

Efeito da aPDT na osseointegração de implantes em alvéolos contaminados

Effect of aPDT in the osseointegration of implants in contaminated dental sockets

Letícia Helena THEODORO^a, Juliano Milanezi de ALMEIDA^a,
Erivan Clementino GUALBERTO JUNIOR^a, Leandro Araujo FERNANDES^b,
Luis Geraldo da SILVEIRA^c, Mariéllen LONGO^a, Elcio MARCANTONIO JUNIOR^d,
Valdir Gouveia GARCIA^{a,c}

^aDepartamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 16015-050 Araçatuba - SP, Brasil

^bDepartamento de Clínica e Cirurgia, Faculdade de Odontologia,
UNIFAL – Universidade Federal de Alfenas, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas,
UNIFEB – Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos,
14783-226 Barretos - SP, Brasil

^dDepartamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Universidade Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

Resumo

Objetivo: Avaliar por meio de análises histométrica e imuno-histoquímica os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento alveolar prévio à colocação de implantes, em alvéolos de dentes de ratos portadores ou não de doença periodontal induzida. **Material e método:** Trinta e dois ratos foram utilizados no estudo. A doença periodontal foi induzida nos primeiros molares inferiores esquerdos. Decorridos sete dias, foi realizada a remoção da ligadura e a exodontia dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos. A seguir, os animais foram divididos em dois grupos de 16 animais, de acordo com os tratamentos realizados nos alvéolos dentais antes da instalação do implante imediato: DM-debridamento mecânico (DM), irrigação com 1 mL de soro fisiológico seguida de instalação do implante; aPDT-DM, irrigação com 1 mL de azul de toluidina O (TBO) e, após 1 minuto, irradiação com laser em baixa intensidade (LLLT). Oito animais de cada grupo foram eutanasiados aos 15 e 30 dias. Os espécimes foram processados laboratorialmente para análises histométrica do contato osso-implante (BIC) e imuno-histoquímica. Os dados histométricos foram estatisticamente analisados (Teste Kruskal-Wallis e Dunn $p < 0,05$). **Resultado:** Na análise dos tratamentos, os resultados demonstraram que houve maior BIC nos implantes instalados em alvéolos não contaminados tratados com aPDT ($p < 0,05$) e maior imunorreatividade à OPG no tecido ósseo tratado com aPDT. **Conclusão:** A aPDT mostrou-se efetiva no controle da perda óssea em áreas não contaminadas e aumentou a atividade metabólica e a atividade das células ósseas nos alvéolos irradiados previamente à instalação dos implantes.

Descritores: Implante dentário; lasers; periodontite; fotoquimioterapia; ratos.

Abstract

Objective: The aim of this study is to evaluate by histometric and immunohistochemistry analysis the effects of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in alveolar prior to placement of mini-implants in animals with or without induced periodontal disease. **Material and method:** Thirty-two rats were used. Periodontal disease (PD) was induced by ligature in the lower left first molar. After 7 days of PD evolution, it was performed removal of the ligature and extraction of the left lower first molars in all animals. Thus, animals were divided into 2 groups ($n = 16$) according to the treatments in the dental alveolus before immediate implant installation: MD (control) : mechanical debridement (MD), irrigation with 1 mL of saline solution followed by implant installation; aPDT-MD, irrigation with 1 mL of Toluidine Blue-O and low intensity laser (LLLT) and implant installation. Eight animals from each group were euthanized at 15 and 30 days after the installation of mini-implants. Specimens were processed for histologic, immunohistochemical and histometric analysis. The histometric data were processed for statistical analysis (Kruskal-Wallis and Dunn test; $p < 0.05$). **Result:** In treatment analysis, results indicated that

there was a greater BIC in implants installed in uncontaminated alveolus treated with a PDT ($p < 0.05$) and greater imuno-reactivity to OPG in bone issue treated with aPDT. **Conclusion:** The aPDT proved to be effective in bone loss control in no contaminated area and it has increased the bone loss and metabolic activity in alveolus irradiated prior to implant installation.

Descriptors: Dental implantation; lasers; periodontitis; photochemotherapy; rats.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal tem como principal agente etiológico local a placa bacteriana, a qual é constituída por vários microrganismos e tem a capacidade de se aderir a superfícies duras da cavidade bucal¹. Esses microrganismos induzem a destruição dos tecidos de sustentação dos dentes em razão de respostas inflamatórias e imunológicas do próprio hospedeiro. O principal tratamento da doença periodontal é a raspagem e o aplainamento radicular, com os objetivos de eliminar a microbiota subgingival patogênica e controlar o processo de destruição periodontal. Por outro lado, quando a doença periodontal não é bem tratada, há uma destruição das estruturas de sustentação do elemento dentário, comprometendo a sua manutenção. Nessas situações, muitas vezes há necessidade de realização de exodontias, na tentativa de preservar a altura e a largura do rebordo alveolar, o que possibilitará a utilização de técnicas de reabilitação, como o uso de implantes dentais imediatos.

