trabalho.

À Prof. Dra. **Maria Lúcia Rubo de Rezende** que aceitou me orientar sem nem mesmo me conhecer.

Às colegas **Samira** e **Roberta** que tiveram a idéia inicial que resultou neste projeto.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** que está no comando de tudo, permitindo que realizemos (ou não) tudo aquilo a que nos propusemos.

A minha família maravilhosa: **Dahyl, Henrique e Ana Clara**, que é a razão de todas as minhas lutas.

A minha mãe **Sônia** e todos seus exemplos de luta na vida.

Aos meus irmãos **Ju, Gô e Rachel**, e logicamente também as suas famílias: **Lu, Mariana, Gabriela(?), Fábio e Diogo**.

Aos meus tios e primos **Vera, Ana e Claudinho; Edna e Nivaldo; Lia, Carlos, Matheus e Caio e Marina**.

A minha sogra **Nair** e todos seus exemplos de luta na vida.

Aos meus cunhados e suas famílias: **Luciana e João; Renato, Cristina e Rafaella**.

A minha super amiga **Rose**, que nunca me abandonou!

Aos meus colegas de trabalho: **Mari, Simone, Patrícia, Fernando, Leandro, Rogério, Thiago, Marcelo, Vivi, Fer** e, em especial, **Cecy**, companheira de sempre!

Às pessoas que contribuíram para manter a minha saúde neste projeto: **Dr. Raul, Dra. Mariana e José Luiz**.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Prof. Dr. Euloir, Prof^a. Dr^a. Adriana, Prof^a. Dr^a. Carla e Prof. Dr. Sebastião**.

Aos professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia **Ana Paula Campanelli e Sérgio Aparecido Torres**.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris** por sempre ajudar na análise estatística.

Aos meus colegas de pós-graduação **Carlos, Mônica, Rafael, Andréia, Márcio, Bruna, Pedro** e especialmente ao **Eduardo**, admirável exemplo de dedicação e esforço.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia da FOB/USP: **Ivânia**, sempre especial, **Edilaine** e **Marcão**. Aos colegas de pós-graduação da Micro: **Belai, Carine, Claudia, Hayana, Lucas** e **Thaís**.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia da FOB/USP **André** e **Dalva**.

À secretária do departamento de Prótese **Déborah** pela disposição em ajudar.

Aos funcionários do setor de compras da FOB-USP, em especial ao **Anderson** e **Sandra**, pelo esforço de conseguirem o material necessário para a pesquisa.

À **Pós-graduação** da FOB/USP, na pessoa do Presidente **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

Às funcionárias da pós-graduação **Hebe, Cleuza, Maria Margareth, Fátima** e especialmente à **Ana Letícia** que não me deixou desistir.

À empresa **Titanium Fix** pela gentileza em ceder os discos de titânio utilizados neste trabalho.

À empresa **Kolplast** pela gentileza de doar as pinças plásticas utilizadas neste trabalho.

À **Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)** pelos 6 meses de bolsa de estudos concedida.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP)**, na pessoa do diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

muito obrigada!

Renata

“... porque, onde está o vosso tesouro, aí estará também o vosso coração”

Bíblia Sagrada
Lucas, cap. 12, vs. 34

Resumo

RESUMO

Os implantes de titânio estabeleceram-se, ao longo do tempo, como uma opção de tratamento com grande índice de sucesso. Entretanto, falhas são passíveis de ocorrer, devido à exposição de suas superfícies ao meio bucal, imediatamente ou até muito tempo passado de sua implantação. Estas superfícies de titânio podem se infectar por bactérias e seus produtos, de forma semelhante à que ocorre na superfície de raízes dentais. Tais contaminantes intensificam a resposta inflamatória, além de alterar a estrutura superficial do implante podendo dar origem às doenças peri-implantares, como a mucosite peri-implantar e a peri-implantite. Para o tratamento destas doenças, diversos métodos de descontaminação de superfícies de implantes têm sido propostos, incluindo o uso substâncias anti-sépticas, jatos abrasivos, ácidos, antibióticos e lasers. O objetivo foi avaliar comparativamente a capacidade de descontaminação do peróxido de hidrogênio a 1,5 % (H₂O₂), do gluconato de clorexidina a 0,12% (CLX) e do soro fisiológico (SF) já que, até o momento, nenhuma metodologia está estabelecida como padrão ouro para a limpeza superficial. Placa bacteriana foi colhida de sítios de doença periodontal crônica para contaminação de discos de titânio de superfícies lisas e rugosas. Posteriormente, os discos foram submersos em 10 mL das substâncias estudadas por 1 minuto, friccionados com *swab* e enxaguados em solução fisiológica. Discos controle (C) foram somente enxaguados em soro fisiológico. Desta forma resultaram os seguintes grupos de estudo, constituídos de 5 discos de cada tipo de superfície lisa (L) e rugosa (R): H₂O₂_R, CLX_R, SF_R, C_R, H₂O₂_L, CLX_L, SF_L e C_L. A avaliação do potencial descontaminante das substâncias foi realizada através da quantificação do crescimento bacteriano pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs) após semeadura em Agar-brucella e incubação em jarra de CO₂ a 37°C por 24 horas. Os resultados após descontaminação foram comparados através da análise de variância a dois critérios (ANOVA) e o nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%. Os resultados obtidos permitiram concluir que: as bactérias da periodontite crônica têm capacidade de contaminar e aderir aos discos de titânio nos dois tipos de superfícies estudados; as superfícies lisas e rugosas não diferem entre si quanto aos procedimentos de contaminação e de descontaminação propostos; a clorexidina, o peróxido de hidrogênio e o soro fisiológico apresentaram-se eficientes na descontaminação das superfícies de titânio contaminadas *in vitro*; houve ligeira superioridade na descontaminação pelo tratamento com a clorexidina de ambas as superfícies de titânio avaliadas.

Palavras-chave: descontaminação, superfície de titânio, tratamento de peri-implantite

Abstract

ABSTRACT

Microbiological comparison of different decontaminant agents on rough and smooth titanium surfaces: microbiological analysis

Actually, the titanium implants are a successful option of treatment in Dentistry. However, failures are possible to occur due to surface exposition to oral environment immediately or lately after its implantation. The titanium implants surfaces can be infected by bacteria and its products similarly to dental roots surfaces. The contaminants turn the inflammatory response tissues more intensive and them alter the surface structure of the implant and cause periimplant diseases like mucositis and peri-implantitis. Several methods of treatment for those diseases have been proposed in the literature, including antiseptics rinses, abrasives air powder, acids, antibiotics and lasers. The aim of this work was to comparatively evaluate the potential for decontamination of the hydrogen peroxide at 1,5% (H₂O₂), the 0,12% chlorhexidine gluconate (CLX) and the saline solution (SF) as cleaning methods, once until this moment there is not a gold standard method established for this purpose. Bacterial plaque harvested from sites of chronic periodontal disease was used to contaminate smooth and rough surfaces of titanium. Subsequently, decontamination procedures were realized by submerging the discs in 10 ml of the studied substances for 1 minute, cleaned by rubbing with swab and washed on saline solution. Control discs (C) were only washed in saline solution. The following test groups composed by 5 discs of each surface, smooth (L) and rough (R), were then originated: H₂O₂_R , CLX_R , SF_R, C_R , H₂O₂_L, CLX_L , SF_L and C_L. The decontaminant potential of studied substances was realized by counting the colony forming units after seeding in Agar-brucella, under anaerobiosis condition for 24 hours under 37°C. The data analysis was made by Variance Analysis (ANOVA) at 5% of significance level. The results lead to the following conclusions: the chronic periodontal biofilm adhesion was possible on smooth and rough titanium surfaces; the surface characteristic had no significant influence on contamination and decontamination method, independently of the substance used; clorhexidine, hydrogen peroxide and saline solution were efficient on decontaminating both types of titanium surfaces in vitro with slightly superiority to clorhexidine.

Key words: decontamination, titanium surface, treatment periimpantitis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Discos de titânio de superfície lisa e rugosa, nas embalagens recebidas do fabricante..... 43
- Figura 2 - Organização da câmara de fluxo, com os tubos de ensaio contendo os discos contaminados, as substâncias empregadas na desinfecção e os potes coletores universais onde os discos foram submersos 45
- Figura 3 - Discos mergulhados em meio BHI. Os três tubos da esquerda apresentam o meio turvado, com grande proliferação bacteriana; nos três tubos da direita o meio está estéril (límpido) 46
- Figura 4 - Disco mergulhado em 10 mL de substância descontaminante clorexidina, peróxido de hidrogênio ou soro fisiológico, neste caso o gluconato de clorexidina a 0,12% 47
- Figura 5 - Fricção do disco com *swab* estéril nas faces anterior, posterior e lateral do disco 47
- Figura 6 - Preparação das placas de Petri com Agar-sangue 49
- Figura 7 - Jarra de CO₂ com as placas e a vela para consumir o oxigênio simulando o ambiente de anaerobiose 50
- Figura 8 - Contagem das UFCs: A - Placa do Grupo H₂O₂, diluição de 10⁻³ na qual a contagem foi feita integralmente; B - Placa do Grupo controle positivo, diluição de 10⁻⁶ na qual se optou pela contagem por quadrante 50
- Figura 9 - Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco liso produzida pelo perfilômetro de contato. X e Y indicam as extensões avaliadas. A escala indica a variação de profundidade. Z é a distância do ponto mais profundo ao ponto mais alto (pico, Z = 20 µm) 55
- Figura 10 - Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco rugoso através do perfilômetro de contato. X e Y indicam as extensões avaliadas. A escala indica a variação de profundidade. Z é a distância do ponto mais profundo ao ponto mais alto (pico, Z = 16,3µm) 56
-
-

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das médias de UFCs encontradas nos discos lisos e rugosos após os tratamentos.....57

Gráfico 2 - Contagem média das UFCs produzidas após descontaminação dos discos de titânio pelos diferentes agentes descontaminantes59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de UFCs nos grupos de estudo após contaminação (controle) e/ou descontaminação.....57

Tabela 2 - Contagem média de UFCs produzidas após os diferentes tratamentos reagrupando-se os discos lisos e rugosos58

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância a dois Critérios
BHI	Brain Heart Infusion (infusão de cérebro e coração)
14C	Carbono 14
CFU	Colony-Forming Units (Unidades Formadoras de Colônia)
C _L	Controle Positivo (disco liso)
CLX	Tratamento com Clorexidina
CLX _L	Tratamento com Clorexidina (disco liso)
CLX _R	Tratamento com Clorexidina (disco rugoso)
C _R	Controle Positivo (disco rugoso)
d.p.	Desvio padrão
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
Er:YAG	Laser de érbio
FEB – UNESP	Faculdade de Engenharia de Bauru- Universidade Estadual Paulista
GaAIs	Laser de Arseneto de Gálio-Alumínio
H ₂ O ₂	Tratamento com Peróxido de Hidrogênio
H ₂ O _{2L}	Tratamento com Peróxido de Hidrogênio (disco liso)
H ₂ O _{2R}	Tratamento com Peróxido de Hidrogênio (disco rugoso)
LATUS	Laboratório de Tecnologia da Usinagem
LPS	Lipopolissacarídeo
n	Número de sujeitos da pesquisa
p	Nível de significância
pH	Potencial Hidrogeniônico
R _a	Rugosidade média
SF	Tratamento com Soro Fisiológico
SF _L	Tratamento com Soro Fisiológico (disco liso)
SF _R	Tratamento com Soro Fisiológico (disco rugoso)
SLA	Sand blasted, Large grit and Acid etched (jateamento seguido de ataque ácido)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VLFS 18	Câmara de fluxo laminar
X	Comprimento da região analisada no eixo X
Y	Comprimento da região analisada no eixo Y
Z	Distância máxima entre picos e vales

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	mililitro (unidade de volume)
CO ₂	dióxido de carbono (molécula)
O ₂	oxigênio (molécula)
g/dia	unidade de massa por dia (posologia)
μL	microlitro (unidade de volume)
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio (molécula)
mM	milimolar (concentração)
TiO ₂	dióxido de titânio (molécula)
n ^o	número
g/L	grama por litro (concentração)
μm	micrômetro (unidade de comprimento)
Nm	nanômetro (unidade de comprimento)
mm ²	milímetro (unidade de área)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	PERI-IMPLANTITE	23
2.2	CONTAMINAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DE TITÂNIO	24
2.3	AGENTES QUÍMICOS DESCONTAMINANTES DE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES	26
2.4	INTERFERÊNCIA DO TIPO DE SUPERFÍCIE NA EFICIÊNCIA DA DESCONTAMINAÇÃO	33
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	DISCOS DE TITÂNIO.....	43
4.2	COLETA DE PLACA SUBGENGIVAL.....	44
4.3	CONTAMINAÇÃO DOS DISCOS.....	45
4.4	DESCONTAMINAÇÃO DOS DISCOS	46
4.5	PLAQUEAMENTO DE AMOSTRAS PARA CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA	48
4.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	51
5	RESULTADOS.....	53
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXOS	85

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação oral empregando implantes dentais osseointegráveis das mais diversas formas e características de superfície é uma modalidade terapêutica com ampla aceitação e comprovação científica (ADELL et al., 1990).

