

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE EFICÁCIA E RESPOSTA
TECIDUAL ENTRE DIFERENTES PRODUTOS COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA UTILIZADOS NA
INTERFACE IMPLANTE E CONECTOR PROTÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

FLAVIO CASTILHO DE BARROS

**SÃO PAULO
2016**

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE EFICÁCIA E RESPOSTA
TECIDUAL ENTRE DIFERENTES PRODUTOS COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA UTILIZADOS NA
INTERFACE IMPLANTE E CONECTOR PROTÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do prof. Dr. Mario Mariano

FLAVIO CASTILHO DE BARROS

**SÃO PAULO
2016**

Barros, Flávio Castilho de.

Avaliação do grau de eficácia e resposta tecidual entre diferentes produtos com ação antimicrobiana utilizados na interface implante e conector protético / Flávio Castilho de Barros. - 2016.

44 f. : il. color.

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Patologia Ambiental e Experimental.
Orientador: Prof. Dr. Mário Mariano.

1. Implantes dentários. 2. Anti-infecciosos. 3. Hidróxido de cálcio.
4. Clorexidina. 5. Iodofórmio. 6. Peri-implantite. I. Mariano, Mário. (orientador). III. Título.

FLAVIO CASTILHO DE BARROS

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE EFICÁCIA E RESPOSTA
TECIDUAL ENTRE DIFERENTES PRODUTOS COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA UTILIZADOS NA
INTERFACE IMPLANTE E CONECTOR PROTÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

/ /

Prof. Dr. Mario Mariano
Universidade Paulista – UNIP

/ /

Prof. Dr. Nilton De Bortoli Jr
Universidade de São Paulo – USP

/ /

Prof. Dr. Carlos Alberto Adde
Universidade de São Paulo – USP

/ /

Prof. Dr. Luiz Felipe Scabar
Universidade Paulista – UNIP

/ /

Prof. Dr. Fabio Strefezza
Universidade Paulista - UNIP

DEDICATÓRIA

A minha esposa Claudia por todo amor, compreensão, amizade, cumplicidade, e sempre me apoiou e incentivou a buscar todos os meus sonhos, compartilhando momentos bons e difíceis nessa jornada, tornando nosso convívio cada dia mais sólido e harmonioso.

Ao meu filho Lucas, meu maior tesouro, razão da minha vida, e o motivo de toda dedicação e esforço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre conduziu meus passos, sem O qual eu nada seria.

A meu orientador, Prof. Dr. Mario Mariano, pelos ensinamentos que muito auxiliaram para construção deste trabalho, e por ter aceitado compartilhar deste projeto comigo.

À minha família, pelo apoio, amor e confiança, sempre acreditando muito em mim.

À minha esposa Claudia e filho Lucas, por terem colaborado, sempre me apoiando e incentivando durante todo período que dediquei ao estudo e planejamento deste trabalho de pesquisa, e em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Carlos (in memoriam) e Laura, pelo amor e por terem sempre me incentivado aos estudos colaborando decisivamente para minha formação.

Ao Prof. Dr. Paschoal Laércio Armonia. Além de colega, sogro e amigo, pela paciência e apoio, utilizando todo o seu conhecimento científico para o aprimoramento do meu trabalho, incentivando-me em todos os momentos.

Ao meu irmão Carlos, professor e doutor do curso de pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas – RS, que contribuiu imensamente para realização deste trabalho, tanto nos estudos realizados *in vitro* como nos aconselhamentos e encaminhamentos na preparação intelectual e aplicada deste estudo, sempre com muita presteza e disponibilidade.

Aos Profs. Drs. Carlos Alberto Adde, Fabio Strefezza e Luiz Felipe Scabar, que me deram a honra de aceitarem participar da banca examinadora, e em especial ao professor Dr. Nilton De Bortoli Jr, que me iniciou nos conhecimentos em implantodontia, em 1994, e que além de participar da banca examinadora, generosamente cedeu os principais materiais para realização deste trabalho, os implantes dentários e os conectores protéticos da empresa Implacil De Bortoli.

Ao professor Alexandre Queiroz por seu companheirismo, dedicação, suporte e contribuição no planejamento e execução dos processos do estudo *in vitro*.

Ao Paulo, Técnico de Laboratório de Patologia da Universidade Paulista – UNIP, Campus Indianópolis – SP, sempre disposto a ajudar e colaborar nos trabalhos realizados nesse laboratório na preparação do material histopatológico.

Aos animais que participaram desta pesquisa, que tornaram possível a realização deste projeto.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que eu pudesse chegar ao fim de uma realização.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de eficácia antibacteriana entre produtos odontológicos na interface entre implante/conector protético (*in vitro*), e respostas teciduais a esses produtos nos tecidos adjacentes (*in vivo*). Foram utilizados os produtos: PROHEAL®, CLOREXOAL®, CALEN® e HYDROPAST+I®. Para análises *in vitro* foram utilizados 96 implantes osseointegráveis com conexão em hexágono interno e 96 conectores protéticos do tipo Munhão Reto, e duas cepas de bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No estudo *in vivo* foram utilizados 15 ratos Wistar com tubos de polietileno contendo os medicamentos testados e glicerina como controle inseridos no subcutâneo. Após 7, 21 e 42 dias os animais foram sacrificados e amostras usadas para análises das respostas teciduais. Todos os medicamentos testados no estudo *in vitro* apresentaram redução da penetração de bactérias na interface implante/conector, sendo a mais eficaz a CLOREXOAL® (Clorexidina 2%) e não houve crescimento bacteriano no período avaliado. Todos os medicamentos testados no estudo *in vivo* apresentaram resposta inflamatória no tecido subcutâneo dos ratos, e os resultados obtidos mostram equivalência entre eles. Houve diferentes respostas à eficácia e resposta tecidual entre os produtos avaliados na interface implante/pilar, sendo clara a maior atividade antimicrobiana da CLOREXOAL® (clorexidina 2%) frente aos outros produtos testados.

Palavras Chave: Implantes Dentários. Agentes Anti-Infecciosos. Hidróxido de Cálcio. Clorexidina. Iodofórmio. Peri-implantite

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the degree of antibacterial efficacy between dental products at the interface between implant / prosthetic connector, and tissue responses to these products in adjacent tissues. PROHEAL®, CLOREXOAL®, CALEN® and HYDROPAST + I® products were used. For in vitro analysis, 96 implants were implanted with an internal hexagon and 96 prosthetic components of the Straight Trunked type, and two strains of bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In the in vivo study 15 Wistar rats were used where polyethylene tubes containing the tested drugs and glycerin as a control were inserted into the subcutaneous tissue. After 7, 21 and 42 days the animals were sacrificed and samples used for analysis of the tissue responses. All the drugs tested in the *in vitro* study, showed reduction of bacterial penetration at the implant / connector interface, and the most effective was CLOREXOAL® (Chlorhexidine 2%) where there was no bacterial growth in the period evaluated. All the drugs tested in the *in vivo* study, showed an inflammatory response in the subcutaneous tissue of the rats, and the results obtained show equivalence among them. It was possible to conclude that there were different responses to the efficacy and tissue response between the products evaluated at the implant / abutment interface, being clear the greater antimicrobial activity of CLOREXOAL® (chlorhexidine 2%) compared to the other products tested.

Key words: Dental Implants. Anti-Infective Agents. Calcium Hydroxide. Chlorhexidine. Iodoformum. Peri-implantitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conjunto implante + conector protético submerso no meio de cultura 19

Figura 2 - Média de contaminação dos controles. Média das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos controles positivos de cada bactéria estudada, após inoculação e incubação por 48hs em meio de cultura sólido. 22

Figura 3 - Quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* (A) e de *Escherichia coli* (B). As UFCs foram determinadas após 48hs em placa de Agar sólido. Dados apresentados como média \pm EPM, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = não significante, n = 10. Nenhum crescimento bacteriano nos implantes tratados com clorexoral.