Os implantes dentários podem ser instalados em alvéolo de extração recente² e essa técnica denomina-se implante imediato. O sucesso dos implantes dentários está diretamente relacionado à extensão da área de contato osso-implante (BIC). Essa condição é chamada de “osseointegração”, definida como um direto, estrutural e funcional contato entre a superfície do implante e o tecido ósseo, analisado por meio de microscopia de luz³. Embora vários relatos de casos e estudos retrospectivos confirmem o sucesso de implantes em pacientes tratados por doença periodontal^{4,5}, poucos estudos têm confirmado o sucesso da osseointegração de implantes instalados em áreas contaminadas⁶. No entanto, a instalação de implantes imediatos após a realização da exodontia tem se tornado uma constante na prática clínica por causa das suas inúmeras vantagens: redução no número de intervenções cirúrgicas e no tempo de tratamento, orientação do implante, preservação do osso alveolar e estética ideal do tecido mole⁷.

Mais recentemente, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem despertado o interesse de inúmeras pesquisas⁸⁻¹⁴, as quais evidenciam as vantagens da utilização dessa terapia no controle microbiano. O tratamento consiste na associação de um fotossensibilizador a uma fonte de luz intensa, com o objetivo de provocar morte celular. O mecanismo de ação da aPDT se dá quando o fotossensibilizador absorve energia de uma fonte de luz, ficando elétrons em um estado excitado. Na presença de um substrato, o fotossensibilizador, ao retornar ao seu estado fundamental, transfere a energia ao substrato, formando espécies de vida curta e altamente reativas, como o oxigênio singlete, que pode provocar danos aos microrganismos por oxidação irreversível de componentes celulares¹⁵⁻¹⁹. Em função dos efeitos antibacterianos da aPDT, inclusive contra bactérias orais, esta

passou a ser estudada no tratamento da doença periodontal^{13,20,21} e peri-implantar^{12,18,22,23}.

Frente ao exposto e à escassez de trabalhos na literatura que avaliaram os efeitos da aPDT como método de tratamento prévio à instalação de implantes em áreas portadoras de doença periodontal, o presente estudo tem como objetivo avaliar por meio de análises histométrica e imuno-histoquímica o efeito da aPDT na osseointegração de implantes instalados em alvéolos de extração de dentes com doença periodontal induzida ou não, em ratos.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-Protocolo 2008-005132).

1. Animais

No presente estudo, foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 180 a 220 g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo cinco animais cada uma, separados de acordo com o grupo experimental e alimentados com ração e água ad libitum durante todo o período experimental.

2. Indução da Doença Periodontal Experimental

A doença periodontal foi experimentalmente induzida por ligadura nos primeiros molares do lado esquerdo de todos os animais, enquanto os molares do lado direito não receberam a ligadura. A anestesia geral foi obtida pela associação de 0,4 mL.kg⁻¹ de cloridrato de quetamina (Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA) e 0,02 mL.kg⁻¹ de cloridrato de xilazina (Coopazine, Coopers, São Paulo-SP, Brasil) por injeção via intramuscular. Com o auxílio de uma pinça modificada para essa finalidade, foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão 10, Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais, que foi mantido em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos, para a indução experimental da periodontite²⁰.

3. Tratamentos

Decorridos sete dias de evolução da doença periodontal induzida, foi realizada a remoção da ligadura e a exodontia atraumática dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo,

com auxílio de um periótomo, e a exodontia dos molares do lado direito. A seguir, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com os tratamentos realizados nos alvéolos dentais dos molares do lado esquerdo e do lado direito: DM - debridamento mecânico (DM) seguido de irrigação com 1 mL de soro fisiológico e instalação do implante; aPDT - DM, irrigação com 1 mL de azul de toluidina O (TBO) e, após 1 minuto, irradiação com laser em baixa intensidade (LLLT) - realizando, dessa forma, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e instalação do implante.

O procedimento de DM dos alvéolos dentais foi realizado com curetas de dentina (Hu-Friedy MFG, Corporation. Inc., Chicago, EUA). A solução de soro fisiológico foi depositada no interior do alvéolo dental lentamente, utilizando seringa (1 mL) e agulha para insulina (13 × 0,45 mm - Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba-PR, Brasil) sem bisel.