Apesar da alta previsibilidade ao longo do tempo, com o crescimento gradativo do número de indivíduos reabilitados com esta terapia, pode-se esperar também maior ocorrência de complicações nos tecidos peri-implantares (BERGLUNDH; PERSSON; KLINGE, 2002), as quais aparecem, na sua maioria, em até 2 anos da fixação do implante (BEHNEKE; BEHNEKE; D'HOEDT, 2000). Essa observação mereceu atenção especial durante o 6º Workshop Europeu de Periodontologia (ZITZMANN; BERGLUNDH, 2008) que classificou as doenças peri-implantares em “mucosite peri-implantar”, quando há presença de inflamação na mucosa sem sinais de perda de osso de suporte, e “peri-implantite”, quando a inflamação na mucosa é simultânea à perda osso de suporte. Consolidou-se ainda, que as lesões que acometem o tecido peri-implantar são decorrentes do acúmulo de biofilme e de processo de progressão similares às lesões dos tecidos periodontais.

Para o desenvolvimento da peri-implantite, é necessário que haja a prévia colonização da superfície do implante por biofilme microbiano, mas o mecanismo de aderência de bactérias ainda não está totalmente esclarecido (BECKER et al., 1990; DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; MOMBELLI, 2002; SHIBLI et al., 2004). Há evidências de que a superfície dos implantes torna-se infectada de forma semelhante à superfície de raízes dentais e impregna-se com substâncias contaminantes que intensificam a resposta inflamatória, além de sofrer alteração da camada de óxido superficial (SHIBLI et al., 2004).

Assim, o objetivo de um tratamento de descontaminação de implantes expostos à peri-implantite deve não apenas envolver a remoção do óxido superficial contaminado, como manter a topografia da sua superfície e a integridade dos tecidos circundantes (BAIER; MEYER, 1988; MOUHYI et al., 2000), além de tornar a superfície do implante novamente receptiva às células do hospedeiro, ou seja, passível de se re-osseointegrar (SCHOU; BERGLUNDH; LANG, 2004).

Dentre os tratamentos da peri-implantite, diversos métodos de descontaminação de superfícies de implantes e de recuperação dos tecidos de suporte peri-implantares foram propostos. O tratamento não-cirúrgico abrange estratégia anti-infecciosa, como o debridamento mecânico com curetas, irrigação com soro fisiológico e jato de pó de bicarbonato de sódio; a ação de agentes químicos como ácidos e anti-sépticos na superfície dos implantes; a utilização de antibióticos sistêmicos e/ou de ação local; além de diversos tipos de lasers. (ERICSSON et al., 1996; PERSSON et al., 1996; HÜRZELER et al., 1997; BACH et al., 2000; DEPPE et al., 2001; KREISLER; GÖTZ; DUSCHNER, 2002; SCHOU; BERGLUNDH; LANG, 2004). Visando a recuperação dos tecidos perdidos, a estas estratégias de descontaminação de superfície são somadas as cirurgias a retalho para acesso e procedimentos de regeneração óssea (JOVANOVIC et al., 1993; JOVANOVIC 1993; HÜRZELER et al., 1997; BEHNEKE; BEHNEKE; d'HOEDT, 2000; LEONHARDT; DAHLÉN; RENVERT, 2003; ROOS-JANSÅKER, 2007; LINDHE; MEYLE, 2008; RENVERT; POLYZOIS; MAGUIRE, 2009, NOROWSKI JR; BUMGARDNER, 2009).

Os tratamentos parecem, entretanto, ser influenciados por fatores físicos e biológicos, dentre eles, a rugosidade de superfície do implante (QUIRYNEN et al., 1990; ZITZMANN et al., 2002; FERREIRA et al., 2007). Resultados de estudos microbiológicos em implantes que apresentaram doença peri-implantar mostraram bactérias que também estão implicadas na doença periodontal (RAMS et al., 1983; MOMBELLI et al., 1995; SLOTS; JORGENSEN, 2008; NOROWSKI JR; BUMGARDNER, 2009) e que a adesão de espécies de *Streptococos*, *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Captonocytophaga* e *Fusobacterium*, é facilitada pelo aumento da rugosidade nas superfícies dos implantes e pela energia livre de superfície (RIMONDINI; FARÈ; BRAMBILLA, 1997).

A maioria dos estudos relacionados à avaliação de tratamentos de descontaminação de superfície de implantes utiliza a irrigação com soro fisiológico tanto como um dos tratamentos quanto para promover a remoção dos outros agentes (MEFFERT, 1996; BEHNEKE; BEHNEKE; D'HOEDT, 2000; SUMMERS et al., 2000; LEONHARDT, 2006; CHERRY et al., 2007; ALHAG et al., 2008; KOSUTIC et al., 2009).

Em baixas concentrações, o peróxido de hidrogênio usado na descontaminação pode interagir com o titânio sem danificar tecidos adjacentes (MOUHYL et al., 2000; NAGASSA et al., 2008). Este agente oxigenante tem baixa substantividade e aumenta a permeabilidade celular de bactérias através dos radicais livres (CIANCIO, 1995). Ainda, os oxidantes potentes podem aumentar a quantidade de óxido de titânio na superfície do implante (NAGASSA et al., 2008).

In vitro, a clorexidina adere ao titânio do implante e provavelmente é benéfico para a descontaminação da superfície (CIANCIO, 1995; MEFFERT, 1996). A clorexidina apresenta substantividade para superfície dental e mucosa oral e baixa irritabilidade com poucos efeitos adversos (MEFFERT, 1996; SLOTS e JORGENSEN, 2008). Existe grande comprovação na literatura do seu papel na redução clínica da placa bacteriana e da gengivite (CIANCIO, 1995; MEFFERT, 1996; SLOTS e JORGENSEN, 2008).

Nos últimos anos, o tratamento não-cirúrgico e cirúrgico das lesões peri-implantares tornou-se um tema de alta relevância e interesse. A análise dos achados existentes sobre esse tema demonstra uma lacuna no conhecimento sobre a eficiência dos tratamentos de descontaminação de implantes. Observa-se que a falta de uniformidade metodológica das pesquisas, a ampla variedade de possibilidades de tratamentos da superfície contaminada do implante, além do elevado número de possíveis associações dificulta a avaliação dos resultados e a comparação entre eles (SCHOU; BERGLUNDH; LANG, 2004; KOTSOVILIS et al., 2008; RENVERT; ROOS-JANSÅKER; CLAFFEY, 2008; HEINTZ-MAYFIELD, 2008; NTROUKA, 2010).

Até o momento, nenhuma metodologia está estabelecida como padrão para o tratamento da peri-implantite (KOTSOVILIS et al., 2008), atentando para a necessidade de métodos de baixo risco, alta previsibilidade, que seja acessível e de fácil aplicação na clínica diária. Daí a justificativa para a realização de um trabalho que contribua para o desenvolvimento de um protocolo de conduta no que diz respeito à terapia de descontaminação química para casos de peri-implantite.

Desta forma, propôs-se verificar comparativamente a ação descontaminante de diferentes agentes comuns no dia-a-dia do clínico - peróxido de hidrogênio a 1,5% (H₂O₂), gluconato de clorexidina a 0,12% (CLX) e soro fisiológico (SF) - sobre superfícies lisas e rugosas de discos de titânio previamente contaminados com placa bacteriana de sítios com doença periodontal, contribuindo para a definição de condutas clínicas confiáveis no tratamento da peri-implantite.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Embora este seja um estudo microbiológico *in vitro*, a descontaminação de superfície, tema central deste trabalho, faz parte das possibilidades de terapia nos tratamentos da peri-implantite. Por esta razão, a revisão de literatura inicialmente enfocará algum conteúdo conceitual e epidemiológico da doença antes de abordar registros diretos de suporte ao uso dos diversos métodos de descontaminação em diferentes tipos de superfícies de implantes.

2.1 PERI-IMPLANTITE

Tendo sido um termo introduzido primeiramente por Mombelli et al. (1987), a peri-implantite recebeu profusa atenção durante o Workshop de Periodontia, realizado na Suíça em 1993, quando termo doença peri-implantar passou a ser utilizado para denominar reações inflamatórias que ocorrem nos tecidos peri-implantares. Nesse evento ficou definido que, quando restritas aos tecidos moles, essas reações denominam-se mucosite peri-implantar ao passo que, se acometem os tecidos moles e duros ao redor do implante, são denominadas peri-implantite. A perda progressiva de osso peri-implantar pode prejudicar a manutenção do implante e, conseqüentemente, comprometer a preservação da prótese implanto-suportada (JOVANOVIC et al., 1993; ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994; HÜRZELER et al., 1995).

Em 2008, Lindhe e Meyle no 6º Workshop Europeu de Periodontia chegaram ao consenso sobre as doenças peri-implantares mais comuns: mucosite peri-implantar e peri-implantite, causadas por bactérias. Dados epidemiológicos identificaram que cerca de 80% dos pacientes com implantes tiveram 50% dos sítios peri-implantares afetados pela mucosite; e de 28 a 56% dos pacientes (12 a 40% dos sítios) foram afetados pela peri-implantite. Os vários fatores de risco identificados foram: pobre higiene bucal, histórico de periodontite, diabetes e tabagismo. Propuseram que se incluam medidas anti-infecciosas para o tratamento da peri-implantite, como o uso enxaguatórios antimicrobianos associados à terapia

cirúrgica. Houve consenso de que o resultado do tratamento não cirúrgico da peri-implantite não é previsível.

A etiologia da peri-implantite tem como fator determinante a presença da placa bacteriana (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994; QUIRYNEN et al., 2005; LINDHE; MEYLE, 2008), semelhantemente ao que ocorre na doença periodontal (MOMBELLI; LANG, 1994; LANG et al., 1997) e a contaminação da superfície dos implantes seria uma de suas principais causas (JOVANOVIC, 1993).

Os implantes fabricados em titânio comercialmente puro são cobertos por uma fina camada de óxido que promove a osseointegração. A contaminação desta camada aparentemente diminui a energia livre de superfície, podendo provocar uma reação do tipo corpo estranho encapsulando o implante em um tecido fibroso, o que culminará com sua avulsão (BAIER; MEYER, 1988). Como implantes inseridos na cavidade oral não podem ser esterilizados e nem mantidos livres de recontaminação, não existe informação sobre em qual extensão os resíduos bacterianos e não bacterianos precisam ser removidos de uma superfície de implante para que se obtenha um resultado clínico estável de saúde gengival (MOMBELLI, 2002).

2.2 CONTAMINAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DE TITÂNIO

Há ampla comprovação de que a contaminação da superfície dos implantes na peri-implantite se dá pela ação de patógenos comumente encontrados na doença periodontal (LINDHE et al., 1992; SHIBLI et al., 2003; HEITZ-MAYFIELD, 2008). Empregando sonda de DNA, Hultin et al. (2002) caracterizaram a microbiota do fluido sulcular ao redor de 98 implantes dos quais 45 apresentavam perda óssea marginal de mais de três roscas depois do primeiro ano em função. Observaram a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* em mais altos níveis nos implantes com peri-implantite do que nos saudáveis

Também Covani et al. (2006) observaram que uma extensa variedade de microorganismos parece ter a capacidade de penetrar nos componentes de

implantes. Identificaram cocos e filamentos no interior de implantes do sistema Brånemark e aderidos à superfície dos implantes em uma orientação perpendicular ao seu longo eixo. Essas bactérias estavam associadas à peri-implantite.

Os resultados de Heuer et al. (2007), entretanto, não conseguiram comprovar a similaridade de microbiota entre implantes com sinais de peri-implantite e dentes naturais com doença periodontal. Os autores procuraram verificar se *Haemophilus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* estavam presentes no fluido crevicular ao redor de implantes em cuja superfície foi permitida a deposição de placa bacteriana. O biofilme formado depois de 14 dias em 14 intermediários de cicatrização instalados em 10 pacientes foi coletado com pontas de papel absorvente. A análise quantitativa e qualitativa de todas as amostras exibiu bactérias, mas nenhuma continha os dois patógenos periodontais investigados. Os autores procuraram explicar esse achado pela ausência de sítios de doença periodontal nos indivíduos tratados que pudessem contaminar os sulcos peri-implantares. Outra observação foi que provavelmente a aderência celular dos tecidos aos implantes por meio de hemidesmossomas, filamentos de actina e microvilosidades reduziria o risco de formação de ambiente anaeróbico subgingival.

Em realidade, a ausência de sítios com doença periodontal nem sempre explica a inexistência de contaminação de implantes por patógenos periodontais. Foi o que reportaram Emrani; Chee; Slots (2009) ao descreverem um caso clínico no qual a microbiota sub-gingival de uma paciente totalmente desdentada e com sinais de peri-implantite era semelhante a de seus dentes afetados por periodontite. A cultura microbiológica de três sítios peri-implantares que mostravam sangramento à sondagem e mucosite localizada apresentou patógenos quase idênticos aos dos sítios dos dentes extraídos 8 meses antes por doença periodontal, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, e outros patógenos característicos de periodontite agressiva. Os autores sugeriram que patógenos periodontais podem ser retidos por um período prolongado de tempo em sítios não dentais, de onde podem colonizar e comprometer mais tarde a saúde dos implantes.

Por outro lado, Shibli et al. (2008) empregando *checkerboard* DNA-hibridização de DNA compararam a composição microbiana do biofilme supra e sub-gingival em indivíduos com (n=22) e sem (n=22) peri-implantite. Encontraram que,

embora o perfil microbiológico supra e sub-gengival não tenha diferido substancialmente dentro de cada grupo, houve quantidades mais elevadas de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* nos pacientes com peri-implantite tanto supra como subgengivalmente sem diferenças significantes entre os dois ambientes. Relacionaram essa microbiota como espécies bacterianas mais periodontopatogênicas.