23
Figura 4 - Nos painéis A, B e C não foram encontradas diferenças significativas de reação tecidual ou inflamação causadas pelos medicamentos testados; O painel D mostra reação teciduais diferentes no decorrer do tempo, sendo menor aos 7 dias, aumentando nas amostras de 21 dias e novamente reduzindo nas amostras de 42 dias ($p = 0,02$).
25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação do efeito dos fármacos e controles 23

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

HI	Plataforma de conexão em Hexágono Interno
Morse	Plataforma de conexão tipo cone morse
CHX	Clorexidina
G+	Gram positivo
G-	Gram negativo
UNIP	Universidade Paulista
BHI	Braian Heart Infusion
N	Newton
cm	Centímetros
h	Hora
mg/kg	miligramas por kilograma
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
EPM	Erro Padrão da Média
CGMI	Célula Gigante Multinucleada Inflamatória

LISTA DE SIMBOLOS

- %** Porcentual
- °C** Grau Celsius
- ®** Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO -----	13
2 MATERIAIS e MÉTODOS -----	18
2.1 Estudo Microbiológico -----	18
2.1.1 Dinâmica Experimental do estudo Microbiológico -----	18
2.2 Estudo Histopatológico -----	19
2.2.1 Implantes subcutâneos -----	20
2.2.2 Coleta de tecidos -----	20
2.2.3 Análise histopatológica -----	21
2.3 Análise estatística -----	21
3. RESULTADOS -----	22
3.1 Análise dos controles positivos e negativos -----	22
3.2 Análise <i>in vitro</i> de contaminação dos implantes -----	22
3.3 Resposta tecidual dos medicamentos testados -----	23
4 DISCUSSÃO -----	26
5 CONCLUSÃO -----	28
6 REFERENCIAS -----	29
7 ANEXO -----	33
8 APÊNDICE -----	34

1 INTRODUÇÃO

O uso de implantes osseointegráveis representa um grande avanço para a Odontologia moderna, proporcionando, de forma previsível, a reposição dos elementos dentários perdidos aos pacientes, permitindo recuperar a função, estética, conforto e fonação, com vantagens sobre as próteses convencionais (FERNANDES, 2012). Vários tipos de implantes estão disponíveis para aplicação em diferentes casos clínicos e um número crescente de Cirurgiões-Dentistas tem adotado essa forma de tratamento (LOPES et al., 2010).

O sucesso primário dos implantes deve-se a uma perfeita osseointegração. Os fatores que mais levam ao insucesso dos implantes e preocupam os profissionais são: trauma cirúrgico no momento do preparo e inserção, sobrecarga oclusal e a infecção bacteriana (LOPES et al., 2010). No entanto, caso não ocorra uma perfeita adaptação entre o implante e seus conectores protéticos, a área torna-se favorável à colonização bacteriana, levando ao desenvolvimento da patologia peri-implantar, com comprometimento na manutenção da osseointegração (JANSEN et al., 1997).

A partir do processo cirúrgico para fixação do implante e em todo o tempo em função na cavidade bucal, podem ser desencadeados processos infecciosos adjacentes à crista óssea alveolar, região em que se localiza a junção entre implante e pilar protético, estimulando e acelerando a instalação de inflamações semelhantes à periodontite, as chamadas peri-implantites. A transmissão e consequente incursão de micro-organismos em sítios ósseos e no interior de implantes, na interface implante/conector, ocorre durante a primeira e segunda fases cirúrgicas da fixação dos implantes (QUIRYNEN et al., 2002) e na própria cavidade bucal durante os movimentos funcionais, subsequentemente à instalação da prótese (RIMONDINI et al., 2001).

Microfissuras e cavidades entre conector protético e implante proporcionam nichos que podem abrigar micro-organismos originadores de infecções e reações inflamatórias nos tecidos moles peri-implantares (GUINDY et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2011).

Novos sistemas de implantes, com variados tipos de conexões e tratamentos de superfícies, são rotineiramente lançados no mercado, oferecendo novas propriedades, características de superfície e adaptação dos conectores protéticos, que tentam restringir ou erradicar as deficiências das conexões tradicionais. A

utilização de agentes antissépticos e/ou antimicrobianos é cada vez mais recomendada e podem ser aplicados para impedir ou diminuir a instalação dos processos infecciosos (BRANEMARK et al., 1977; ADELL et al., 1981; FINGER et al., 2003; LARRUCEA VERDUGO, et al., 2014).

No entanto, todos os pilares protéticos de alguma forma acabam sendo parafusados em implantes que fornecem dois tipos de plataforma, conexão interna e externa. Independentemente do tipo de plataforma, é gerada uma interface entre o implante e o conector protético, que está localizado por baixo da margem gengival e no nível do osso remanescente. Nessa interface ocorre um nível excessivo de microinfiltrações que podem causar danos irreparáveis (COELHO et al., 2008; ALOISE et al., 2010; HARDER et al., 2010; LARRUCEA VERDUGO, et al., 2014).

Os sistemas de conexão externa são os mais comumente utilizados desde o início da implantologia. Esse desenho apresenta algumas desvantagens como o pouco comprimento de contato entre o conector protético e a porção hexagonal da cabeça do implante (0,7 mm), proporciona um grau de liberdade na interface, que permite alguns graus de rotação entre o hexágono externo da plataforma e o hexágono interno do conector protético, e gera um grande esforço no parafuso de fixação, transferindo grande tensão ao parafuso, que tende a afrouxar e / ou a fratura com relativa facilidade (BINON, 1998; HUNT et al., 2005). No sistema de conexão interna, o hexágono e o parafuso passam para dentro do corpo do implante e o comprimento do hexágono aumenta para 1,2 mm. Isso torna mais estável a conexão, reduzindo a probabilidade de afrouxamento do parafuso de fixação. A força gerada por micromovimentação nesse tipo de ligação é dissipada para as paredes adjacentes ao hexágono do implante e num grau inferior ao parafuso (LARRUCEA VERDUGO et al., 2014).

Ao analisar os diferentes tipos de conectores, os sistemas de conexão externa requerem um espaço mínimo entre as paredes (Grau de Tolerância) para o acoplamento de suas partes, ao passo que os sistemas de conexão interna (HI e Morse) proporcionam maior contato entre as paredes internas do implante e o conector protético, gerando atrito nas paredes para a estabilidade. Do ponto de vista biomecânico, essa interface apresentada no sistema de ligação externa gera micromovimentação, e por sua vez faz com que as forças sejam distribuídas em diferentes áreas do implante, resultando em maior mobilidade do conector instalado e até mesmo uma maior interface, o que pode levar à perda do implante (GIL et al.,

2003). De acordo com essa informação, a hipótese é que "os implantes de conexão interna têm um menor grau de microinfiltração do que aqueles com conexão externa", permitindo analisar o fenômeno da microinfiltração através da interface implante-pilar nos implantes de conexão interna (LARRUCEA VERDUGO et al., 2014).

Para impedir que micro-organismos danosos invadam a junção conector/implante, as indústrias fabricantes de implantes e institutos de pesquisa têm objetivado aprimorar desenhos de conectores e implantes, assim como desenvolver produtos e/ou adicionar substâncias com potencialidade de ação química ou física, no controle a esses micro-organismos (FERNANDES, 2012).