4. aPDT

Para o tratamento da aPDT, foi realizada irrigação com 1 mL de azul de toluidina O (TBO) na concentração de 100 µg.mL⁻¹, com o auxílio de seringa para insulina, tomando-se o cuidado de dirigir a ponta da agulha para o interior do alvéolo dental. Decorrido 1 minuto após a permanência da droga no interior do alvéolo, foi realizado o tratamento com laser em baixa intensidade (LLLT). Para a realização da aPDT, o equipamento laser utilizado foi o de InGaAlP (Thera lase, DMC, São Carlos-SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm. A irradiação laser foi realizada no modo contínuo, em contato com a área e de forma pontual, com potência de 30 mW. A luz laser foi direcionada perpendicularmente ao interior do alvéolo em um ponto na parede alveolar mesial e um ponto na parede alveolar distal. Cada ponto foi irradiado durante 30 segundos, recebendo uma energia pontual de 0,9 J e energia total de 1,8 J, totalizando uma fluência pontual de 32 J.cm⁻² e irradiância de 1,06 W.cm⁻².

5. Procedimento Cirúrgico para Instalação dos Implantes

Os alvéolos dentais dos molares do lado direito e do lado esquerdo, após os tratamentos propostos, receberam a instalação dos microimplantes de titânio com tratamento ácido de superfície, com diâmetro de 1,4 por 2,7 mm de comprimento (P-I Branemark, Campinas-SP, Brasil). No sítio receptor, foi realizada a osteotomia com brocas twist drill de 1,0 mm de diâmetro por 3,0 mm de comprimento (Conexão Sistemas de Próteses, Barueri-SP, Brasil), montadas em motor elétrico cirúrgico e contra-ângulo redutor de 16:1, com velocidade não superior a 2000 rpm e sob irrigação externa intensa com solução salina estéril. A seguir, foram instalados os microimplantes de forma manual e realizado o fechamento da ferida com suturas interrompidas da mucosa com fio de sutura (Vicryl 6-0, ETHICON, Johnson Prod. Ltda, São José dos Campos-SP, Brasil).

6. Período Experimental e Eutanásia

Os animais, em número de oito para cada grupo, foram sacrificados por meio de superdosagem anestésica (Tiopental 150 mg.kg⁻¹, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos

Ltda, Itapira-SP, Brasil) aos 15 e 30 dias após instalação dos microimplantes. A mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes e fixada em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 24 horas e máximo de 48 horas. Do total de oito espécimes de cada subgrupo, cinco não foram descalcificados (análise histométrica) e três foram descalcificados (análise imuno-histoquímica).

7. Processamento Histológico Não Descalcificado

As mandíbulas com os implantes instalados foram removidas, reduzidas e fixadas em formalina neutra a 10% por 48 horas. A seguir, as peças foram desidratadas usando concentrações crescentes de álcool de 60 a 100%, sendo então embebidas com uma solução de glicometacrilato. As amostras foram polimerizadas e seccionadas até uma espessura de 20 a 30 µm, usando-se um sistema de corte específico (Exakt Technologies, Hamburgo, Alemanha). As lâminas foram coradas com solução de Stevenel's Blue e capturadas usando um microscópio conectado a uma câmera e um computador.

8. Processamento Histológico Descalcificado

As mandíbulas, tanto do lado esquerdo como direito, foram reduzidas e fixadas em formalina neutra a 10% no máximo por 48 horas. A seguir, os implantes foram removidos das peças com auxílio de chave digital e os espécimes foram desmineralizados em partes iguais de uma solução de EDTA a 18% por 30 dias. Concluída a descalcificação, os espécimes foram incluídos em parafina e os cortes semisseriados foram obtidos com 4 µm.

9. Processamento Imuno-Histoquímico

As amostras descalcificadas sofreram as reações imuno-histoquímicas. As lâminas foram submetidas à imunoperoxidase indireta, empregando os anticorpos primários policlonais para OPG (Goat anti-opg-Santa Cruz Biotechnology, EUA) na concentração de 1:100, TRAP (Goat anti-rank-Santa Cruz Biotechnology, EUA) na concentração de 1:100 e RANK-L (Goat anti-rankL - Santa Cruz Biotechnology, EUA) na concentração de 1:200. Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato de sódio, pH 7,4, 0,1 M, acrescido de albumina de soro bovino (3% Sigma, CA, EUA) e soro normal de burro para incubação para OPG (1:50). Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, reidratados em soluções decrescentes de alcoóis e lavados em sucessivos banhos de solução tampão fosfato (PBS). Esses cortes histológicos foram tratados para bloqueio da peroxidases endógena, empregando-se peróxido de hidrogênio a 30% em metanol por 30 minutos e lavados com PBS. Em seguida, foram incubados com um dos anticorpos primários mencionados acima à temperatura ambiente durante 18 a 24 horas e lavados com PBS. Uma segunda incubação foi realizada por meio de anticorpos secundário biotinilado universal (anticamundongo, anticabra e anticoelho) durante uma hora à temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS. Uma terceira incubação foi realizada com uma solução contendo estreptavidina conjugada