2.3 AGENTES QUÍMICOS DESCONTAMINANTES DE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES

Vários tipos de tratamento têm sido propostos para a peri-implantite, principalmente objetivando a redução das bactérias anaeróbicas gram-negativas, sendo que a descontaminação incompleta da superfície foi citada como o maior obstáculo para o crescimento ósseo sobre a superfície previamente contaminada (MOMBELLI, 1997).

A desinfecção das superfícies contaminadas de implantes odontológicos com clorexidina é considerada padrão na terapia cirúrgica da peri-implantite (ERICSSON et al., 1996; MOMBELLI, 2002). A clorexidina é um composto difenílico que apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (QUIRYNEN et al., 2002). A molécula catiônica da clorexidina possui a propriedade de ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície celular bacteriana. Uma vez adsorvida a essa superfície, a membrana celular é alterada podendo resultar em dano irreversível dependendo da dose (QUIRYNEN et al., 2002), estando bem documentada sua capacidade de inibir a formação de placa e melhorar índices de sangramento gengival ao redor de dentes e implantes, justificando sua ampla utilização (ZABLOTSKY; DIEDRICH; MEFFERT, 1992; HEYEK, 2005).

Sua ação contra várias espécies bacterianas foi verificada, especialmente contra microrganismos encontrados na cavidade oral (EMILSON, 1977; STANLEY; WILSON; NEWMAN, 1989). Porém, se a bactéria fizer parte de um biofilme, geralmente torna-se menos suscetível a agentes antimicrobianos. Isto se deve provavelmente a fatores ambientais, como a supressão da taxa de crescimento e à

interação microbiana resultando em suscetibilidades modificadas a antimicrobianos (BROWN; ALLISON; GILBERT, 1988; GILBERT, 1997).

Em 1992, Zablotsky; Diedrich; Meffert avaliaram a capacidade de várias modalidades quimioterapêuticas, incluindo a clorexidina, na descontaminação de diferentes tipos de superfícies de implantes. Depois de contaminarem tiras de liga de titânio de superfície rugosa e outras recobertas por hidroxiapatita com *Escherichia coli* marcada com ¹⁴C radioativo, descontaminaram as tiras de liga de titânio com ácido cítrico, fluoreto estanhoso, tetraciclina hidrocloreada, digluconato de clorexidina, peróxido de hidrogênio, cloramina T, água estéril, raspador sônico de ponta plástica e jato de pó abrasivo. As tiras recobertas por hidroxiapatita foram tratadas com cloramina T, ácido cítrico ou brunidas com bolinhas de algodão embebidas em água estéril por 60 segundos. A medida dos níveis de lipopolissacarídeos residuais sobre as superfícies demonstrou que o jato de pó abrasivo removeu quantidades significativamente maiores de LPS do que qualquer outra modalidade de descontaminação, ainda que o ácido cítrico tenha sido superior sobre as superfícies de hidroxiapatita.

No mesmo ano, Mombelli e Lang (1992) estudaram o efeito da associação entre aplicação tópica de clorexidina com antibioticoterapia sistêmica em pacientes cujos implantes apresentavam sinais de perda óssea e profundidade de sondagem \geq 5mm. Antes de realizarem o tratamento, coletaram amostra microbiana sub-gengival desses pacientes e promoveu-se a limpeza mecânica, irrigação das bolsas com clorexidina a 0,5% e administração sistêmica de ornidazol a 1g/dia por 10 dias. Observaram que os índices de sangramento diminuíram imediatamente e permaneceram significativamente mais baixos depois de 1 ano do tratamento. Houve redução gradual da profundidade de sondagem e os parâmetros microbiológicos indicaram supressão dos microrganismos anaeróbicos.

No tratamento cirúrgico da peri-implantite experimental em cães, Hayek et al. (2005) comprovaram que é possível a desinfecção apenas por irrigação com clorexidina a 0,12% em comparação à terapia fotodinâmica com laser de GaAIs em baixa intensidade. Na superfície de implantes, foi permitida a deposição de placa e ambos os procedimentos reduziram significativamente os níveis de *Prevotella sp.*, *Fusobacterium sp.*, e *S. Beta-haemolyticus*. A análise foi feita pela comparação das

amostras coletadas com pontas de papel absorvente das superfícies antes e depois dos tratamentos com posterior cultura microbiológica e contagem das unidades formadoras de colônia.

A efetividade do digluconato de clorexidina a 0,2% na remoção de biofilmes formados artificialmente sobre discos de titânio grau IV de superfície SLA também foi avaliada em comparação a enxaguatórios bucais de uso rotineiro por Baffone et al. (2011). Foi efetuada a incubação de biofilmes individualizados ou combinados de *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* sobre os discos e foi avaliada a contagem das unidades formadoras de colônia após a exposição à clorexidina 0,2% pura produzida em laboratório e a outros 4 enxaguatórios bucais. Para formação da película adquirida, os espécimes foram colocados em saliva esterilizada obtida de voluntários saudáveis durante 4 horas. Após remoção da saliva por aspiração, 21 discos foram colocados em meio infectado com 200 µL de cada uma das suspensões bacterianas e esperou-se a formação dos biofilmes nos tempos 16,5, 40,5 e 64,5 horas. Nestes tempos, os discos foram removidos e imersos por 1 minuto na clorexidina, nos enxaguatórios (Curasept, Listerine, Meridol and Buccagel) e 3 deles em soro fisiológico para o controle. Os discos foram lavados em soro por 10 segundos, transferidos para um tubo com solução fisiológica estéril e misturados vigorosamente no vortex por 2 minutos. Diluiu-se a solução resultante deste processo e semeou-se em meio de cultura para a contagem de unidades formadoras de colônia. Os autores verificaram que todas as substâncias empregadas reduziram a adesão bacteriana ao titânio em diferentes graus. Houve influência do tempo de cultura e da substância utilizada para o *S. mutans* e *S. aureus*; contrariamente, para a *P. aeruginosa*, o tempo de cultura não fez diferença. O Listerine foi o mais eficaz, mostrando atividade inibitória de 100% para o *S. mutans* no tempo 16,5 horas e melhor que os outros enxaguatórios. Inclusive o *Curasept* que contém clorexidina 0,2% como componente principal, teve comportamento inferior tanto ao Listerine quanto à clorexidina 0,2% pura produzida em laboratório. Entretanto, todos os enxaguatórios utilizados e a clorexidina foram efetivos na remoção dos biofilmes, principalmente nos biofilmes recém-formados (16,5 horas) e nos de mono-espécie. Comentaram que o tempo de exposição às substâncias de apenas 1 minuto pode ter sido decisivo na sua eficácia, já que, houve o relato de Stewart (2003) de que a difusão da

clorexidina no biofilme formado por estreptococos somente alcança as camadas mais profundas depois de 5 minutos.

Outro agente efetivo contra bactérias é o peróxido de hidrogênio por sua ação oxidante de supressão contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* quando usado em irrigação subgengival (ZABLOTSKY et al., 1992; QUIRYNEN et al., 2002).

Considerando que o peróxido de hidrogênio como tratamento de superfície dos implantes poderia resultar em camada de óxido superficial com altos níveis de titânio e de oxigênio e baixos níveis de carbono, Mouhyi, Sennerby e Van Reck (2000) avaliaram seu efeito sobre superfícies de titânio. Removeram parafusos de cobertura de titânio de pacientes que se apresentavam recobertos por tecido mole até o momento da reabertura para instalação de intermediários. O peróxido de hidrogênio não foi usado isoladamente, mas em diferentes combinações com ácido cítrico e laser de CO₂ para a limpeza desses parafusos que foram, depois, implantados na cavidade abdominal de ratos para análise histomorfométrica. Encontraram que a associação do laser com o peróxido de hidrogênio produziu cápsula fibrosa mais fina. Como em nenhum grupo o peróxido foi usado isoladamente, os autores não puderam comprovar o real efeito desse agente químico sobre a descontaminação dos parafusos. Ainda, o contato da superfície de titânio com o ar acontece rapidamente e a contaminação com carbono torna-se inevitável. Concluíram, então, que seja possível a presença de carbono na superfície não sendo este fato crítico para o estabelecimento de uma interface saudável com os tecidos, ou seja, para a osseointegração.

Em estudo subsequente, Mouhyi et al. (2000), avaliaram os mesmos métodos descontaminantes em lâminas de titânio comercialmente puro que estiveram aderidas a próteses totais de dois voluntários por 24 horas para simular uma condição de peri-implantite. A diferença com o estudo anterior foi que os agentes foram usados também isoladamente e não somente em combinações e as superfícies foram analisadas à microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia fotoeletrônica de raios-X. Seus resultados demonstraram que, embora não tenha sido visto nenhum benefício no uso de peróxido de hidrogênio isoladamente na concentração de 10m M, quando em associação com o laser de CO₂, a composição atômica do óxido de titânio foi

restaurada aos níveis anteriores à contaminação. Este fato foi atribuído à geração de radicais livres durante a decomposição do peróxido induzida pelo laser, evento considerado fundamental para a osseointegração.

O peróxido de hidrogênio foi associado também à antibioticoterapia sistêmica no tratamento de pacientes com peri-implantite. Em 2003, Leonhardt, Dahlén e Renvert publicaram os resultados do acompanhamento por até 5 anos de 9 pacientes apresentando peri-implantite severa tratados com antibioticoterapia sistêmica após limpeza dos implantes com peróxido de hidrogênio a 10%. Os autores colheram amostras de placa subgengival de sítios com peri-implantite para elaborar um antibiograma individualizado para cada paciente e fundamentar a antibioticoterapia iniciada após duas semanas da exposição cirúrgica das lesões e limpeza dos implantes. O peróxido de hidrogênio foi usado para quebrar a integridade do biofilme formado e remover a maior parte dos microrganismos e a antibioticoterapia para impedir a re-colonização bacteriana na superfície dos implantes. Os implantes, que anteriormente já suportavam próteses, receberam *abutments* estéreis e as próteses foram reinstaladas imediatamente após a cirurgia. Durante duas semanas, os pacientes fizeram bochechos com clorexidina a 0,2% duas vezes ao dia. Depois de 5 anos de acompanhamento, 7 de 26 implantes tinham sido perdidos, 4 continuaram perdendo osso de suporte, 9 não tiveram variação no nível ósseo e 6 ganharam osso. Os autores interpretaram esse resultado como representativo de 58% de sucesso e comentaram que seu estudo demonstrou que é possível, mas não previsível, manter em função implantes acometidos por peri-implantite em longo prazo com o método empregado.

Já Alhag et al. (2008) compararam a ação do ácido cítrico com o peróxido de hidrogênio na produção de osseointegração em implantes que haviam sido cobertos por biofilme microbiano. Inseriram parcialmente implantes de superfície rugosa em cães, de forma a permitir o acúmulo de placa durante 5 semanas na porção exposta à cavidade oral. Empregaram como métodos de descontaminação, a fricção com ácido cítrico por 30 segundos seguida da lavagem com soro fisiológico, ou escovação com soro fisiológico por 1 minuto, ou fricção com peróxido de hidrogênio a 10% por 1 minuto seguido da lavagem com soro fisiológico. Depois de removê-los através de torque reverso, transferiram esses implantes para cavidades ósseas recém-preparadas nos mesmos animais. Em análise histomorfométrica realizada 11

semanas após, verificaram que todas as modalidades de tratamento estiveram associadas de forma semelhante ao contato direto osso-metal na porção do implante previamente exposta ao ambiente oral, ainda que em proporções menores do que as apresentadas pelas áreas não contaminadas dos implantes. Concluíram que, embora os métodos empregados não tenham limpado completamente os implantes, os contaminantes remanescentes não pareceram alterar os padrões de osseointegração.

Kolonidis et al. (2003) já haviam realizado o mesmo experimento e usando o mesmo método de Alhag et al. (2008) em implantes de superfície usinada chegando à mesma conclusão. Ambos os trabalhos tentaram explicar esse resultado aparentemente inesperado, pelo fato de que o modelo experimental utilizado não incorporava elementos de cicatrização da ferida como ocorre em outros modelos. A produção de defeitos peri-implantares por ligaduras, por exemplo, possui morfologia que afeta a adesão e estabilidade do coágulo, migração e diferenciação celular. Os autores ainda se referiram ao possível efeito mecânico de limpeza que teria a fricção dos agentes por si só.

Considerando a existência de relatos sobre a possibilidade do peróxido de hidrogênio e outros agentes químicos alterarem a estrutura superficial dos implantes, Ungvári et al. (2010) realizaram um estudo para avaliar o peróxido de hidrogênio a 3%, gel de clorexidina a 1% ambos por 5 minutos ou ácido cítrico saturado (pH 1) por 1 minuto. Essas substâncias foram testadas sobre discos usinados de titânio comercialmente puro os quais foram analisados ao microscópio de força atômica e foto-eleto-espectroscopia de raios-X. Não encontraram diferença na rugosidade após os tratamentos e constataram a presença de elementos superficiais típicos de uma camada de TiO_2 intacta, o que os levou a concluir que esses agentes não danificam a superfície do titânio.