Idealmente os agentes químicos devem ter espectro antimicrobiano o mais amplo possível, ação rápida sobre os patógenos, ser atóxico, inodoro, de fácil utilização e não provocar alterações superficiais que causem danos ao objeto desinfetado (COTTONE e MOLINARI, 1987; MOLINARI et al., 1988; MOLINARI e RUNNELLS, 1991; FERNANDES et al., 2013).

Dentro do exposto, a aplicação da pasta a base de iodofórmio, que apresenta propriedades biocompatíveis, induz a formação de tecido de granulação e neoformação óssea, contribuindo para a reparação tecidual. Sua ação baseia-se na capacidade antisséptica e neutralizadora do iodo, que é liberado lentamente e reabsorvido. O iodofórmio inibe a formação de microfístulas no tecido mucoso superficial e tem ação detergente, desinfetante e desodorizante (DA SILVA, et al., 2013).

Recente estudo de Da Silva, et al. (2013) relatou a utilização da pasta de iodofórmio na região peri-implantar, observando que essa pasta não teve influência sobre as características clínico-radiográficas, 15 dias após a cirurgia para exposição dos implantes dentários. Fizeram um estudo para avaliar os níveis de IL-10 e IL-1 β no fluido crevicular peri-implantar após utilização de uma pasta à base de iodofórmio em humanos. No entanto, acreditam que, apesar da ausência de diferenças clínicas, as alterações subclínicas ou moleculares podem ser detectadas nesses pacientes, considerando os níveis de interleucinas pró e anti-inflamatórias no fluido peri-implantar. Até o momento não há dados claros na literatura associando à ação do iodofórmio com a resposta de interleucinas anti e pró-inflamatórias. Esperam que, com esta pesquisa, possam aprofundar o conhecimento sobre a influência da pasta

de iodofórmio no fluido peri-implantar e sua possível aplicabilidade clínica em implantodontia.

Na odontologia, em sua subárea endodontia (assim como na implantodontia), o controle microbiano é essencial, pois, o sucesso do tratamento endodôntico depende da redução da infecção intrarradicular (SIQUEIRA Jr, 2001). A persistência de bactérias intrarradiculares pode ser o principal fator de insucesso do tratamento endodôntico (NAIR et al., 2005; VASCONCELOS, 2015). Diversas substâncias utilizadas como medicação intracanal com ação antibacteriana são descritas na literatura, e a principal é o Hidróxido de Cálcio, pois apresenta ação antibacteriana, mediante a inibição enzimática e alterações na parede celular; ação antiexsudativa e atividade biológica responsável pela ativação da enzima tecidual fosfatase alcalina, indutora da formação de tecido ósseo mineralizado, e contribui para o processo de reparo, características desejáveis em um tratamento endodôntico, em que a grande dificuldade é a presença de contaminação por micro-organismos (ESTRELA et al., 1999; FERREIRA et al., 2007).

Em busca de uma substância química auxiliar mais segura, para controle de micro-organismos em endodontia e periodontia, algumas substâncias vêm sendo estudadas, e a clorexidina (CHX) vem sendo utilizada em diversas concentrações, na apresentação verniz, líquida ou em gel em concentrações de 0,2% a 20%. Apresenta um elemento catiônico que modifica a parede celular da bactéria, tornando o equilíbrio osmótico da célula confuso. A clorexidina é considerada de amplo espectro como agente antimicrobiano, possuindo ação bacteriostática em concentrações baixas e ação bactericida em concentrações elevadas (GATELLI et al., 2014; MANTHENA, et al., 2015).

Ghannad et al. (2015) mostraram que o uso de gel CHX a 1% no momento da colocação pode reduzir a contagem bacteriana no orifício do parafuso do implante, e esse efeito pode ser mantido por 90 dias ou mais (média de 110 dias). Propuseram que a prevenção da contaminação por orifício de parafuso de implante deve ser incluída nos padrões de cuidados em odontologia de implantes.

Ferrariet al. (2008) realizaram estudo observando redução da contaminação por bactérias periodontopatogênicas, nas amostras examinadas após 30 dias, entre conector protético e implante osseointegrado, tratados com solução de clorexidina a 2%, quando comparado às amostras sem medicação.

O presente estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* o grau de eficácia dos agentes antimicrobianos PROHEAL®(Iodofórmio 15,5%), CLOREXORAL® 2% (gel de clorexidina 2%), pasta CALEN® (Hidróxido de cálcio - 49,77%) e pasta HYDROPAST + I® (Hidróxido de Cálcio (38%); Iodofórmio (26%)) no controle da contaminação na interface entre o implante dentário com plataforma de conexão em hexágono interno (HI) e o conector protético (tipo munhão), no período de 48 horas após sua instalação, e também a resposta tecidual próxima a esses compostos farmacológicos, *in vivo*, através de instalação nos tecidos subcutâneos em ratos *Wistar*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estudo Microbiológico

2.1.1 Dinâmica Experimental do estudo Microbiológico

O método utilizado para avaliar grau de eficácia da ação antimicrobiana das substâncias estudadas, foi a simulação de montagem dos conectores protéticos tipo munhão reto de titânio, em implantes com plataformas de conexão de hexágono interno (HI), com aplicação de compostos com ação antimicrobiana na interface entre esses conectores montados, e submetidos à imersão em dois meios de cultura bacteriana.

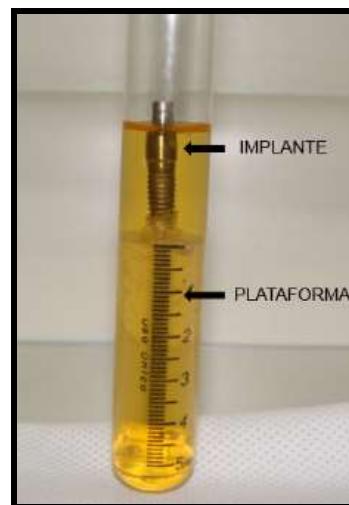
Para o estudo foram utilizados 96 implantes cônicos com plataforma em hexágono interno (HI), estéreis, da marca Implacil De Bortoli®, 96 conectores protéticos do tipo Munhão Reto, e os seguintes medicamentos: pasta PROHEAL® (Iodofórmio 15,5%), CLOREXORAL® 2% (gel de clorexidina 2%), pasta CALEN® (Hidróxido de cálcio - 49,77%) e pasta HYDROPAST + I® (Hidróxido de Cálcio (38%); Iodofórmio (26%).

Foram utilizadas para o experimento cepas bacterianas dos tipos Gram negativo (G-) isoladas de *Escherichia coli* e Gram positivo (G+) *Staphylococcus aureus*. Foram preparadas e mantidas no laboratório de Microbiologia da Universidade Paulista – UNIP. As cepas utilizadas foram crescidas sobre Agar Braian Heart Infusion (BHI), por 48 horas a 37ºC em estufa bacteriológica.

Os medicamentos a serem testados foram colocados no interior dos implantes, por meio de aplicadores com pontas estéreis. A ativação desses conectores foi realizada por chave e aparafusamento e torquímetro nos implantes com hexágono interno, utilizando o torque 30N (Newton), recomendado pelo fabricante. Apenas um conjunto implante+munhão foi colocado em cada tubo ficando submerso no meio de cultura líquido até a porção média do munhão conectado ao implante, para evitar contaminações pelo acesso do parafuso de cobertura (Figura 1). Foram utilizados vinte implantes para cada medicação estudada, dez para cada cepa de micro-organismos, incluindo em cada grupo medicamentoso estudado, mais dois implantes montados nos conectores protéticos, sem medicação na interface,

para avaliação dos controles positivo (em meio de cultura bacteriana) e negativo (em meio estéril).