com peroxidase à temperatura ambiente, durante uma hora. A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada com tampão de revelação (DAD-substrato, K 3468, Dako Carpinteira, CA, EUA) e diaminobenzidina (DAB-Cromógeno, DAKO, Carpinteira, CA, EUA) entre 10 e 60 segundos, em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes histológicos foram lavados várias vezes em PBS e submetidos à coloração pela hematoxilina. Todas as reações foram acompanhadas por um controle negativo, por meio de omissão de anticorpos primários.

10. Análise Histométrica

A porcentagem de contato ósseo entre a superfície de implante (BIC) medida desde a primeira rosca até a base do implante foi histometricamente determinada em ambos os lados do implante, utilizando um sistema de análise de imagens (Imagelab 200 Software Diracon Bio Informática-Ltda., Vargem Grande do Sul-SP, Brasil). A seleção das secções histométricas foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento realizado. Outro examinador cego ao tratamento e calibrado, realizou a análise histométrica. A análise de cada espécime foi avaliada três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes. As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente, para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa). Os valores médios foram averiguados e comparados estatisticamente.

11. Análise Imuno-Histoquímica

A seleção das secções imuno-histoquímicas foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento realizado. Os cortes histológicos de 4 μm de espessura, selecionados para análise imuno-histoquímica, foram mantidos em uma estufa à temperatura de 60 °C durante uma hora. As análises foram realizadas em microscopia de luz para a observação da citoarquitetura do tecido ao redor do implante nos subgrupos estudados, bem como a expressão das proteínas OPG, RANKL e TRAP. A imunomarcação das proteínas foi quantificada por porcentagem, conforme apresentado abaixo²⁴: Ausência de marcação (0%); Marcação fraca (<25% das células); Marcação moderada (<50% das células); Marcação forte (<75% das células).

12. Análise Estatística

A análise estatística dos dados histométricos foi desenvolvida por meio de um programa específico (BioEstat 3.0, Sociedade Civil Mamirauá-Belém, PA, Brasil), considerando a hipótese nula baseada na ausência de diferença entre as modalidades de tratamento ($\alpha = 5\%$). A unidade de análise foi o animal.

Os dados histométricos foram submetidos ao teste de normalidade (teste Shapiro-Wilk) e os dados foram não paramétricos. Dessa forma, utilizou-se Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn ($p < 0,05$).

RESULTADO

1. Análise Histométrica

Na análise dos resultados entre tratamentos realizados de DM e aPDT nas áreas sem ligadura (lado direito), houve maior contato osso-implantes nos alvéolos tratados com aPDT, quando comparados aos alvéolos com o tratamento DM, aos 30 dias ($p < 0,05$) (Figura 1). Nos alvéolos contaminados, os resultados demonstraram não haver diferenças estatísticas entre os tratamentos DM e aPDT ($p > 0,05$) (Figura 2).

2. Análise Imuno-Histoquímica

As análises imuno-histoquímicas dos padrões de marcações antigênicas da RANK-L, OPG e TRAP nos cortes histológicos revelaram uma nítida especificidade de anticorpos empregados. As estruturas teciduais que revelaram imunorreatividade a RANK-L e a OPG foram similares e restritas ao compartimento citosólico das células semelhantes a osteoblastos, fibroblastos e macrófagos mononucleados. A imunorreatividade a TRAP ficou limitada ao compartimento citosólico de células gigantes multinucleadas

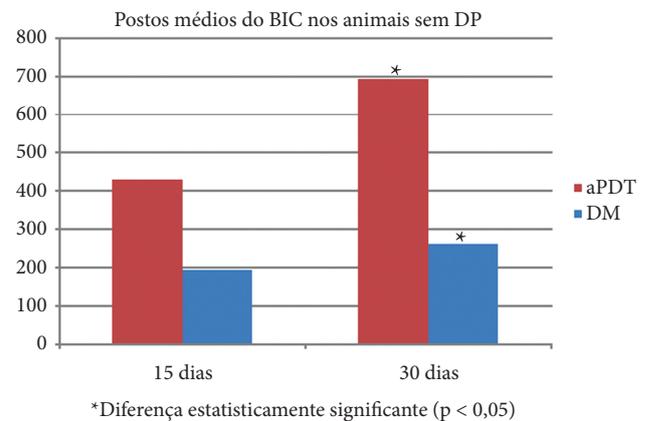


Figura 1. Gráfico representativo dos dados histométricos do BIC (contato osso-implante) dos alvéolos não contaminados de acordo com os tratamentos e períodos. *Diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn; $p < 0,05$).