Seis agentes antimicrobianos conhecidos e de uso comum foram testados por Gosau et al. (2010) quanto à eficácia na descontaminação de discos de titânio medindo 9mm de diâmetro por 2mm de espessura. A deposição de biofilme foi conseguida através da fixação de 14 discos fixados em placa acrílica removível usada no arco superior por 4 voluntários saudáveis durante 12 horas. Os espécimes permaneceram imersos durante 1 minuto em um dos seguintes agentes

descontaminantes: hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio 3%, digluconato de clorexidina a 0,2%, Plax, Listerine e ácido cítrico a 40%. Depois de lavados com soro fisiológico para remover bactérias não aderidas, a quantidade e viabilidade das bactérias remanescentes aderidas aos implantes foram avaliadas por microscopia de fluorescência. Todos os anti-sépticos usados pareceram capazes de reduzir a quantidade de microrganismos acumulados nas superfícies dos discos de titânio. Com exceção do Plax e do ácido cítrico, todos mostraram efeito bactericida em comparação ao soro fisiológico usado como controle. Os autores apontaram ser este o primeiro estudo quantitativo ou qualitativo sobre a capacidade descontaminante de agentes químicos sobre superfícies de titânio e ressaltaram a importância do uso regular adicional de agentes químicos de uso comum na prática clínica para o tratamento de periodontite e na terapia peri-implantar.

Também Ntrouka et al. (2011) estudaram a efetividade de agentes quimioterapêuticos ácido cítrico, Ardox-X, H₂O₂, Ardox-X seguido de ácido cítrico, H₂O₂ seguida de ácido cítrico, clorexidina e água sobre superfícies de discos de titânio contaminadas. Alíquotas de biofilmes polimicrobianos ou constituídos apenas por *S. mutans* em suspensão foram plaqueadas e incubadas em anaerobiose para permitir a contagem das bactérias remanescentes viáveis, expressadas na forma de UFCs. Verificaram que a H₂O₂, Ardox-X e ácido cítrico eliminaram significativamente mais *S. mutans* que os demais tratamentos. A H₂O₂ e o ácido cítrico removeram significativamente mais proteínas do que a água e o ácido cítrico combinado aos tratamentos foram mais efetivos contra os biofilmes polimicrobianos do que a clorexidina, H₂O₂ e Ardox-X. O efeito bactericida do ácido cítrico utilizado individualmente ou em combinação não foi significativo. Esses resultados levaram os autores à conclusão de que o ácido cítrico apresenta maior capacidade de descontaminação tanto por eliminar as bactérias quanto por remover biofilmes. Recomendaram, todavia, que esses resultados sejam validados em estudos in vivo.

Três revisões sistemáticas foram encontradas versando sobre os métodos de descontaminação de superfícies de implante, cujos achados merecem destaque. A de Kotsovilis et al. (2008) visou a eficácia das modalidades de tratamento aplicadas à peri-implantite. Estabeleceram como critério de inclusão estudos randomizados controlados e/ou estudos clínicos comparativos, chegando a apenas 5 publicações com amostras muito pequenas e curtos períodos de acompanhamento.

Considerando difícil chegar a conclusões, apontaram para a conveniência do debridamento mecânico combinado com terapia antibiótica/antisséptica, laserterapia com Er:YAG ou técnicas regenerativas. A revisão de Claffey et al. (2008) abrangeu o tratamento cirúrgico da peri-implantite. Encontraram 13 estudos em humanos nos quais apenas um abordava diretamente a resolução da doença, vista em 58% das lesões, proporcionando, pois, evidência extremamente limitada. Nos estudos em animais nos quais a re-osseointegração em superfícies previamente contaminadas foi o parâmetro analisado, as características de superfície se mostraram decisivas, com superioridade para as rugosas, mas nenhum método de descontaminação (agentes químicos, jatos abrasivos e laser) pareceu ser distintamente superior. Entretanto, pareceu ser fundamental que sejam aplicados em associação ao debridamento em campo aberto. Por último, Ntrouka et al. (2010) evidenciaram a não existência de estudos controlados in vivo sobre a descontaminação de superfícies de titânio. Estabeleceram como critérios de inclusão: estudos controlados, padronização do crescimento de biofilmes nas superfícies, tratamento das superfícies com agentes quimioterapêuticos, parâmetros definidos para a avaliação da descontaminação como biofilme residual, LPS residual, microscopia confocal ou microscopia eletrônica de varredura. Apenas 4 estudos preencheram os critérios de inclusão (3 in vitro e 1 ex vivo) e nestes, o ácido cítrico se mostrou mais efetivo na remoção de lipopolissacarídeos e biofilmes, embora sua efetividade tenha sido incompleta e equivalente à água e soro fisiológico. Concluíram que os dados sobre a eficácia de agentes quimioterapêuticos na limpeza de superfícies de titânio contaminadas são escassos, o que impede a tomada de conclusões consistentes.

2.4 A INTERFERÊNCIA DO TIPO DE SUPERFÍCIE NA EFICIÊNCIA DA DESCONTAMINAÇÃO

Tem sido sugerido que implantes com textura de superfície mais lisa podem ser mais passíveis de se descontaminar (DENNISON et al., 1994). Porém, esse tipo de superfície tem diminuído nos últimos anos porque implantes de superfície rugosa osseointegram mais rapidamente, permitindo a aplicação de carga mais precocemente (WENNERBERG et al., 1997). Por outro lado, também tem sido

atribuída à rugosidade de superfície, maior agregação bacteriana. (DRAKE; PAUL; KELLER, 1999).

Com o objetivo de determinar qual tipo de superfície era mais efetivamente descontaminada e qual tratamento alcançava melhor esse objetivo, Dennison et al. (1994) impregnaram implantes usinados, cobertos por spray de plasma de titânio ou por hidroxiapatita, com endotoxina radioativa obtida de *Porphyromonas gingivalis*. Os implantes foram tratados por fricção com bolinha de algodão embebida em água, ácido cítrico ou clorexidina a 0,12%, ou ainda, por um jato de pó abrasivo. A radioatividade residual através do carbono 14 foi medida e chegou-se à conclusão de que os implantes usinados são mais fácil e efetivamente descontaminados do que todas as demais superfícies, independentemente do tratamento usado. A única exceção foi o ácido cítrico que foi igualmente efetivo tanto em superfícies usinadas como cobertas por hidroxiapatita.

Drake; Paul; Keller (1999), por sua vez, desenvolveram um modelo in vitro para estudar o efeito da característica de superfície sobre a colonização bacteriana. Empregaram discos de titânio comercialmente puro medindo 12,5mm de diâmetro por 4 mm de espessura nos quais produziram superfícies polidas e com dois diferentes graus de rugosidade. Para que as superfícies se tornassem hidrofílicas empregaram passivação ácida e depois esterilizaram os discos por luz ultravioleta, autoclavagem, óxido de etileno ou plasma de gás argônio. Promoveram a contaminação das superfícies por suspensão celular de *Streptococcus sanguis* por 24 a 72 horas em anaerobiose. Para limpeza, as superfícies foram lavadas, friccionadas com “swabs”, trocadas para meio estéril, passadas no ultra-som por 15 segundos e enxaguadas por 10 segundos. Posteriormente, as amostras foram diluídas, plaqueadas e incubadas novamente em anaerobiose para posterior contagem das unidades formadoras de colônia. Observaram que discos submetidos à lixa 800 ou jateados (SLA) apresentaram níveis de colonização significativamente mais altos do que os lisos, mas não diferiram entre si. Quanto ao método de esterilização, as menores contagens de colonização ocorreram quando os discos foram submetidos à luz ultravioleta, plasma de gás argônio e óxido de etileno. Já a autoclavagem produziu altas contagens independentemente do tipo de superfície. Os autores sugeriram que implantes de superfície rugosa, quando expostas ao meio

bucal estão mais predispostos a serem colonizados por bactérias capazes de causar peri-implantite.

A eficácia da descontaminação com jato de bicarbonato de sódio por 1 minuto foi testada por Pereira da Silva et al. (2005) na remoção bacteriana da superfície de lâminas de titânio com três níveis de rugosidade. As lâminas foram incubadas com suspensões de *Streptococcus sanguis* e as UFCs foram contadas antes e depois do tratamento. Antes do jateamento, nas superfícies de rugosidade média (Ra) de 0,17 μ m, permaneceram 49 x 10³ bactérias; nas superfícies de Ra- 1,14 μ m, permaneceram 11 x 10⁴ bactérias; nas superfícies de Ra=3,17 μ m, permaneceram 35 x 10⁵ bactérias. Depois da descontaminação não foram encontradas bactérias viáveis. O estudo demonstrou que ocorre um aumento exponencial no número de bactérias com o aumento da rugosidade de superfície. O jateamento com bicarbonato de sódio em alta pressão removeu essas bactérias eficientemente de todas as superfícies testadas, sendo recomendado pelos autores seu uso na fase de manutenção do tratamento.

Também Parlar et al. (2009) procuraram verificar microscopicamente em cães o efeito de três técnicas de descontaminação em superfícies lisas (usinadas) e rugosas (jateadas, spray de plasma de titânio e SLA) de implantes nos quais produziram peri-implantite por meio de ligaduras. Os implantes foram fabricados de forma a constituírem uma base apical fixa e outra mais coronal removível rosqueada na base, interface até a qual foi permitida a progressão da perda óssea. Após o debridamento dos defeitos em campo aberto, os implantes receberam um dos seguintes tratamentos: 1) limpeza com spray de soro fisiológico em alta pressão *in situ* durante 3 minutos; 2) desrosqueamento da porção mais coronal, limpeza com spray de soro fisiológico em alta pressão por 3 minutos fora da boca dos animais, esterilização em autoclave e, em seguida, reinstalação dessa porção novamente em posição na boca; 3) substituição da porção coronal contaminada por outra estéril sem uso. Os implantes foram recobertos por uma membrana de colágeno fixa com os parafusos de cobertura e o retalho foi suturado. Três meses após, foram feitas biópsias contendo implantes e tecidos circundantes. O tratamento por spray de soro fisiológico *in situ* mostrou os melhores resultados no que se refere à neo-formação óssea e reosseointegração. A superfície SLA comportou-se melhor quanto à osseointegração em comparação ao spray de plasma e este, melhor que a

superfície usinada. Porém, em relação ao nível de osso neo-formado, não houve diferença entre os 4 tipos de superfície. Os autores comentaram que este estudo demonstrou que a limpeza dos implantes previamente contaminados apenas com soro fisiológico, mesmo em superfícies rugosas, é suficiente para que ocorra a re-osseintegração,

Por outro lado, Salmeron (2011), ao avaliar o poder de descontaminação do laser em baixa intensidade, da terapia fotodinâmica e do azul de toluidina O sobre discos de titânio lisos e rugosos, não encontraram diferenças microscópicas na reação do tecido subcutâneo de ratos onde os discos foram implantados. A autora concluiu que ambos os tipos de superfícies foram igualmente limpos pelos métodos empregados e sugeriu que o potencial reparador do próprio tecido pode ter sido mais importante na resolução da contaminação do que o método de usado.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Propôs-se neste trabalho testar as hipóteses descritas a seguir:

1. A placa bacteriana colhida de sítios com doença periodontal é capaz de contaminar e aderir às superfícies de titânio lisas e rugosas;
 2. A característica de superfície - lisa e rugosa - tem influência positiva ou negativa na contaminação e na descontaminação dos discos de titânio;
 3. Substâncias que fazem parte do dia-a-dia do clínico - clorexidina, soro fisiológico e peróxido de hidrogênio – são eficientes na descontaminação das superfícies do titânio estudadas.
-
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (processo nº 020/2011) da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB/USP).

4.1 DISCOS DE TITÂNIO

Quarenta e dois discos de titânio comercialmente puro medindo 5mm de diâmetro por 3mm de altura foram especialmente fabricados para o experimento (Titanium Fix -AS Technology, Ltda. São José dos Campos, SP). Vinte discos apresentavam superfície usinada (lisa) e 20 apresentavam superfície rugosa do tipo SLA (Sand blasted, Large grit and Acid etched). Os discos foram disponibilizados pelo fabricante esterilizados por óxido de etileno e embalados em frascos herméticos contendo 5 discos cada frasco (Figura 1).



Figura 1- Discos de titânio de superfícies lisa e rugosa (A), nas embalagens lacradas (B) recebidas do fabricante

Para caracterizar a rugosidade superficial dos discos, um liso e um rugoso foram separados aleatoriamente da amostra para receberem análise perfilométrica. A perfilometria de contato foi realizada no Laboratório de Tecnologia da Usinagem (LATUS) da Faculdade de Engenharia de Bauru (FEB – UNESP) pelo Prof. Arthur Alves Fiocchi. O rugosímetro perfilômetro empregado possui apalpador com raio de ponta de 0,2 μm e resolução vertical de 16 nm (Form Talysurf Intra i60 – Taylor Hobson, Leicester/Inglaterra). A área de medição foi de 2,25 mm^2 (1,5 mm nas

direções X e Y) localizada no centro dos discos aproximadamente. Os parâmetros avaliados foram: R_a , que representa a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas dos afastamentos dos pontos do perfil de rugosidade, em relação à linha média, dentro do percurso de medição; Z, que representa a soma dos valores absolutos das ordenadas dos pontos de maiores afastamentos (acima e abaixo da linha média) existentes dentro de um comprimento de amostragem (ROSA, 2011).