Figura 1. Conjunto implante + conector protético submerso no meio de cultura



Em seguida, os 96 tubos contendo os implantes foram identificados e levados a estufa bacteriológica a 37°C por 48h. Decorrido o tempo de incubação, a superfície externa dos implantes foi descontaminada com solução de clorexidina a 2%, e realizada a coleta, através de swab estéril, do material para análise de crescimento microbiano de dentro da câmara interna dos 96 implantes (20 com Proheal®, 20 com Clorexoral®, 20 com Calen®, 20 com Hydropast + I®, 8 para o controle positivo e 8 para o controle negativo). Posteriormente, foi realizada a semeadura em placa com meio ágar sólido com a finalidade de observar o grau da eficácia dos medicamentos testados. A placa foi levada à estufa por 48h a 37 °C, para se verificar após esse tempo o crescimento da cultura.

2.2 Estudo Histopatológico

Para realização deste estudo foram utilizados quinze ratos com idade próxima a 75 dias (*Rattus norvegicus*, *Albinus Wistar*), machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 gramas. Todos os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (40,0 x 32,0 x 17,0 cm) e receberam ração padrão (Nuvilab CR-1, Nuvital®, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o período da pesquisa, com temperatura constante de 22°C, umidade entre 35% e 45%, em ambiente com ciclos claro-escuro de 12 horas cada (DAMY et al., 2010), seguindo as normas e os

princípios éticos de acordo com *Guide for the care and use of laboratory animals* (BARTHOLD, 2011) e conforme a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013). O experimento teve a duração de 42 dias para realização do procedimento operatório e eutanásia. Durante o experimento, os animais permaneceram no Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas.

2.2.1 Implantes subcutâneos

Para testar a reação tecidual aos medicamentos, esses foram colocados dentro de tubos de polietileno de 1,2 mm de diâmetro (0,8 mm de diâmetro interno), e 10 mm de comprimento com uma das extremidades fechada à quente. Os tubos foram preenchidos com os seguintes produtos com ação antimicrobiana e as concentrações dos seus princípios ativos: Proheal® (iodofórmio 15,5%), Calen® (pasta de hidróxido de cálcio 49,77% com glicerina), Clorexoral® (clorexicidina 2%), Hydropast+I® (pasta de hidróxido de cálcio 38% com iodofórmio 26%) e Glicerina (controle).

Os tubos contendo os materiais foram implantados no tecido subcutâneo da região dorsal dos ratos, e cada um dos animais recebeu os cinco diferentes implantes inclusive o controle, separados por alguns centímetros. Os animais foram anestesiados Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepan (25 mg/kg) e receberam butorfanol (1,0mg/kg) e pentabiótico veterinário (Laboratório Wyeth®, Itapevi, São Paulo, Brasil) no pós-operatório. Durante todo o período de estudo, os ratos ficaram sob observação diária para verificação de uma possível alteração macroscópica no local dos implantes.

2.2.2 Coleta de tecidos

Após sedação prévia por Tiopental 50 mg/kg e decapitação, o tecido epitelial e subcutâneo em torno dos implantes foi removido, fixado em solução de formol a 10% tamponado até preparação para histopatológica no Laboratório de Patologia da Universidade Paulista – UNIP.

O descarte dos animais foi realizado de acordo com as Normas de Boas Práticas de Produção de Animais de Laboratórios e Biossegurança, por empresa especializada (Ambientus- Coleta de Resíduos Infectantes).

2.2.3 Análise histopatológica

Após fixação, as peças foram lavadas em água corrente e analisadas macroscopicamente, sendo aparadas e seccionadas com lâminas de bisturi número 22. Esse procedimento permitiu a localização dos tubos de polietileno, com manutenção de suficiente tecido ao redor deles para análise. O material foi acondicionado em cassetes unitários para o correto processamento histológico realizado por um processador histológico automático (Modelo 893, Ancap®, São Paulo, Brasil). Em seguida, o material foi embebido em parafina, obtendo blocos para o corte histológico. Os cortes foram feitos em micrótomo com 5 micrômetros de espessura e corados em hematoxilina e eosina.

As amostras foram classificadas de acordo com o tipo do infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e/ou células mononucleares) e vascularização em 4 escores 0, 1, 2 e 3, sendo 0 ausência de resposta tecidual e 3 resposta tecidual máxima. A leitura das lâminas foi realizada com o auxílio de um microscópio (5x e 40x), por dois observadores, que não tiveram conhecimento da ordem dos materiais analisados, em duas ocasiões diferentes. As lâminas representativas de cada grupo experimental foram fotomicrografadas em aparelho Zeiss, utilizando-se filme Elite Gold-Kodak, ASA 100.

2.3. Análise estatística

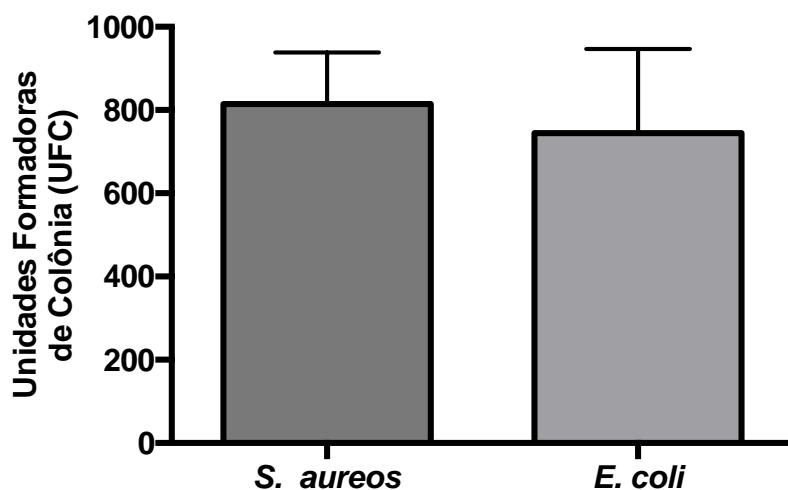
As análises estatísticas e gráficos foram feitos utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0®. Para comparar médias entre os controles foi usado Test T Student. Para comparar as médias de contaminação entre implantes tratados com diferentes drogas foi usado ANOVA de uma via seguida de Tukey. Para comparar a frequência dos scores da reação tecidual aos medicamentos foi usado o teste de Qui quadrado. Os dados são apresentados na forma de média \pm EPM e foram considerados significativos os valores de p menores que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 Análise dos controles positivos e negativos (*in vitro*)

Os resultados dos controles mostraram a média de unidades formadoras de colônias (UFC) nos controles positivos e a não contaminação na interface dos controles negativos (Figura 2).

Figura 2. Média de contaminação dos controles. Média das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos controles positivos de cada bactéria estudada, após inoculação e incubação por 48hs em meio de cultura sólido. Para controles positivos, os implantes sem medicação foram submersos em caldo com bactérias. Nenhuma contaminação foi encontrada nos controles negativos. n = 4.



3.2 Análises *in vitro* de contaminação dos implantes

Tanto os testes feitos com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* mostraram que o produto comercial contendo clorexidina 2% inibiu totalmente o crescimento bacteriano (Figura 3). O resultado obtido para os outros medicamentos foi variável e dependeram do agente bacteriano (Tabela 1). Os valores de UFCs obtidos para *Staphylococcus aureus* foram maiores nos implantes tratados com Calen® ($247,1 \pm 17,0$, $629,5 \pm 9,6$, $167,7 \pm 35,7$; Proheal®, Calen® e Hydropast+I® respectivamente; $p < 0,001$). Nos testes com *Escherichia coli*, o maior número de UFCs foram detectadas nos implantes tratados com Proheal ($247,5 \pm 34,1$, $98,5 \pm 14,4$, $81,2 \pm 17,7$; Proheal®, Calen® e Hydropast+I® respectivamente; $p < 0,001$).