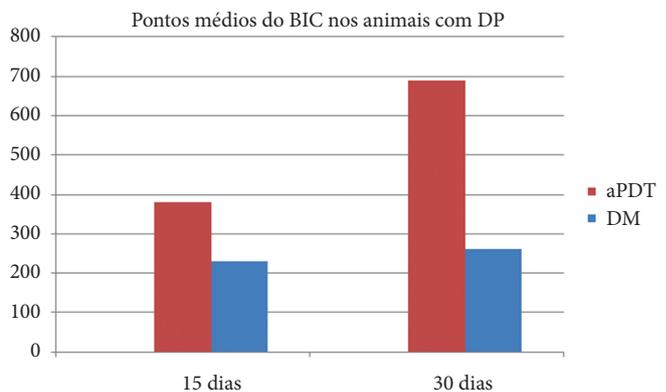


Figura 2. Gráfico representativo dos dados histométricos do BIC (contato osso-implante) dos alvéolos contaminados de acordo com os tratamentos e períodos.

(osteoclastos) ou células mononucleadas (macrófagos clásticos). Esses perfis celulares possivelmente representam os estágios de migração dos macrófagos clásticos dos vasos sanguíneos para o tecido conjuntivo, ou mesmo os estágios de eliminação dos osteoclastos que atuaram na fase ativa da reabsorção óssea.

Aos 15 dias, houve imunorreatividade a RANK-L fraca no tratamento DM e moderada no tratamento aPDT nos alvéolos do lado direito. Nos alvéolos do lado esquerdo, com doença, a imunorreatividade foi considerada forte no tratamento DM e moderada no tratamento aPDT (Figura 3). Já aos 30 dias, tanto no lado direito como no lado esquerdo, a imunorreatividade a RANK-L foi forte no tratamento DM e moderada no tratamento aPDT.

Com relação à imunorreatividade a OPG, aos 15 dias, no lado direito, demonstrou-se grau moderado nos dois tratamentos e, no lado esquerdo, grau leve do DM e moderado na aPDT. Aos 30 dias, no lado direito, a imunorreatividade foi grau leve no DM e forte na aPDT; no lado esquerdo, foi leve no DM e moderada na aPDT (Figura 4).

Com relação à TRAP, a imunorreatividade aos 15 dias foi considerada forte no DM (Figura 5) e leve no tratamento aPDT (Figura 6) no lado direito; diversamente, no lado esquerdo a imunorreatividade foi forte no DM e leve na aPDT. Aos 30 dias, a imunorreatividade foi forte no lado direito nos três tratamentos e, no lado esquerdo, foi forte nos tratamentos DM e moderada na aPDT.

DISCUSSÃO

O modelo experimental que tem sido mais utilizado para avaliar os efeitos da aPDT na doença periodontal é o de ligadura em ratos^{20,21,25-27}. Na medida em que a doença periodontal é multifatorial e polimicrobiana, a ligadura pode ser o método mais representativo de indução da doença quando se deseja avaliar o tratamento periodontal; assim, no presente estudo, optou-se por utilizar esse modelo experimental para induzir a doença periodontal.

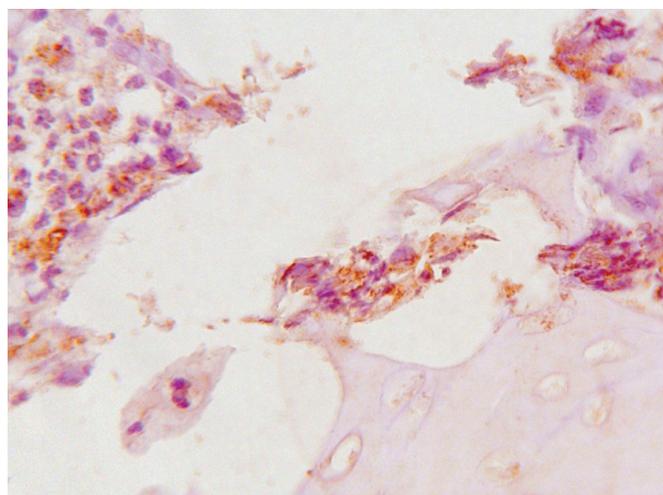


Figura 3. Imunomarcacão à RANK-L no lado esquerdo em área tratada com aPDT aos 15 dias. Aumento original de 100x.