4.2 COLETA DE PLACA SUBGENGIVAL

Durante um procedimento de raspagem e alisamento corono-radicular, coletou-se placa bacteriana de sítios com bolsa periodontal de 5 a 7 mm de profundidade presentes em um paciente do gênero masculino, de 59 anos de idade, sem doenças sistêmicas e com comprometimento periodontal crônico generalizado proveniente da clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. O paciente não havia sido submetido a qualquer intervenção periodontal e nem tomado qualquer medicamento nos 6 meses que antecederam o experimento.

Para a coleta da placa, foram empregadas de curetas de Gracey estéreis (Hu-Friedy do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), sendo uma haste para cada um de quatro sítios subgengivais de molares pertencentes a quadrantes diferentes. As amostras foram estocadas em meio protéico estéril BHI (37g/L) - Bacto™ brain heart infusion – (Becton, Dickinson and Company Sparks, Le Pont de Claix, France) com glicerol e congeladas a -20° C para posterior ativação.

A ativação das bactérias da placa se fez pelo seu descongelamento em estufa a 37° C por 24 horas e colocação em meio estéril BHI, em quantidade suficiente que permitisse a realização dos procedimentos, neste caso, pelo menos 2 mL.

Em estudo piloto, a viabilidade das amostras foi testada e, de forma aleatória, escolheu-se apenas uma delas para a contaminação dos discos de titânio.

4.3 CONTAMINAÇÃO DOS DISCOS

A fim de se evitar a contaminação do titânio por outro metal, os discos foram manipulados com pinças plásticas anatômicas esterilizadas em óxido de etileno (Kolplast CL Ltda, Itupeva-SP, Brasil). Todos os procedimentos foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar VLFS 18 (VECO Indústria Brasileira – Campinas, SP), condição que impediu a contaminação dos discos por bactérias do meio externo (Figura 2).



Figura 2 - Organização da câmara de fluxo, com os tubos de ensaio contendo os discos contaminados, as substâncias empregadas na desinfecção e os potes coletores universais onde os discos foram submersos

Os discos foram mergulhados individualmente em tubos de ensaio contendo 10 ml de BHI estéril durante 24 horas para permitir a formação de película adquirida em sua superfície. Em seguida, inoculou-se 100 μ L da solução contaminada e foram aguardadas 72 horas em estufa a 37° C para a maturação da placa bacteriana (LISTGARTEN, 1994). A proliferação bacteriana foi identificada visualmente pela turvação do meio (Figura 3).



Figura 3 - Discos mergulhados em meio BHI. Os três tubos da esquerda apresentam o meio turvado, significando grande proliferação bacteriana; nos três tubos da direita, o meio estéril apresenta-se límpido

Durante esse período, para aumentar a viabilidade das bactérias, retirou-se 1 mL de meio contaminado e acrescentou-se 1mL de meio novo a cada 24 horas.

4.4 DESCONTAMINAÇÃO DOS DISCOS

Para a descontaminação, 30 dos 40 os discos foram transferidos com o auxílio da pinça plástica para o interior de potes coletores universais descartáveis para amostras biológicas de 80 mL, graduados e estéreis (J. Prolab Ltda. – São José dos Pinhais-PR, Brasil) contendo 10 mL de gluconato de clorexidina a 0,12 % (Periogard, Colgate-Palmolive indústria e comércio Ltda, São Bernardo do Campo-SP, Brasil), ou de peróxido de hidrogênio a 1,5% (Peroxyl, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo-SP, Brasil), ou de soro fisiológico, onde permaneceram por 1 minuto (Figura 4). Posteriormente, os discos foram friccionados também por 1 minuto com *swab* (haste de plástico com a extremidade envolta em algodão) estéril (Absorve Jiangsu Medical Materials CO. LTD. Jiangsu, China), sendo para isso, apoiados na parte interna da tampa dos potes protegida por uma gaze estéril (Figura 5). Depois desses procedimentos, os discos foram novamente transferidos para tubos de ensaio contendo meio BHI límpido.

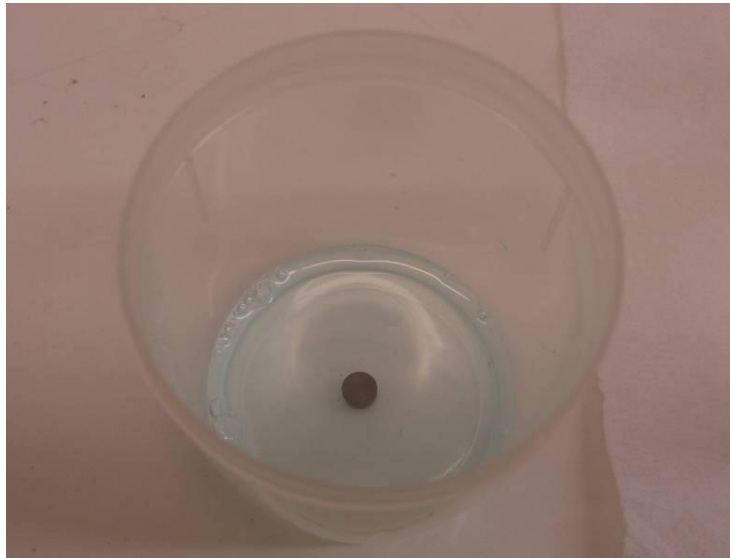


Figura 4- Disco mergulhado em 10 mL de substância descontaminante, neste caso o gluconato de clorexidina a 0,12%

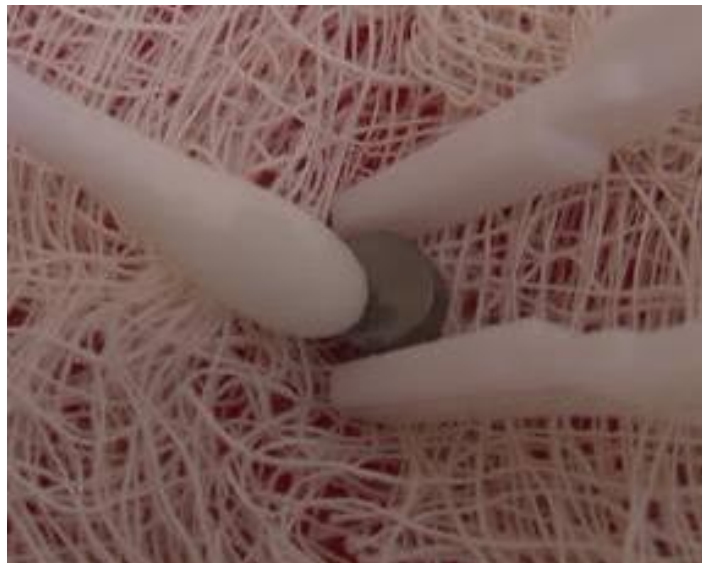


Figura 5 – Fricção do com swab estéril nas faces anterior, posterior e lateral do disco

Os demais 10 discos contaminados foram apenas transferidos do tubo de ensaio para o enxágue por 3 vezes com soro fisiológico, para servirem como controles positivos (sem descontaminação).

Desta forma, definiram-se grupos de estudo como a seguir:

- Grupo CLX_L – constituído de 5 discos contaminados de superfície lisa que receberam descontaminação por clorexidina;
- Grupo CLX_R – constituído de 5 discos contaminados de superfície rugosa que receberam descontaminação por clorexidina;
- Grupo H₂O₂_L – constituído de 5 discos contaminados de superfície lisa que receberam descontaminação por peróxido de hidrogênio;
- Grupo H₂O₂_R – constituído de 5 discos contaminados de superfície rugosa que receberam descontaminação por peróxido de hidrogênio;
- Grupo SF_L - constituído de 5 discos contaminados de superfície lisa que receberam descontaminação por soro fisiológico;
- Grupo SF_R - constituído de 5 discos contaminados de superfície rugosa que receberam descontaminação por soro fisiológico;
- Grupo C_L – constituído de 5 discos contaminados de superfície lisa que, após removidos dos tubos de ensaio, foram apenas lavados 3 vezes em soro fisiológico (controle positivo liso) e transferidos para o meio de cultura BHI;
- Grupo C_R – constituído de 5 discos contaminados de superfície rugosa que, após removidos dos tubos de ensaio, foram apenas lavados 3 vezes em soro fisiológico (controle positivo rugoso) e transferidos para o meio de cultura BHI.

4.5 PLAQUEAMENTO DE AMOSTRAS PARA CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

A turvação do meio, evidência visual de atividade microbiana, ocorreu em todas as amostras dos discos rugosos após 8 horas da descontaminação, ao passo que nos tubos contendo discos lisos, a turvação do meio só ocorreu após 24 horas. A partir de então, realizaram-se as diluições do meio para permitir a contagem das unidades formadoras de colônia da seguinte forma: 1mL do meio no qual os discos estavam mergulhados foi removido de cada tubo de ensaio e acrescentado a 9 mL

de solução Fisiológica estéril (diluição 10^{-1} ou 1/10). Procedeu-se à homogeneização do meio. Este procedimento foi repetido, resultando a diluição de 10^{-2} ou 1/100 e, assim, subseqüentemente, até as diluições de 10^{-5} (1/100.000) e 10^{-6} (1/1.000.000).

Conforme definido pelo projeto piloto, foram selecionadas as diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para semeadura em placas de Petri com Agar-sangue (Difco laboratories, Detroit MI, USA) na proporção de 43 g/L de água destilada. Com pipeta elétrica graduada em 20 mL preparam-se as placas de Petri (Figura 6).

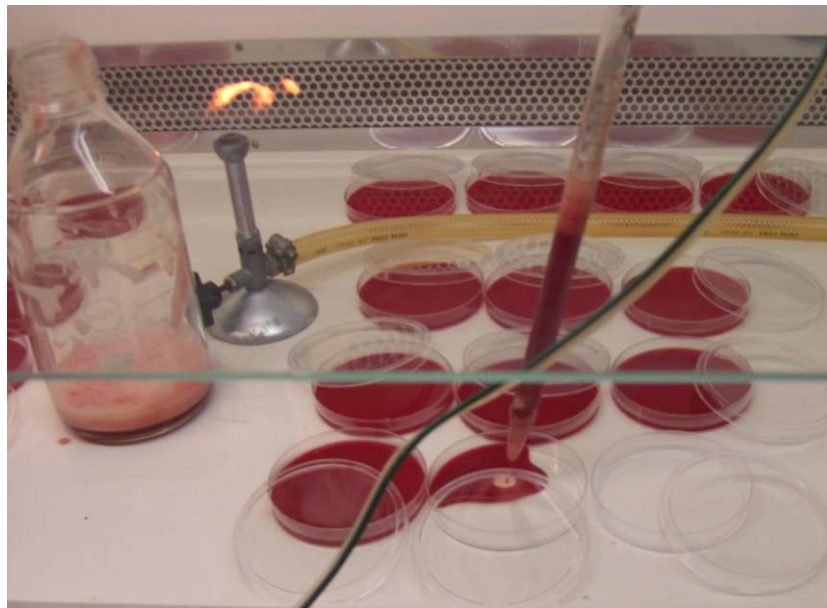


Figura 6 - Preparação das placas de Petri com Agar-sangue

Após geleificação, foram inoculados 50 μ L do meio contaminado diluído, realizando-se a semeadura com a alça de Digalski. As placas foram colocadas em jarra de CO_2 (90% CO_2 e 10% O_2) simulando a condição de anaerobiose e mantidas em estufa por 48 horas para permitir a formação de colônias bacterianas (Figura 7).



Figura 7 - Jarra de CO₂ com as placas e a vela para consumir o oxigênio simulando o ambiente de anaerobiose

A contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs) foi feita nas placas cuja diluição permitiu sua melhor visibilidade, ou por quadrante, quando as colônias eram muito numerosas. Os resultados foram multiplicados de acordo com a utilização ou não do quadrante, levando-se em conta a diluição e a quantidade inoculada (Figura 8).

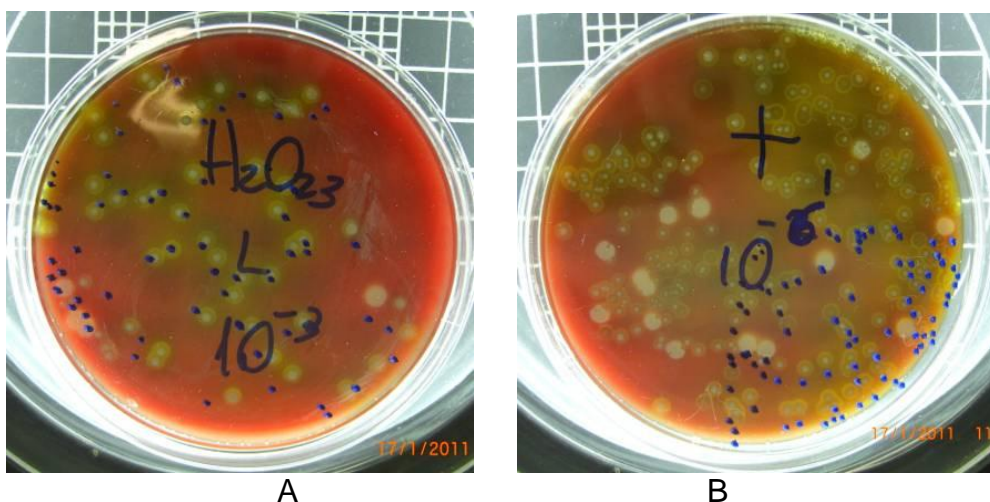


Figura 8 - Contagem das UFCs: A- Placa do Grupo H₂O₂, diluição de 10⁻³ na qual a contagem foi feita integralmente; B- Placa do Grupo controle positivo, diluição de 10⁻⁶ na qual se optou pela contagem por quadrante.