Figura 3. Quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* (A) e de *Escherichia coli* (B). As UFCs foram determinadas após 48hs em placa de Agar sólido. Dados apresentados como média \pm EPM, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = não significante, n = 10. Nenhum crescimento bacteriano nos implantes tratados com clorexoral.

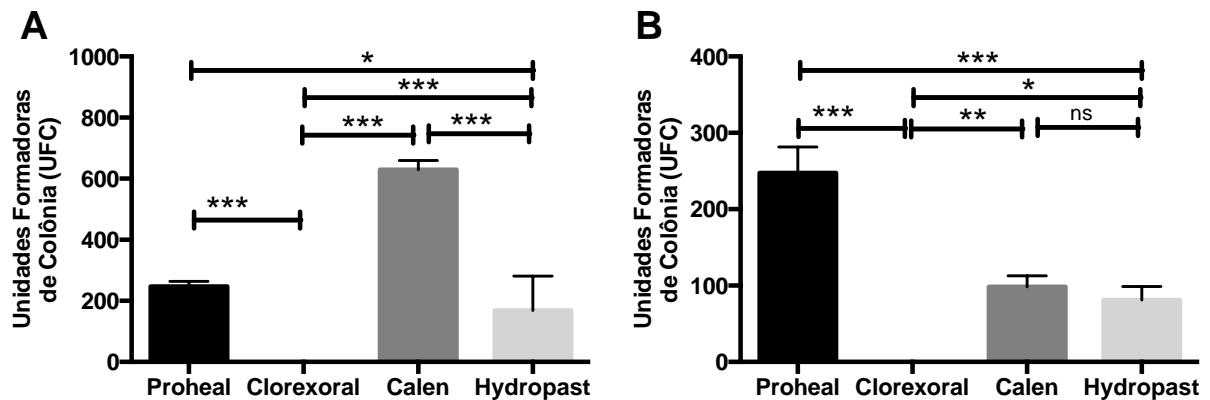


Tabela 1: Comparação do efeito dos fármacos e controles

	Ctr. +	Ctr.-	Proheal	Clorexoral	Calen	Hydropast
<i>S. aureus</i>	814,3±124,8	0	247,1±5,4***	0***	629,5±9,6*	167,7±35,7***
% redução	-	-	69,7	100,0	22,7	79,4
<i>E. coli</i>	744,3±202,8	0	247,5±34,1**	0***	98,5±14,4***	81,2±17,66***
% redução	-	-	66,7	100,0	86,7	89,1

Análises feitas com T test comparando cada grupo (n = 10) com o controle positivo (n = 4); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ctr + = controle positivo; ctr - = controle negativo; dados apresentados como média \pm E.P.M.

3.3 Resposta tecidual aos medicamentos testados

Após análise microscópica das lâminas das diferentes amostras, foram observadas as diferentes respostas teciduais provocadas pelos medicamentos em suas diferentes apresentações, comparando-as entre si e ao controle.

Foram observados a magnitude do infiltrado, tipos celulares presentes, predominantes e sua distribuição em relação aos materiais. Observaram-se,

também, as alterações destrutivas como abscedação e intensidade de alterações vasculares, principalmente o edema e a hiperemia.

Foi realizada uma análise descritiva dos macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMIs), levando-se em consideração os aspectos morfológicos, e utilizando-se os seguintes parâmetros:

- a) distribuição das células em relação ao material;
- b) contorno e uniformidade do citoplasma, se homogêneo, vacuolado ou carregado de partículas;
- c) aspectos dos núcleos celulares. Números e distribuição dos núcleos da CGMIs.

Os dados foram registrados em fichas e mensurados subjetivamente quanto à sua magnitude utilizando os seguintes escores:

0 - Ausência de resposta tecidual

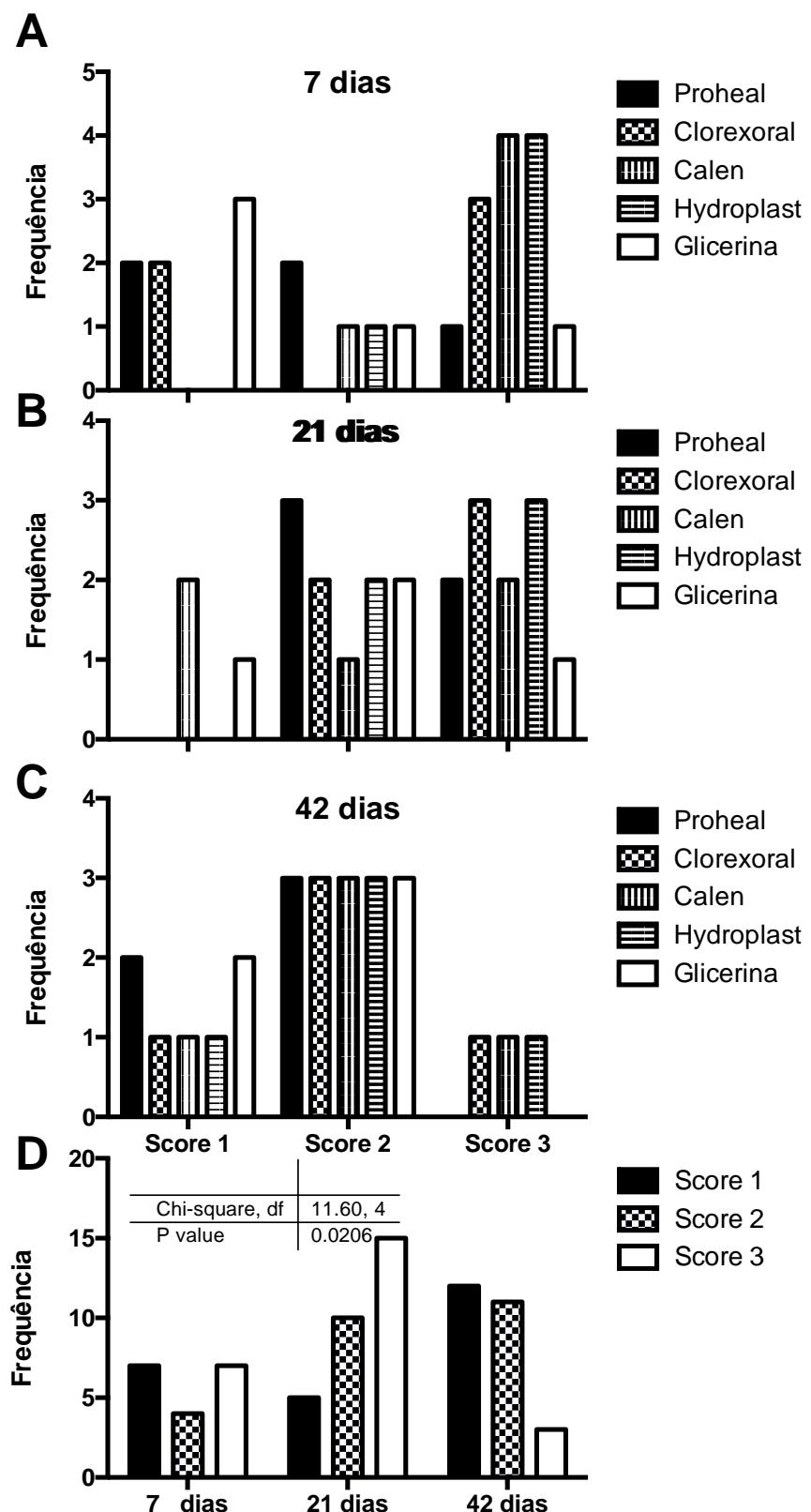
1 - Resposta tecidual LEVE

2 - Resposta tecidual MODERADA

3 - Resposta tecidual INTENSA

Não foram encontradas diferenças significativas de reação tecidual ou inflamação causadas pelos medicamentos nos testes em ratos Wistar. As análises histopatológicas indicaram que as respostas teciduais são semelhantes para as drogas estudadas, que foram toleradas apesar de todas provocarem reações, como mostrado na Figura 4 painéis A, B e C. No entanto, essa reação tecidual foi diferente no decorrer do tempo, sendo menor aos 7 dias, aumentando nas amostras de 21 dias e novamente reduzindo nas amostras de 42 dias (Figura 4, $p = 0,02$).