Na análise histométrica dos implantes instalados das áreas não contaminadas (lado direito) após a exodontia, houve maior contato osso-implante nos alvéolos tratados com aPDT quando comparados com os alvéolos do tratamento DM aos 30 dias ($p < 0,05$). Nos alvéolos contaminados, apesar de os resultados

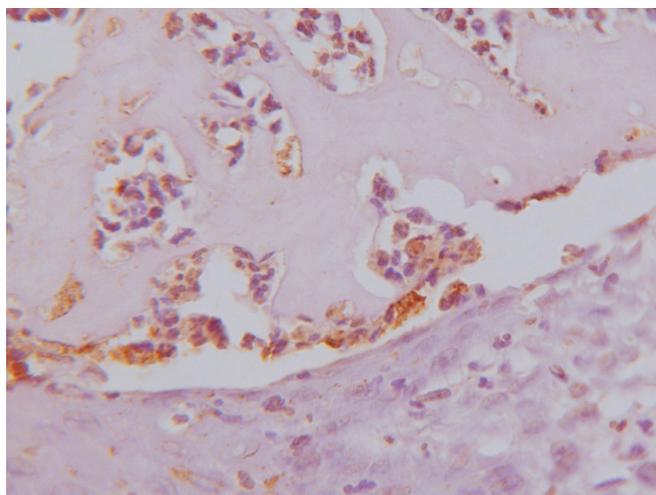


Figura 4. Imunomarcacão à OPG no lado esquerdo em área tratada com aPDT aos 30 dias. Aumento original de 100x.

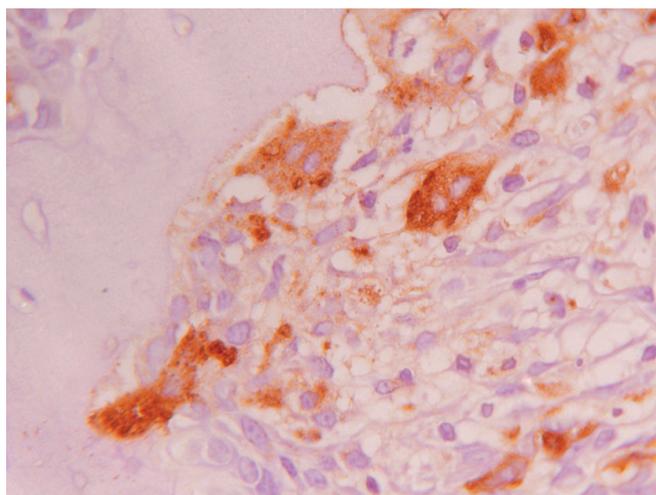


Figura 5. Imunomarcacão à TRAP no lado direito, em área tratada com DM aos 15 dias. Aumento original de 100x.

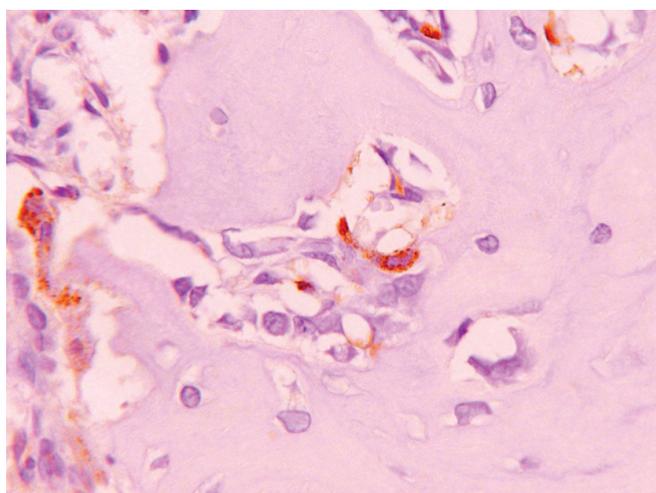


Figura 6. Imunomarcacão à TRAP no lado direito, em área tratada com aPDT aos 15 dias. Aumento original de 100x.

demonstrarem que houve maior BIC nos implantes instalados em alvéolos tratados com aPDT, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos DM e aPDT ($p > 0,05$).

Por outro lado, na análise imuno-histoquímica, houve uma maior imunorreatividade a RANKL e menor a OPG nas superfícies ósseas dos implantes instalados nos alvéolos tratados com DM quando comparado aos tratados com aPDT aos 15 e 30 dias, nas áreas contaminadas e nas não contaminadas. No tecido ósseo ao redor dos implantes instalados após tratamento com aPDT, tanto em alvéolos contaminados como nos não contaminados, houve menor marcação de células TRAP-positivas quando comparados aos tratados com DM.