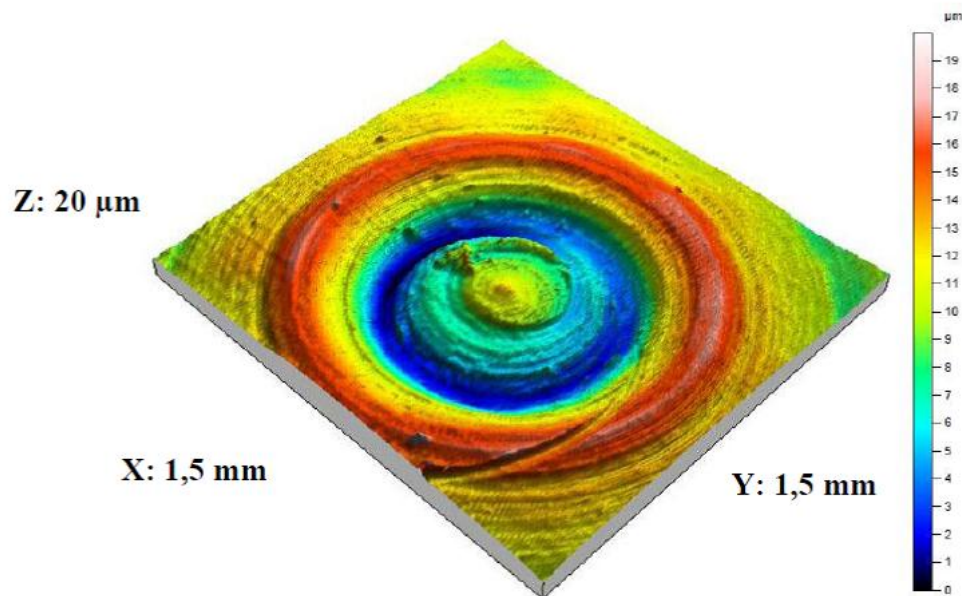
4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram consideradas para análise, as médias de UFCs obtidas para cada grupo, de acordo com o tipo de tratamento e com tipo de superfície. Após passar pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, todas as médias foram submetidas à análise de variância a dois critérios (ANOVA) complementada pelo teste de Tuckey para detectar diferenças entre os tipos de superfície e entre os agentes descontaminantes.

5 Resultados

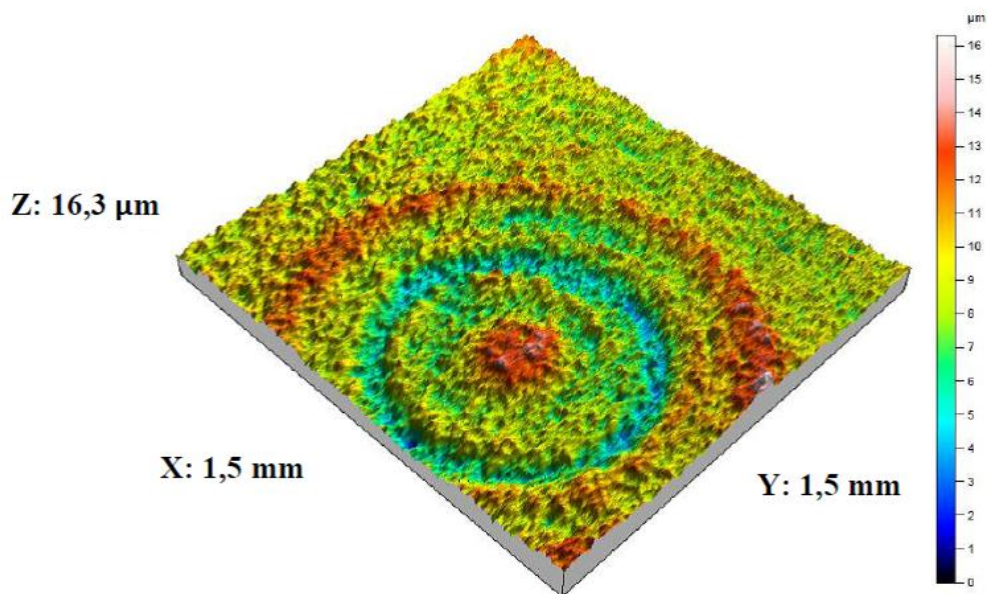
5 RESULTADOS

A análise perfilométrica resultou em valores de rugosidade média (R_a) de $0,531\mu\text{m}$ para os discos lisos e de $0,636\mu\text{m}$, para os rugosos. Outro parâmetro perfilométrico, relativo à distância máxima entre o ponto mais profundo (vale) e o mais alto (pico), representado pela letra Z, estabeleceu os valores médios de $20\mu\text{m}$ para os implantes lisos e $16,3\mu\text{m}$ para os rugosos. X e Y representam a extensão da região analisada e Z a distância máxima entre picos e vales (Figuras 9 e 10).



Fonte: SALMERON, 2011

Figura 9 - Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco liso produzida pelo perfilômetro de contato. X e Y indicam as extensões avaliadas. A escala indica a variação de profundidade. Z é a distância do ponto mais profundo ao ponto mais alto (pico, $Z = 20\mu\text{m}$)



Fonte: SALMERON, 2011

Figura 10 - Imagem superficial obtida próximo ao centro geométrico do disco rugoso através do perfilômetro de contato. X e Y indicam as extensões avaliadas. A escala indica a variação de profundidade. Z é a distância do ponto mais profundo ao ponto mais alto (pico, $Z = 16,3\mu\text{m}$)

A observação desses dois parâmetros permitiu verificar que a amostra de discos disponibilizada pelo fabricante possui valores de R_a bastante próximos para lisos e rugosos. Os valores de Z, interpretados isoladamente, surpreendentemente mostraram rugosidade maior para os implantes fornecidos como lisos.

A turvação do meio, evidência visual de atividade microbiana, ocorreu em todas as amostras dos discos rugosos após 8 horas da descontaminação, ao passo que nos tubos contendo discos lisos, a turvação do meio só ocorreu após 24 horas.

As diluições nas quais foi possível fazer as contagens de UFCs variaram muito entre os grupos e, dentro do mesmo grupo, entre as amostras. As contagens médias de UFCs encontradas nos grupos estudados encontram-se representadas no gráfico 1 e descritas na Tabela 1.

Levando-se em consideração o tipo de superfície, os grupos CLX_R e CLX_L foram os que apresentaram maior redução microbiana, seguidos pelos grupos H_2O_{2L} , H_2O_{2R} , S_L e S_R (Gráfico 1).

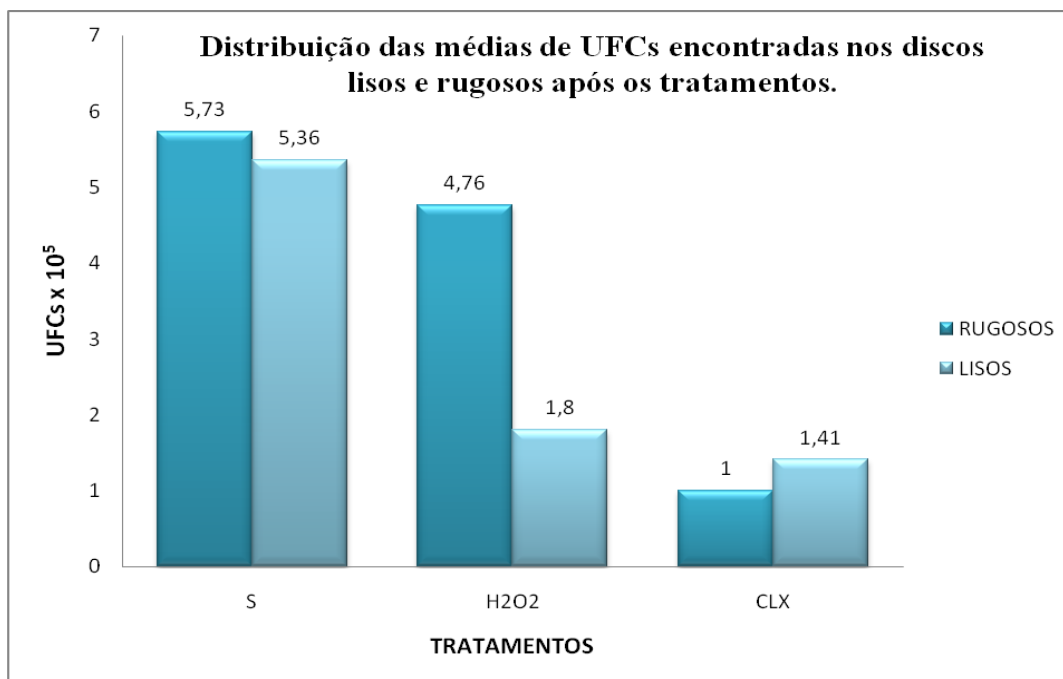


Gráfico 1

Tabela 1 - Número de UFCs nos grupos de estudo após contaminação (controle) e/ou descontaminação

Grupo	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 4	Disco 5	Média ± d.p.
S_R	4,2 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁵	9,8 x 10 ⁵	0,15x 10 ⁵	8,9 x 10 ⁵	5,73±3,88 x 10 ⁵
H2O2_R	5,9 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁵	5,5 x 10 ⁵	3,8 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁵	4,76±0,94 x 10 ⁵
CLX_R	1,2 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	0,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	0,6 x 10 ⁵	1,00±0,6 x 10 ⁵
C_R	0,33x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	1,51±0,87 x 10 ⁸
S_L	3,6 x 10 ⁵	8,2 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁵	5,36±2,8 x 10 ⁵
H2O2_L	4,3 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	6,3 x 10 ⁴	5,1 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵	1,80±2,1 x 10 ⁵
CLX_L	7,3 x 10 ³	6,0 x 10 ⁵	0,4 x 10 ⁵	5,9 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	1,41±2,58 x 10 ⁵
C_L	1,4 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁸	1,67±0,38 x 10 ⁸

d.p. = desvio padrão

Quando comparados discos lisos e rugosos pelo teste ANOVA não foi identificada diferença estatisticamente significativa quanto à contaminação ($p=0,283$) nem quanto à descontaminação ($p=0,284$) com qualquer dos agentes. Conseqüentemente, os discos foram reagrupados e analisados os dados de lisos e rugosos como um todo, descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Contagem média de UFCs produzidas após os diferentes tratamentos reagrupando-se os discos lisos e rugosos

Tratamentos	Soro	Clorexidina	H ₂ O ₂	Controle
Média ± d.p.	5,55±3,19x10 ⁵	1,21±1,78x10 ⁵	3,28±2,19x10 ⁵	1,59±0,64x10 ⁸
	A	B	AB	C

d.p.= desvio padrão

letras iguais significam que não há diferença estatisticamente significativa

Todos os tratamentos foram efetivos em diminuir o número de UFCs comparados ao grupo controle. Considerando-se os números da tabela 2, os tratamentos com soro fisiológico, peróxido de hidrogênio e clorexidina apresentaram respectivamente 0,34%, 0,20% e 0,07% do valor de UFCs obtidos nos discos contaminados do controle, ou seja, mais de 99% de redução com qualquer dos agentes descontaminantes.

Quando discos lisos e rugosos foram considerados em conjunto, manteve-se a seguinte ordem decrescente de poder descontaminante: clorexidina, peróxido de hidrogênio, soro fisiológico e controle positivo (Gráfico 2).

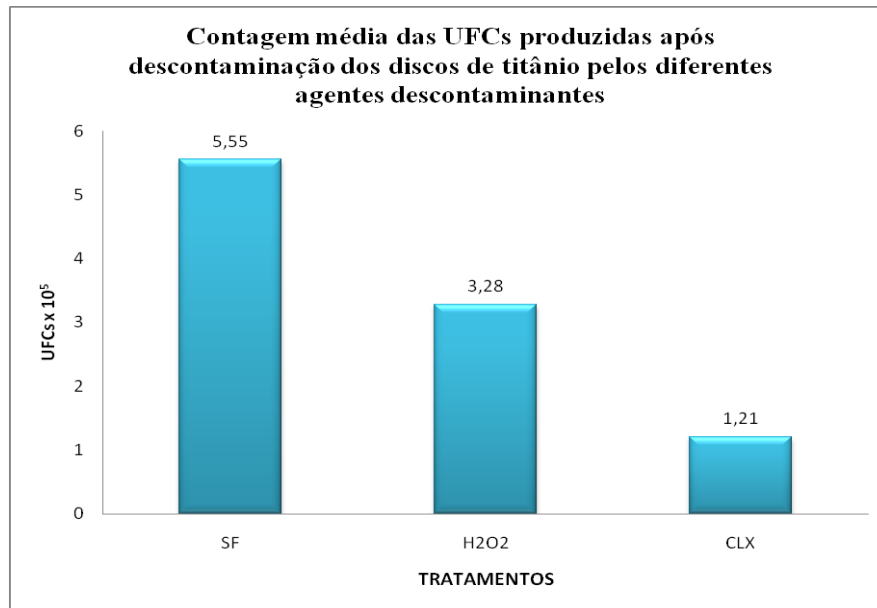


Gráfico 2

Quando os tratamentos foram comparados entre si, somente houve diferença estatisticamente significativa ao teste de Tukey, entre os grupos tratados com clorexidina e soro fisiológico ($p=0,002$), com superioridade de descontaminação para a clorexidina. Embora numericamente diferentes, os tratamentos com clorexidina e peróxido de hidrogênio não diferiram estatisticamente entre si ($p=0,155$) e também não houve diferença entre o tratamento com peróxido de hidrogênio e soro fisiológico ($p=0,113$).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A peri-implantite vem sendo alvo de estudos constantes que enfocam etiologia e modo de progressão (JOVANOVIC et al., 1993; ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994; HÜRZELER et al., 1995; QUIRYNEN et al., 2005), epidemiologia e fatores de risco (LINDHE; MEYLE, 2008), assim como estratégias de tratamento (MOMBELLI; LANG, 1992; ERICSSON et al., 1996; MOMBELLI, 2002; QUIRYNEN et al., 2002; HAYEK et al., 2005).