Figura 4. Análises histológicas. Nos painéis A, B e C não foram encontradas diferenças significativas de reação tecidual ou inflamação causadas pelos medicamentos testados; O painel D mostra reação tecidual diferente no decorrer do tempo, sendo menor aos 7 dias, aumentando nas amostras de 21 dias e novamente reduzindo nas amostras de 42 dias ($p = 0,02$).



4 DISCUSSÃO

A contaminação na interface entre o implante dentário e o conector protético tem sido estudada devido sua influência na inflamação dos tecidos adjacentes, que pode se manifestar por mucosite e/ou peri-implantite, tendo como consequência mais grave a perda do implante dentário (KADKHODA, 2016; LARRUCEA VERDUGO, 2014; ZWIAD, 2014; DA SILVA, 2013). No presente trabalho foi avaliada a eficácia de 4 produtos como medicações preventivas para controle dessa contaminação e verificada que a clorexidina 2% (CLOREXORAL®) se mostrou muito eficaz para esse fim (Figura 3). Dos 4 produtos estudados, todos apresentaram algum efeito tecidual sem diferenças significativas entre esses efeitos quando testados pelo implante no subcutâneo de ratos Wistar (Figura 4 painéis A, B e C).

A eficácia da clorexidina para controle de contaminação de interface de implantes dentários já foi descrita por outros autores que mostraram haver redução da contagem bacteriana quando utilizado diretamente na interface implante/conector ou através de irrigação local. A clorexidina é largamente utilizada como antisséptico de aplicação tópica na odontologia por possuir largo espectro bacteriano, alta substantividade, ser segura e efetiva (TORRES et al., 2010), nas apresentações líquida ou gel, e em concentrações de 0,12% a 2%. Ferrari et al. (2008) mostraram que o uso de solução de clorexidina a 2%, no controle bacteriano da interface implante osseointegrado e pilar protético, levou a uma redução de micro-organismos periodontopatogênicos precursores da peri-implantite. Já Ghannad et al. (2015) fizeram um estudo avaliando o uso de gel CHX a 1% no momento da cirurgia, no orifício de implante, de dois sistemas de implantes ósseos com pilares de cicatrização transmucosa, e puderam observar a redução da contagem bacteriana o orifício do parafuso do implante, e esse efeito pode ser mantido por 90 dias ou mais (média de 110 dias). Propuseram que a prevenção da contaminação por orifício de parafuso de implante deve ser incluída nos padrões de cuidados em odontologia de implantes. A clorexidina a 0,2% na segunda fase cirúrgica da instalação dos implantes osseointegráveis, é recomendada por Zwiad et al., (2014), em seus estudos, como material profilático eficaz para prevenir e tratar patógenos orais em associação com a prótese sobre implante. Os resultados nos testes *in vitro* com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Figura 2), mostraram que, na interface dos implantes com clorexidina 2% (CLOREXORAL®), houve inibição total do

crescimento bacteriano, apontando esse produto como o mais efetivo dos quatro testados. Devido seu baixo custo comercial, a clorexidina poderia ser utilizada através de novo protocolo como agente antimicrobiano na interface estudada (da SILVA et al., 2015).

O desempenho dos outros medicamentos testados foi diferente em relação aos agentes microbianos usados para os testes *in vitro*. De uma forma geral, todos reduziram o número de UFCs nos testes em comparação aos controles positivos, com exceção do Calen em relação ao *Staphylococcus aureus*, que mostrou valores próximos em relação aos controles. Já com relação aos testes usando *Escherichia coli*, o Proheal teve o pior desempenho em relação aos outros medicamentos. Esses dados divergem dos estudos anteriormente publicados apontando que o hidróxido de cálcio e o iodoformio possuem efetiva ação antimicrobiana, quando aplicados em tratamentos odontológicos, que incluem endodontia (CALEN®) e vedação da interface implante/conectores (PROHEAL®) (SILVA Jr, 2006; MAINARDI, 2015).

Uma das preocupações da contaminação bacteriana da interface entre o implante/conector protético tem sido a reação tecidual dos tecidos adjacentes ao implante (DUGGAL, 2015; ROMANOS et al., 2014; PIRIH et al., 2015). Após a análise dos testes de resposta tecidual, todos esses produtos estudados provocam alguma reação no tecido peri-implantar, e não ocorreram diferenças significativas estatisticamente entre eles (Figura 3 – painéis A, B e C).

O método utilizado serviu para apontar que novos produtos podem produzir uma ação antimicrobiana na prevenção da microinfiltração da interface implante/conector, prevenindo a ocorrência de processos inflamatórios podendo levar à perda dos implantes. Dentre esses produtos estudados, o único com indicação específica para esse fim é o PROHEAL®. Os produtos CALEN® e HYDROPAST+I® são de uso recomendado no tratamento endodôntico (DOTTO, 2006), mas foram utilizados no atual estudo por apresentarem ação antimicrobiana e reparadora tecidual periapical.

5 CONCLUSÃO

Após a realização deste trabalho, pode-se concluir que:

- Todos os produtos testados no tecido subcutâneo de ratos Wistar apresentaram resposta tecidual, sem diferença significativa entre eles.
- Houve diferentes respostas ao grau de eficácia entre os produtos avaliados na interface implante/conector, sendo mais eficaz a ação antimicrobiana da clorexidina 2% (CLOREXOAL®) frente aos outros produtos testados.
- Os resultados apontam a clorexidina 2% como a melhor opção para o controle da contaminação dessa interface.
- Sugerimos novos testes laboratoriais e clínicos para poder recomendar a clorexidina a 2% como medicamento de escolha para esse procedimento e avaliar os possíveis efeitos adversos aos pacientes.

6 REFERÊNCIAS

- ADELL, Ragnar et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **International journal of oral surgery**, v. 10, n. 6, p. 387-416, 1981.
- ALOISE, João Pedro et al. Microbial leakage through the implant–abutment interface of Morse taper implants in vitro. **Clinical oral implants research**, v. 21, n. 3, p. 328-335, 2010.
- BARTHOLD, Stephen W.; BAYNE, K. A.; DAVIS, M. A. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 2011.
- BINON, Paul P. Evaluation of the effectiveness of a technique to prevent screw loosening. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 79, n. 4, p. 430-432, 1998.
- BRANEMARK, P. I. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw, Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 1, p. 1-132, 1977.
- COELHO, P. G. et al. In vitro evaluation of the implant abutment connection sealing capability of different implant systems. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 35, n. 12, p. 917-924, 2008.
- CONCEA, **Diretrizes da Prática de Eutanásia. do Concea**. Brasília/DF, 2013.
- COTTONE, James A.; MOLINARI, John A. Selection for dental practice of chemical disinfectants and sterilants for hepatitis and AIDS. **Australian dental journal**, v. 32, n. 5, p. 368-374, 1987.
- DAMY, Sueli Blanes et al. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.
- DOTTO, Sidney Ricardo, et al. "AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES MEDICAÇÕES USADAS EM ENDODONTIA." **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, n. 53, jul./set. 2006.
- DUGGAL, N et al. Peri-Implantitis In Dental Implants: An Updated Review. **J Oral Health Comm Dent** 2015; 9(2) 81-8.
- ESTRELA, Carlos et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J**, v. 10, n. 2, p. 63-72, 1999.
- FERNANDES, Flávio HCN; ORSI, Iara A.; VILLABONA, Camilo A. **Effects of the peracetic acid and sodium hypochlorite on the colour stability and surface roughness of the denture base acrylic resins polymerised by microwave and water bath methods**. **Gerodontology**, v. 30, n. 1, p. 18-25, 2013.