Diante desses resultados, pode-se observar que a aPDT foi um tratamento prévio efetivo antes da instalação dos implantes, favorecendo a osseointegração e regularizando o metabolismo ósseo celular, principalmente em alvéolos não contaminados; ou seja: com o tratamento aPDT, reduz-se a reabsorção óssea, por reduzir a proporção de RANKL, e aumenta-se a proporção de OPG.

Alguns estudos em animais têm demonstrado que a aPDT é efetiva na redução de microrganismos periodontopatogênicos^{13,25,28}, enquanto outros demonstraram que a aPDT é efetiva no controle da perda óssea alveolar quando associada ao tratamento periodontal convencional^{21,26,27}. No entanto, poucos estudos em animais avaliaram o efeito da aPDT em áreas de implante dentários contaminadas^{22,23}. Além disso, não há relatos da literatura que avaliam o efeito da aPDT como tratamento de alvéolos contaminados previamente à instalação de implantes imediatos. No presente estudo, observou-se que a aPDT pode ser uma tratamento efetivo na osseointegração em áreas de alvéolos não contaminados, o que provavelmente se deva ao efeito bactericida limitado dessa terapia sobre microrganismos periodontopatogênicos; note-se também o efeito bioestimulativo do laser de baixa potência utilizado, que pode acelerar o processo de reparo principalmente nas áreas não contaminadas.

A remodelação óssea via formação e reabsorção óssea ocorre ao longo de toda a nossa vida. Osteoblastos e osteoclastos são as células primárias envolvidas na remodelação óssea²⁴. Osteoblastos podem produzir RANKL (ativador de osteoclastos) e osteoprotegerina (OPG, inibe ativação de osteoclastos), fatores que regularizam a diferenciação e a função dos osteoclastos²⁹. No presente estudo, observou-se na análise imuno-histoquímica que a aPDT foi capaz de reduzir a RANKL e aumentar a proporção de OPG, o que indica uma condição biológica mais favorável para a formação óssea. Tal fato também foi confirmado com a menor porcentagem de células TRAP-positivas nos tecidos tratados com aPDT.

A aPDT é baseada na irradiação de um fotossensibilizador por uma fonte de luz no espectro visível, o qual será excitado para um estado triplô; a energia é transferida para a molécula de oxigênio e o produto formado é um oxigênio muito reativo, que é capaz

de reagir com sistemas biológicos, como dos microrganismos, e destruí-los³⁰.

Além disso, os resultados da presente pesquisa corroboram os achados de outro estudo²⁴, em que se observou aumento da expressão de mediadores do metabolismo ósseo (RANK, RANKL e OPG), após irradiação prévia do sítio cirúrgico à instalação dos implantes em ratos, com o LLLT com comprimento de onda de 808 nm. Tal estudo concluiu que o LLLT promoveu aumento da atividade metabólica e aumento da atividade das células ósseas. Outro estudo demonstrou que o LLLT, além de promover diferenciação e proliferação de osteoblastos, inibe a diferenciação de osteoclastos por regular a expressão de RANKL e OPG²⁹.

Com relação ao protocolo da aPDT, utilizou-se o azul de toluidina, pois é um fotossensibilizador largamente utilizado em outros estudos experimentais^{23,27-29}, inclusive no tratamento da peri-implantite^{12,22,23}. No entanto, o azul de metileno é mais absorvido pelo comprimento de onda utilizado no presente estudo. Tal fato poderia influenciar nos resultados do presente trabalho. Com relação aos parâmetros de irradiação laser, utilizaram-se os parâmetros próximos aos outros estudos em animais^{25,26}. A grande vantagem da utilização da aPDT no tratamento de alvéolos contaminados previamente à instalação de implantes é a ausência de resistência bacteriana, além de se constituir uma técnica de fácil manuseio, baixo custo e de ação local, que não promove efeitos citotóxicos e nem térmicos no tecido ósseo que receberá o implante dentário.

Diante dos resultados do presente estudo e dos achados da literatura, observou-se que há a necessidade de realização de outros estudos, tanto em animais como em humanos, para avaliar o efeito da aPDT com outros protocolos de tratamento, na redução de microrganismos periodontopatogênicos e no tecido ósseo, em alvéolos contaminados que receberão implantes dentários.

CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a aPDT utilizada previamente à instalação dos implantes mostrou-se efetiva na osseointegração de implantes em áreas não contaminadas e aumentou a atividade metabólica de formação óssea dos alvéolos contaminados e não contaminados, reduzindo a expressão de RANKL e TRAP, e aumentando de OPG.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo recebeu auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo: 470664/2008-8). Gostaríamos de agradecer à P-I Branemark (Campinas-SP, Brasil), por disponibilizar os mini-implantes utilizados no estudo.