Vários agentes descontaminantes tem sido testados com diferentes metodologias sobre variados tipos de superfícies, *in vitro* e *in vivo*, sem que esteja claramente definida a previsibilidade desses métodos (LEONHARDT; DAHLÉN; RENVERT, 2003; KOTSOVILIS et al., 2008), ou identificada a superioridade de um agente descontaminante sobre outro (CLAFFEY et al., 2008), ou ainda, comprovada a eficácia desses agentes na limpeza de superfícies de titânio contaminadas (NTROUKA et al., 2010).

Analisando-se os resultados desta pesquisa, um dos primeiros pontos que chamou a atenção foi ausência de diferença estatística entre discos de superfície lisa e rugosa, o que levou ao reagrupamento dos discos, que passaram a ser considerados como um todo dentro dos grupos de tratamento. Isto fez com que o tamanho das amostras aumentasse de 5 para 10 unidades de disco por tipo de tratamento. Com base nesses números é que os resultados serão discutidos.

Os resultados deste estudo permitiram verificar que o uso de substâncias comumente empregadas em clínica odontológica como clorexidina, peróxido de hidrogênio e até mesmo soro fisiológico, são capazes de reduzir drasticamente a carga bacteriana da superfície de implantes de titânio, já que todos eles reduziram em mais de 99% a contagem de UFCs em comparação às amostras contaminadas e não tratadas. Entretanto, diferença estatisticamente significativa ocorreu apenas entre a clorexidina e o soro fisiológico, resultado que reitera o uso da clorexidina no tratamento da peri-implantite como vem sendo preconizado (ERICSSON et al., 1996; MOMBELLI, 2002).

Sobre a clorexidina é importante lembrar que pertence ao grupo das bisbiguanidas na categoria de catiônico surfactante (CIANCIO, 1995; MEFFERT, 1996). Apresenta substantividade para superfície dental e mucosa oral, baixa irritabilidade com poucos efeitos adversos (MEFFERT, 1996; SLOTS; JORGENSEN, 2008). Seu mecanismo de ação consiste em alterar a integridade da parede celular de bactérias, penetrando no interior da célula em altas concentrações e, em baixas concentrações, agindo como bacteriostático (CIANCIO, 1995; MEFFERT, 1996). *In vitro*, a clorexidina adere ao titânio do implante, o que a torna potencialmente benéfica para a descontaminação da superfície (MEFFERT, 1996). Sua comprovada ação clínica somada aos fatores acima expostos pode explicar o desempenho da clorexidina neste estudo.

Ainda que a clorexidina apresente amplo espectro de ação e eficiência comprovada em sítios intra-buciais (EMILSON, 1977; STANLEY; WILSON; NEWMAN, 1989; QUIRYNEN et al., 2002; ZABLOTSKY; DIETRICH; MEFFERT, 1992; HAYEK et al., 2005; MOMBELLI; LANG, 1992), a eliminação total de microrganismos não é conseguida, provavelmente devido à organização microbiana em biofilme, condição que protege os microrganismos da ação de agentes anti-infecciosos (GILBERT; DAS; FOLEY, 1997; BROWN; ALLISON; GILBERT, 1988).

Além disso, como os agentes foram aplicados na forma de fricção, a ação mecânica do *swab* pode não ter sido capaz de desorganizar totalmente o biofilme formado para permitir a penetração do agente descontaminante. Stewart em 2003 estudou a penetração de substâncias no biofilme microbiano através da difusão. Sua simulação da penetração da clorexidina 0,2% em um biofilme microbiano de streptococos na temperatura 30 °C chegou ao tempo de 298 segundos, ou seja, quase 5 minutos. Isto pode explicar a permanência de microrganismos viáveis, já que o tempo de aplicação de 1 minuto e a concentração de 0,12% podem ter sido insuficientes para destruir o biofilme da placa periodontal.

Uma alternativa possível para favorecer a ação da clorexidina seria a aplicação de peróxido de hidrogênio previamente para quebrar a integridade do biofilme: sua ação oxidante resultaria na supressão microbiana, conforme foi proposto por Leonhardt, Dahlén e Renvert (2003). Entretanto, o objetivo deste estudo não foi avaliar as substâncias em associação, mas isoladamente.

Por outro lado, a remoção não completa da contaminação das superfícies de implantes não foi obstáculo para a ocorrência de re-osseointegração no estudo de Alhag et al. (2008), embora em menor proporção do que em implantes não contaminados. Esses dados foram obtidos em peri-implantite produzida experimentalmente em cães e acenam com a possibilidade de que o próprio organismo seja capaz de eliminar a contaminação residual. Este argumento também foi usado por Salmeron (2011) em implantes descontaminados por laser, terapia fotodinâmica e azul de toluidina O. Quando implantados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e sem contato com o meio externo houve condição favorável à resolução do processo inflamatório simplesmente com o passar do tempo.

Quanto ao peróxido de hidrogênio, seu uso mais freqüente em implantodontia é no tratamento dado à superfície do implante no processo de fabricação, devido ao seu potencial de reduzir a camada de óxido superficial, elevando assim os níveis de titânio e oxigênio, e reduzindo os níveis de carbono (MOUHUI; SENNERBY; VAN RECK, 2000; MOUHUI et al., 2000). A suspeita de que pode causar alterações estruturais da superfície quando usado em altas concentrações levou Ungvári et al. (2010) a testarem esse efeito, sem que obtivessem a comprovação de qualquer dano superficial. Em todo caso, a concentração do peróxido de hidrogênio usado neste estudo de 1,5% foi muito baixa para representar qualquer risco.

Como não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre a limpeza com soro fisiológico e com peróxido de hidrogênio, é provável que a ação da limpeza mecânica, mais do que do próprio agente descontaminante, possa ter sido responsável por grande parte da redução das UFCs verificada (KOLONIDIS et al., 2003). De fato, Zablotsky, Diedrich e Meffert (1992) também já haviam constatado que a brunidura por um minuto com fragmentos de algodão embebidos em água estéril sobre superfícies de titânio contaminadas com *Escherichia coli* reduzia consideravelmente os níveis de lipopolissacarídeos sobre essas superfícies, mesmo as rugosas.

Outros pesquisadores também verificaram eficiência do soro fisiológico na descontaminação da superfície de implantes (ROOS-JANSÁKER; RENVERT; EGELBERG, 2003; LEONHARDT et al., 2006; ALHAG et al., 2008). Mas resultados contrários defendem que o soro fisiológico não promove descontaminação

apropriada com resultados inferiores à maioria dos outros tratamentos de superfície (MEFFERT, 1996; SUMMERS et al., 2000; CHERRY et al., 2007; KOSUTIC et al., 2009).

Tem-se procurado estudar a ação de agentes descontaminantes na forma de escovação (ALHAG et al., 2008), irrigação subgengival (HAYEK et al., 2005), imersão de implantes contaminados nas substâncias (MOUHYI et al., 2000; GOSAU et al., 2010; BAFFONE et al., 2011), limpeza suave (LEONHARDT; DAHLÉN; RENVERT, 2003), spray em alta pressão (PARLAR et al., 2009) e por fricção (ALHAG et al., 2008). Em realidade, se por um lado, a imersão das amostras na substância descontaminante elimina a variável ação mecânica, por outro, é um método inviável na prática clínica. Neste estudo, procurou-se reproduzir o procedimento que seria normalmente adotado na descontaminação de implantes *in situ*, seguindo o tempo de bochecho preconizado pelo fabricante, com o argumento de que a fricção realizada em todos os grupos de tratamento é uma variável que provavelmente não interferiu nos resultados.

Com base nas evidências de que há similaridade entre as microbiotas da doença periodontal crônica e da peri-implantite (MOMBELLI; LANG, 1992; LINDHE et al., 1992; MOMBELLI; LANG, 1994; MEFFERT, 1996; LANG et al., 1997; SHIBLI et al., 2008; HEITZ-MAYFIELD, 2008; EMRANI; CHEE; SLOTS, 2009; NOROWSKI JR.; BUMGARDNER, 2009), optou-se pela contaminação da superfície do titânio com placa bacteriana obtida de sítios subgengivais com doença periodontal instalada. Foi verificado que o biofilme microbiano se formou tanto em superfícies lisas como em rugosas, já que a limpeza mecânica e o enxágüe não permitiram sua total remoção. Além disso, houve crescimento microbiano após os tratamentos de descontaminação realizados, o que permitiu afirmar que as bactérias da periodontite crônica podem colonizar os dois tipos de superfície de titânio, confirmando dados já existentes sobre a capacidade de aderência dos patógenos periodontais aos implantes (COVANI et al., 2006).

A contagem de unidades formadoras de colônia tem sido empregada para verificar o resultado da descontaminação de implantes em diversos estudos (DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; PEREIRA DA SILVA et al., 2005; HAYEK et al.,

2005; NTROUKA et al., 2011), por esta razão, foi o método eleito para esta avaliação.

Tem sido proposto que implantes de superfície rugosa agregam mais bactérias do que lisos (DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; PEREIRA DA SILVA et al., 2005). De fato, alguma diferença no comportamento das bactérias foi observada durante o experimento relacionada à característica de superfície dos discos de titânio: a turvação do meio de cultura, que é uma evidência visual de intensa atividade microbiana, ocorreu após 8 horas da descontaminação em discos rugosos enquanto os meios dos discos lisos ainda estavam visualmente límpidos, só apresentando turvação após 24 horas. Este dado pode ser interpretado como um maior controle, porém temporário, do crescimento bacteriano nas amostras de superfície lisa em comparação às de superfície e rugosa após exposição ao agente descontaminante. Entretanto, não foram encontradas diferenças entre superfícies lisas e rugosas quanto à capacidade de adsorver bactérias assim como de serem descontaminadas por quaisquer dos agentes, contrariamente ao que tem sido afirmado por alguns pesquisadores (DENNISON et al., 1994; DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; PEREIRA DA SILVA et al. 2005) e em acordo com outros (PARLAR et al., 2009; SALMERON, 2011).

Essas divergências podem indicar que algum outro fator pode estar interferindo nas análises, como peculiaridades metodológicas, características de fabricação, ou até mesmo a interpretação do que é liso e o que é rugoso. O índice de rugosidade (R_a) de um exemplar de disco liso foi de $0,531\mu\text{m}$ e o de um dos discos rugosos foi de $0,636\mu\text{m}$. Esses números muito aproximados podem não refletir uma diferença de fato por terem sido realizados em apenas um exemplar de cada amostra. Embora os discos sejam visualmente diferentes, seria necessária uma análise mais aprimorada para verificar se há diferença relevante entre os índices de rugosidades de superfície dos discos empregados.

A rugosidade média (R_a) dos discos lisos e rugosos empregados neste estudo, $0,531\mu\text{m}$ e $0,636\mu\text{m}$, respectivamente, são muito superiores ao que foi apresentado por Pereira da Silva et al. (2005) como representativo de rugosidade moderada ($R_a=0,17\mu\text{m}$). Em relação aos dados desses autores, os discos lisos desta pesquisa apresentaram um número cerca de 3400 vezes maior de UFCs antes da

descontaminação (167000×10^3 contra 49×10^3). Após a descontaminação, o melhor resultado encontrado neste estudo (10^5 UFCs no grupo CLX_R) não pode ser comparado aos de Pereira da Silva et al. (2005), pois estes não se utilizaram de biofilme poli-microbiano e nem encontraram bactérias viáveis após o uso de jato de bicarbonato de sódio em alta pressão.

Outro dado surpreendente foi que a distância máxima obtida entre os picos e vales na superfície da área analisada pelo perfilômetro (Z) alcançou 20µm no disco liso e 16,3µm no disco rugoso. Estes dados sugerem uma possível falta de uniformidade superficial dos discos lisos em comparação aos rugosos. De certa forma, podem explicar a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os procedimentos nos diferentes tipos de superfície. Como na pesquisa de Salmeron (2011) foram usados discos semelhantes, também esta autora não conseguiu observar diferenças na resposta inflamatória induzida pela implantação de discos de rugosidades superficiais nominalmente diferentes em tecido subcutâneo de ratos. Especula-se que possam ter permanecido nas amostras de discos lisos marcas resultantes da usinagem que não foram eliminadas por um protocolo posterior de polimento, interferindo nos resultados obtidos.