FERNANDES, Flavio Henrique Carriço Nogueira. **Avaliação in vitro pelo método DNA-Checkerboard da eficácia de uma pasta antimicrobiana e da adição de sais de prata em pilares protéticos, no controle da contaminação bacteriana através da interface implante-conector** (Doctoraldissertation, Universidade de São Paulo), Ribeirão Preto - 2012.

FERRARI, Roberto B et al. Avaliação da clorexidina a 2% no controle bacteriano na região interna de implantes de hexágono externo. **ImplantNews** 5(4):409-414, jul/ago.2008.

FERREIRA, F.B.A et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 104, n. 5, p. 709-716, 2007.

FINGER, Israel M. et al. **The evolution of external and internal implant/abutment connections**. Practical Procedures and Aesthetic Dentistry, v. 15, n. 8, p. 626-632, 2003.

GATELLI, GECYCA; BORTOLINI, TEZELLI; CECÍLIA, MARIA. **O USO DA CLOREXIDINA COMO SOLUÇÃO IRRIGADORA EM ENDODONTIA**. UNINGÁ Review, v. 20, n. 1, 2014.

GHANNAD, Farzan et al. Intra-operative application of chlorhexidine gel reduces bacterial counts in internal implant cavity. **European journal of oral sciences**, v. 123, n. 6, p. 425-431, 2015.

GIL, F. J. et al. **Aflojamiento de tornillos de conexión implante dental-protesis mediante simulacion de cargas ciclicas masticatorias**. An. Mecánica la Fract, v. 20, n. 1, p. 491-494, 2003.

GUINDY, J. S. et al. Bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained implant-borne crowns in vitro. **Journal of oral rehabilitation**, v. 25, n. 6, p. 403-408, 1998.

HUNT, P. R.; GARTNER, J. L.; NORKIN, F. J. **Choice of a dental implant system**. Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995), v. 26, n. 4, p. 239-40, 242, 245-8 passim; quiz 251, 271, 2005.

JANSEN, Volker K.; CONRADS, Georg; RICHTER, Ernst-Jürgen. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 12, n. 4, 1997.

KADKHODA, Zeinab et al. Antimicrobial effect of chlorhexidine on Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilms associated with peri-implantitis. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 10, n. 3, p. 176, 2016.

LARRUCEA VERDUGO, Carlos et al. Micoleakage of the prosthetic abutment/implant interface with internal and external connection: In vitro study. **Clinical oral implants research**, v. 25, n. 9, p. 1078-1083, 2014.

LOPES, R., FEITOSA, S. E. H., LEHMAN, L. F. C., & GIRUNDI, F. M. (2010). Análise das desadaptações entre implantes e intermediários e suas consequências clínicas. **Fulldent. sci**, 1(3), 235-239.

MAINARDI, T.C. "Hidróxido de cálcio como medicação intracanal na endodontia: revisão da literatura." (Trabalho de conclusão de curso graduação) UNISC – Santa Cruz do Sul – RS (2015).

MANTHENA, Sathish et al. Comparative evaluation of subgingivally delivered chlorhexidine varnish and chlorhexidine gel in reducing microbial count after mechanical periodontal therapy. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 6, n. 1, p. 24, 2015.

MOLINARI, J. A.; RUNNELLS, R. R. Role of disinfectants in infection control. **Dental Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 323-337, 1991.

MOLINARI, John A. et al. Cleaning and disinfectant properties of dental surface disinfectants. **The Journal of the American Dental Association**, v. 117, n. 1, p. 179-182, 1988.

NAIR, P. N. R. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 99, n. 2, p. 231-252, 2005.

PIRIH, F. Q., et al. "Ligature-induced peri-implantitis in mice." **Journal of periodontal research** 50.4 (2015): 519-524.

QUIRYNEN, Marc; DE SOETE, Marc; VAN STEENBERGHE, Daniel. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. **Clinical oral implants research**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2002.

RIMONDINI, Lia et al. Internal contamination of a 2-component implant system after occlusal loading and provisionally luted reconstruction with or without a washer device. **Journal of periodontology**, v. 72, n. 12, p. 1652-1657, 2001.

ROMANOS, Georgios E., et al. "Bacterial Composition at the Implant-Abutment Connection under Loading in vivo." **Clinical implant dentistry and related research** (2014).

SILVA Jr, J.A., et al. "Aplicação da pasta de iodoformio em implantes: avaliação da resposta tecidual na câmara interna de fixações osséointegráveis (in vivo)." **RGO** (Porto Alegre) 54.1 (2006): 21-26.

da SILVA, Luana Cristine Leão et al. Análise dos níveis das interleucinas tipo 10 e 1β após aplicação da pasta de iodoformio na região peri-implantar: estudo piloto. **Braz J Periodontol-March**, v. 23, n. 01, 2013.

da SILVA, L.C.A., et al. "Avaliação in vitro da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus spp.* isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais." Arquivos do Instituto Biológico 82 (2015): 01-04.

SIQUEIRA JÚNIOR, José Freitas et al. Efeitos de hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos sobre dentina contaminada. **Rev. bras. odontol.**, v. 58, n. 1, p. 44-7, 2001.

TEIXEIRA, Wendel et al. Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 26, n. 1, 2011.

TORRES, C.R.G., et al. "Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia." **Brazilian Dental Science** 3.2 (2010).

VASCONCELOS, Layla Reginna Silva Munhoz de. **Tempo de ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio associadas a agitação ultrassônica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015.

ZWIAD, Abdulsalam Ali et al. The influence of chlorhexidine mouth wash on oral micro-organisms in existence of implant prosthesis. **Journal of Dental Implants**, v. 4, n. 2, p. 149, 2014.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas - RS



Pelotas, 14 de setembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Dr. Carlos Castilhos de Barros

Departamento de Nutrição - Faculdade de Nutrição

Senior Professor:

A CEEA analisou a solicitação o projeto intitulado: "Avaliação da eficácia e resposta tecidual de antimicrobianos utilizados em implantes dentários para a prevenção da peri-implantite", processo nº23110.004847/2015-14, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer FAVORÁVEL a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4847-2015).

Vigência do Projeto: 15/09/2015 a 01/07/2016

Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/Wistar

Nº de animais: 15

Idade: 75 dias

Sexo: Machos

Origem: Biotério Central/UFPel

M.V. Dra. Anaísa de Oliveira Camargo Felix

Presidente da CEEA

Criado em: 10/01/2015

APÊNDICE

MATERIAIS E MÉTODOS

ESTUDO MICROBIOLÓGICO

Dinâmica Experimental do estudo Microbiológico

a. MATERIAIS

O método de utilizado para avaliar a eficácia da ação antimicrobiana das substâncias em estudadas, foi a simulação de montagem dos componentes protéticos tipo munhão reto de titânio, em implantes com plataformas de conexão de Hexágono Interno (HI), com aplicação de compostos com ação antimicrobiana na interface entre esses componentes montados, e submetidos a imersão em dois meios de cultura bacteriana.