REFERÊNCIAS

1. Wilson TG, Kornman KS. Fundamentos de periodontia. São Paulo: Quintessence; 2001.
2. Schlulte W, Kleneikenscheidt H, Lindner K, Schareyka R. The Tübingen immediate implant in clinical studies. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1978;33:348-59. PMID:348452.
3. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52:155-70. <http://dx.doi.org/10.3109/17453678108991776>
4. Sbordone L, Barone A, Ciaglia RN, Ramaglia L, Iacono VJ. Longitudinal study of dental implants in a periodontally compromised population. *J Periodontol.* 1999;70:1322-9. PMID:10588495. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1999.70.11.1322>
5. Mengel R, Behle M, Flores-de-Jacoby L. Osseointegrated implants in subjects treated for generalized aggressive periodontitis: 10-year results of a prospective, long-term cohort study. *J Periodontol.* 2007;78:2229-37. PMID:18052693. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2007.070201>
6. Novaes AB Jr, Marcaccini AM, Souza SL, Taba MJr, Grisi MF. Immediate placement of implants into periodontally infected sites in dogs. A histomorphometric study of bone implant contact. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;183:391-8.
7. Chen ST, Wilson Jr TG, Hämmerle CHF. Colocação imediata ou precoce de implantes em alvéolos de extração: revisão da base biológica dos procedimentos clínicos e resultados. In: Manual da terceira conferência da ITI. *Int J Oral Max Implants.* 2004;19 (suplemento):12-25.
8. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of Galium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbial and clinical study. *Lasers Surg Med.* 2002;30:60-6. PMID:11857606. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.10010>
9. Nussbaum EL, Lilje L, Mazzulli T. Effects of 630, 660, 810 and 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20:325-33. <http://dx.doi.org/10.1089/104454702320901116>
10. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003;38:428-35. PMID:12828662. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.00673.x>
11. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003;18:51-5. PMID:12627274. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-002-0243-5>
12. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci.* 2003;45:17-23. PMID:12816360. <http://dx.doi.org/10.2334/josnusd.45.17>
13. Kömerik N. In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:932-40. PMID:12604524. PMID:149320. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.3.932-940.2003>
14. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2173-8. PMID:15155218. PMID:415578. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.6.2173-2178.2004>
15. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photossensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995;78:569-74. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03101.x>
16. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996;18:253-9. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9101\(1996\)18:3<3C253::AID-LSM6%3E3.0.CO;2-R](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9101(1996)18:3<3C253::AID-LSM6%3E3.0.CO;2-R)
17. Bauer TW, Hahn SM, Spitz FR, Kachura A, Glatstein E, Fraker DL. Preliminary report of photodynamic therapy for intraperitoneal sarcomatosis. *Ann Surg Oncol.* 2001;8:254-5. PMID:11314943. <http://dx.doi.org/10.1007/s10434-001-0254-7>
18. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2001;12:104-8. PMID:11251658. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0501.2001.012002104.x>
19. Tomaselli F, Maier A, Sankin O, Anegg U, Stranzl U, Pinter H, et al. Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer – a clinical pilot study. *Lasers Surg Med.* 2001;28:399-403. PMID:11413551. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.1067>
20. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007;78:566-75. PMID:17335382. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2007.060214>
21. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol.* 2008;79:1081-8. PMID:18533787. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2008.070456>
22. Shibli JA, Martins MC, Nociti FH Jr, Garcia VG, Marcantonio E Jr. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol.* 2003;74:338-45. PMID:12710753. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.338>
23. Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Jr, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17:273-81. PMID:16672022. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01167.x>
24. Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, et al. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39:441-50. PMID:17523169. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20508>

25. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontol Res.* 2008;43:162-7. PMID:18302617. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01007.x>
26. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 219-28. PMID:19236534. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01355.x>
27. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:1106-14. PMID:22092666. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01785.x>
28. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol.* 2005;76:1100-5. PMID:16018752. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2005.76.7.1100>
29. Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, et al. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:309-15. PMID:18800943. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2008.2283>
30. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases. State of the art. *J. Photochem Photobiol B.* 2005; 79: 159-70. PMID:15878121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.11.023>

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Letícia Helena Theodoro
Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista,
Rua José Bonifácio, 1193, 16020-050 Araçatuba - SP, Brasil
e-mail: letheodoro@uol.com.br

Recebido: 10/02/2012

Aprovado: 28/02/2012