Uma discussão interessante a ser levantada quanto à rugosidade superficial seria analisar a topografia superficial de amostras de implantes considerados lisos ou rugosos através de perfilometria e avaliar a potencialidade de retenção de bactérias em suas irregularidades superficiais. Ainda, outros parâmetros perfilométricos poderiam ser analisados juntamente com o R_a e Z para caracterizar de forma mais apropriada superfícies lisas e rugosas.

Deve ser enfatizado que os agentes de descontaminação aqui estudados são acessíveis a qualquer clínico, independente da área de atuação. Como os implantes são uma modalidade de tratamento cada vez mais acessível e freqüente, as complicações referentes a esta terapia podem ocorrer não só imediatamente, como também anos depois da sua implantação. Este fato faz com que os controles passem cada vez mais a ser responsabilidade do clínico geral.

As revisões sistemáticas existentes comprovam a deficiência de resultados clínicos (KOTSOVILLIS et al. 2008), de dados sobre previsibilidade (CLAFFEY et al., 2008) e sobre a eficiência dos agentes descontaminantes disponíveis (NTROUKA et

al., 2010). Ainda é necessária a comprovação através de estudos clínicos, controlados e em longo prazo da eficácia dos numerosos métodos de descontaminação de superfície de implantes sugeridos para melhor esclarecer o tema tratamento da peri-implantite.

A dificuldade em se comparar os resultados aqui obtidos com trabalhos prévios está nas diferentes concentrações das agentes químicos empregados, nas diversas formas de aplicação, além das numerosas associações possíveis com outras terapias, tornando difícil o estabelecimento de um protocolo específico de tratamento.

Em suma, é indiscutível que implantes que tenham sido expostos à contaminação bacteriana precisam ser descontaminados para que qualquer modalidade de terapia alcance sucesso. Porém, o que se pode depreender da realização deste estudo, é que esta descontaminação não é completa, mas pode ser alcançada com o uso de substâncias de uso comum na prática clínica diária, sem que a característica de rugosidade de superfície seja um fator limitante para o procedimento. Ainda, que a clorexidina a 0,12% e o peróxido de hidrogênio a 1,5% são boas opções para cumprir essa finalidade, já que, quando usadas friccionadas nas superfícies, podem somar o efeito da limpeza mecânica com a ação química antimicrobiana dessas substâncias.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Foi possível concluir dentro das limitações metodológicas desta pesquisa que:

1. Bactérias da periodontite crônica são capazes de formar biofilme, contaminar e permanecer aderidas a discos de titânio lisos e rugosos, mesmo após os tratamentos de descontaminação;
 2. Discos lisos e rugosos como os que foram empregados neste estudo não apresentam diferenças significantes na contaminação e descontaminação superficial;
 3. Clorexidina a 0,12%, peróxido de hidrogênio a 1,5% e soro fisiológico reduzem em mais de 99% o contingente bacteriano superficial, com superioridade da clorexidina sobre o soro fisiológico, mas sem diferença significativa entre clorexidina e peróxido de hidrogênio quanto ao número de UFCs após os tratamentos;
 4. Como o soro fisiológico resultou em descontaminação tão eficiente quanto a apresentada pelo peróxido de hidrogênio, é provável que a ação mecânica da fricção aplicada seja mais importante na redução microbiana superficial do que o tipo de agente empregado.
-
-

Referências

REFERÊNCIAS

Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark P, Jemt T. A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990;5(4):347–59.

Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of Session IV. In: Lang, N. P. & Karring, T. (eds) *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. 1994. p 365–9. London: Quintessence Publishing Co. Ltd.

Alhag M, Renvert S, Polyzois I, Claffey N. Re-osseointegration on rough implant surfaces previously coated with bacterial biofilm: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(2):182-7.

Bach G, Neckel C, Mall C, Krekeler G. Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. *Implant Dent*. 2000;9(3):247–50.

Baffone W, Sorgente G, Campana R, Patrone V, Sisti D, Falcioni T. Comparative effect of chlorhexidine and some mouthrinses on bacterial biofilm formation on titanium surface. *Curr Microbiol*. 2011; 62(2):445–51.

Baier RE, Meyer AE. Implant surface preparation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988;3(1):9–20

Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990;5(1):31–8.

Behneke A, Behneke N, d'Hoedt B. Treatment of peri-implantitis defects with autogenous bone grafts: six-month to 3-year results of a prospective study in 17 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(1):125-38.

Berglundh, T.; Persson, L.; Klinge, B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol*. 2002;29(3):197–212

Brown MRW, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother*. 1988;22(6):777–83.

Cherry M, Daly CG, Mitchell D, Highfield J. Effect of rinsing with povidone-iodine on bacteraemia due to scaling: a randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2007;34(2):148-55.

Ciancio SG. Mechanical and chemical supragingival plaque control. *Periodontol* 2000. 1995;8(1):1-136.

Claffey N, Clarke E, Polyzois I, Renvert S. Surgical treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):316-32.

Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent.* 2006;15(3):298-304.

Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Caffesse RG. Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *J Periodontol.* 1994;65(10):942-8.

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

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

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

Emrani J, Chee W, Slots J. Bacterial colonization of oral implants from nondental sources. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009;11(2):106-12.

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

Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol.* 2006;33(12):929–35.

Gilbert P, Das JR, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res.* 1997;11(1):160–7.

- Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(8):866-72.
- Hayek RR, Araújo S, 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.
- Heintz-Mayfield, L. J. Diagnosis and management of peri-implant diseases. *Aust Dent J.* 2008; 53(1):43-8.
- Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M, et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil.* 2007;34(5):377-82.
- Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(4):349-58.
- Hürzeler MB, Quiñones CR, Morrison EC, Caffesse RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 1: Clinical findings and histologic observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995;10(4):474-84.
- Hürzeler MB, Quiñones CR, Schüpbach P, Morrison EC, Caffesse RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: histologic findings. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(2):68–175.
- Jovanovic SA. The management of peri-implant breakdown around functioning osseointegrated dental implants. *J Periodontol.* 1993;64(11):1176-83.
- Jovanovic SA, Kenney EB, Carranza Jr. FA, Donath K. The regenerative potential of plaque-induced peri-implant bone defects treated by a submerged membrane technique: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993;8(1):13-8.
- Kolonodis SG, Renvert S, Hämmerle CH, Lang NP, Harris D, Claffey N. Osseointegration on implant surfaces previously contaminated with plaque An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):373–80.
- Kosutic D, Uglesic V, Perkovic D, Persic Z, Solman L, Lupi-Ferandin S, et al. Preoperative antiseptics in clean/contaminated maxillofacial and oral surgery: prospective randomized study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38(2):160-5.
-

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

Lang NP, Mombelli A, Tonetti MS, Brägger U, Hämmerle CH. Clinical trials on therapies for peri-implant infections. *Ann Periodontol*. 1997;2(1):343-56.

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

Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res*. 1992;3(1):9-16.

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

Listgarten, MA. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000*. 1994;5(1):52-65.

Meffert RM. Periodontitis vs. Peri-Implantitis: The Same Disease? The Same Treatment? *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(3):278-91.

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

Mombelli A, Lang NP. Microbial aspects of implant dentistry. *Periodontol 2000*. 1994;4(1):74-80.

Mombelli A. Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. *Opin Periodontol*. 1997;4(2):127-36.

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

Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2002;28(1):177-89.

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

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

Mouhyi J, Sennerby L, Wennerberg A, Louette P, Dourov N, van Reck J. Re-Establishment of the Atomic Composition and the Oxide Structure of Contaminated Titanium Surfaces by Means of Carbon Dioxide Laser and Hydrogen Peroxide: An In Vitro Study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2000;2(4):190-202.

Nagassa ME, Daw AE, Rowe WG, Carley A, Thomas DW, Moseley R. Optimisation of the hydrogen peroxide pre-treatment of titanium: surface characterisation and protein adsorption. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(12):1317-26.

Norowski PA Jr, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88(2):530-43.

Ntrouka VI, Slot DE, Louropoulou A, Van der Weijden F. The effect of chemotherapeutic agents on contaminated titanium surfaces: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2010;22(7):681-90.

Ntrouka VI, Hoogenkamp M, Zaura E, van der Weijden F. The effect of chemotherapeutic agents on titanium-adherent biofilms. *Clin Oral Implants Res.* 2011 15. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2010.02085.x

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

Pereira da Silva CH, Vidigal GM Jr, de Uzeda M, de Almeida Soares G. Influence of titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. *Implant Dent.* 2005;14(1):88-93.

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

Quirynen M, Vogels R, Alsaadi G, Naert I, Jacobs R, van Steenberghe D. Predisposing conditions for retrograde peri-implantitis, and treatment suggestions. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(5):599-608.

Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000.* 2002;28(1):72–90.

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

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

Renvert S; Polyzois I; Maguire R. Re-osseointegration on previously contaminated surfaces: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(4):216-27.

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

Rimondini L, Farè S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol.* 1997;68(6):556-62.

Roos-Jansåker AM. Long time follow up of implant therapy and treatment of peri-implantitis. *Swed Dent J.* 2007;(188):57-66.

Rosa LC. Oficina Mecânica para Automação. Acabamento de Superfícies. Rugosidade Superficial. Sorocaba (SP): Universidade Estadual Paulista. Disponível em <http://www.sorocaba.unesp.br/professor/luizrosa/index_arquivos/OMA_RUGOSIDA DE.pdf> acesso em 30 de junho de 2011.

Salmeron S. Efeitos do laser em baixa intensidade, da terapia fotodinâmica e do azul de toluidina O na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2011 (no prelo).

Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19(7):140-9.

Shibli JA, Silverio KG, Martins MC, Marcantonio EJr, Rossa CJr. Effect of air-powder system on titanium surface on fibroblast adhesion and morphology. *Implant Dent.* 2003; 12(1):81-6.

Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Oct;19(10):975-82.

Shibli JA, Theodoro LH, Haypek P, Garcia VG, Marcantonio EJr. The effect of CO2 laser irradiation on failed implant surfaces. *Implant Dent.* 2004;13(4):104–14.

Slots J, Jorgensen MG. Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Aust Dent J.* 2008;53(1):43-8.

Stanley A, Wilson M, Newman HN. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol.* 1989;16(4):259–64.

Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol.* 2003;185(5):1485–91.

Summers AN, Larson DL, Edmiston CE, Gosain AK, Denny AD, Radke L. Efficacy of preoperative decontamination of the oral cavity. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(4):895-900.

Ungvári K, Pelsöczy IK, Kormos B, Oszkó A, Rakonczay Z, Kemény L, et al. Effects on titanium implant surfaces of chemical agents used for the treatment of peri-implantitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;94(1):222-9.

Wennerberg A, Ektessabi A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. A 1-year follow-up of implants differing surface roughness placed in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(4):486–94.

Zablotsky MH, Diedrich DL, Meffert RM. Detoxification of endotoxin-contaminated titanium and hydroxyapatite-coated surfaces utilizing various chemotherapeutic and mechanical modalities. *Implant Dent.* 1992;1(2):154-8.


Zablotsky MH, Meffert R, Mills O, Burgess A, Lancaster D. The macroscopic, microscopic and spectrometric effects of various chemotherapeutic agents on the plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implant surface. *Clin Oral Implants Res.* 1992;3(4):189-98.

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

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):286-91.

Anexos

Anexo A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP



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

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

Processo nº 020/2011

Bauru, 31 de março de 2011.


Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "ANÁLISE MICROBIOLÓGICA COMPARATIVA DA AÇÃO DE DIFERENTES AGENTES DESCONTAMINANTES SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO", de autoria de Renata Rodrigues de Freitas Blagitz, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 30 de março de 2011 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

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

Anexo B – Comitê de Ética: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (frente)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A pesquisa “**Análise microbiológica comparativa da ação de diferentes agentes descontaminantes sobre superfícies de titânio**” será realizada no Departamento de Prótese – Disciplina de Periodontia pela aluna de doutorado Renata Rodrigues de Freitas Blagitz sob orientação da professora Maria Lúcia Rubo de Rezende.

É comum a doença gengival acontecer de forma semelhante nos dentes e nos implantes. Da mesma maneira que nos dentes, o dentista deve raspar, limpar e lavar a superfície do implante com produtos como, por exemplo, a água oxigenada para tentar diminuir a inflamação.

As bactérias da placa dental também são parecidas com as do implante. O objetivo deste trabalho é colher essa placa de um paciente que tenha problemas de gengiva e usá-la para contaminar em laboratório a superfície de implantes que não servirão para tratar nenhum paciente. Estes implantes serão limpos com líquidos de bochecho comprados em farmácia para ver se funcionam bem na limpeza dos implantes.

Não existem riscos nem benefícios diretos para o paciente que participar da pesquisa, além dos existentes devido ao tratamento de raspagem. Nada muda no comportamento do dentista, nem no tratamento quando não há a coleta deste material. Porém, o resultado poderá beneficiar muitas pessoas que têm doença gengival nos implantes.

Quaisquer dúvidas e informações, entrar em contato com a pesquisadora Renata R. F. Blagitz no tel. (14) 97966067, ou no depto. De Periodontia da FOB-USP no tel. (14) 32358278.

As reclamações podem ser feitas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP, tel. (14) 32358356 com Maristela P. Ferrari (secretária).

Anexo C - Comitê de Ética: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (verso)

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a):

_____,
portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa sem prejuízo ao seu tratamento na FOB. Todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e são guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo, assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de .

Assinatura do Sujeito da Pesquisa
(paciente)

Assinatura do Autor
(Pesquisador)