Para o estudo foram utilizados 96 implantes cônicos com plataforma em hexágono interno (HI) da marca Implacil De Bortoli® (Figura 1-A), 96 componentes protéticos do tipo Munhão Reto (Figura 1-B), e os seguintes medicamentos: pasta PROHEAL®(Iodofórmio 15,5%), CLOREXORAL® 2% (gel de clorexidina 2%), pasta CALEN® (Hidróxido de cálcio - 49,77%) e pasta HYDROPAST + I® (Hidróxido de Cálcio (38%); Iodofórmio (26%) (Figura 1-C).

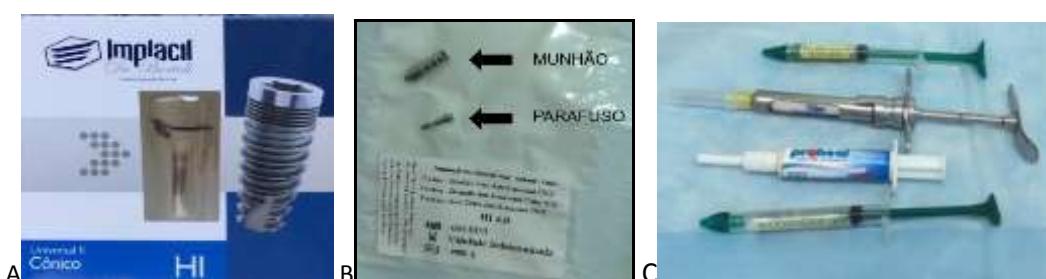


Figura 1. A- Implante cônicocom plataforma hexágono interno (HI) Implacil De Bortoli®; B- Componente protético Munhão reto modelo HI 4.0 e parafuso de fixação; C- Substâncias vedadoras com ação antimicrobiana utilizadas no experimento.

Utilizamos para o experimento cepas isoladas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, por serem bactérias dos tipos Gram Positivo e negativo, refletindo a composição da microbiota da cavidade oral humana,. Foram preparadas e mantidas no laboratório de Microbiologia da Universidade Paulista – UNIP. As cepas utilizadas, foram crescidas sobre Agar *Braian Heart Infusion* (BHI), por 48 horas a 37ºC em estufa bacteriológica (Figura 2).

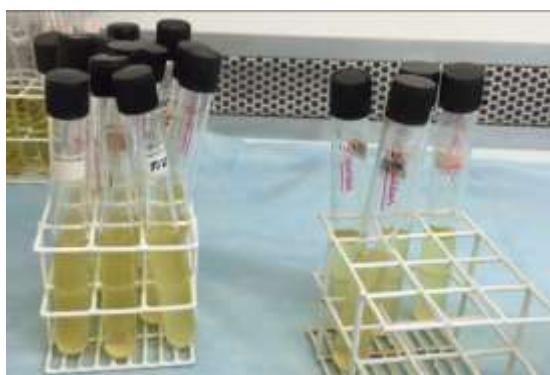


Figura 2. Cepas bacterianas utilizadas no experimento.

Outros materiais utilizados: 10 pinças clínica nº 5, 2 pinças hemostáticas, 192 swabs, chaves para instalação dos componentes protéticos e torquímetro (Implacil De Bortoli®), 100 pipetas e 100 tubos de ensaio e outros recipientes para utilização dos meios de cultura e medicamentos, 96 plataformas (seringas) cortadas e preparadas uniformemente, 96 varetas de madeira preparadas para remoção dos conjuntos do meio de cultura para coleta do conteúdo interno para análise.

b. MÉTODOS

Para obter o caldo contendo Brain heart Infusion (BHI) estéril, foi preparado 3,7g de BHI (pesados em uma balança de precisão) para 100mL de água destilada, quantidade suficiente para 96 tubos de ensaio, já que em cada tubo foi utilizada a quantia de 7mL do meio de cultura. O frasco utilizado foi o Tubo de Ensaio Pyrex sem Tampa, na medida de 13 x 100mm.

A distribuição dos 7mL de caldo estéril BHI nos tubos de ensaio foi realizada dentro do fluxo laminar, com o auxílio de uma micropipeta digital (NICHIPET EX II)

com volume ajustável de 100mL a 1000mL, com as ponteiras descartáveis estéreis em tubos de ensaio com tampa rosca, Pyrex e Falcon.

Posteriormente, os tubos foram vedados com algodão e autoclavados por 15 minutos a uma temperatura de 121°C; a seguir foi realizado o teste de esterilidade, onde os mesmos permaneceram por 24h em uma estufa de cultura a 37°C.

As amostras bacterianas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foram removidas do freezer e descongeladas a temperatura ambiente, tendo sido, revertida em um dos tubos de ensaio contendo BHI estéril, este procedimento foi realizado em Câmara de Fluxo Laminar. A seguir foi levada à estufa a uma temperatura de 37°C por um período de 48h. Após, os tubos foram retirados da estufa e observado se houve crescimento bacteriano. O indicativo do crescimento bacteriano se deu através da turvação do meio de cultura.

Foi realizado um esfregaço com a finalidade de observar se a cultura utilizada era pura ou não. Este esfregaço foi realizado com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada na chama do bico de Busen e uma lâmina de vidro, na Câmara de Fluxo Laminar. Com a alça de platina após ser flambada até ficar rubra removeu-se uma pequena quantia do caldo turvo (BHI + amostra bacteriana) e feito o esfregaço na lâmina, do centro para as bordas que foram fixadas na chama por 3 vezes, com o cuidado de deixar o esfregaço para cima. Com isso há uma desnaturação das proteínas que se aderem à lâmina de vidro. Após a utilização do meio de cultura, o mesmo foi levado para a geladeira a uma temperatura de 7°C a 8°C por 24h.

O segundo passo foi a realização da tipagem de coloração Gram dos meios de cultura em que houve turbidez: uma gota de meio de cultura e uma gota de Cristal de Violeta foram adicionados em lâmina histológica e aguardado o tempo de 1min de reação; o excesso de material foi escorrido e uma gota de Lugol (Mordente que intensifica o Cristal Violeta) adicionada e aguardado o tempo de 1 minuto e novamente escorrido o material em excesso; logo após foi feita a fixação com solução Álcool/Cetona mergulhando a lâmina por 8 vezes na solução. O excesso de material foi escorrido e lavado em água corrente. Em seguida, uma gota de fucsina foi adicionada e aguardado 1minuto. A lâmina foi lavada em água corrente e seca cuidadosamente em papel absorvente (Figura 3).



Figura 3. Lâmina de *Escherichia coli* de coloração de Gram.

Durante a execução das etapas experimentais, todos os cuidados foram tomados para evitar a contaminação do campo de trabalho. Todo o instrumental neste experimento foi previamente autoclavado em autoclave a vapor (121°C por 15 minutos) e todas as etapas foram realizadas com a utilização de luvas estéreis. Antes de iniciar o procedimento, o instrumental foi colocado dentro do fluxo laminar onde foi possível manter a esterilidade da superfície através da luz ultravioleta (UV) que permaneceu ligada por 20 minutos. Antes de entrar na câmara o operador fez a assepsia tripla das mãos com álcool 70°C , após o operador do experimento calçou luvas estéreis.

Para suportar os implantes dentro do caldo com cultura bacteriana, foram preparadas 48 plataformas de sustentação feitas de seringas plásticas descartáveis, uniformemente cortadas e ajustadas para receberem os implantes, por meio de rosquamento com o auxílio de chave de instalação cirúrgica dos implantes (Figura 4).



Figura 4. Montagem do implante na plataforma de sustentação.

Os medicamentos a serem testados foram colocados no interior dos implantes e na rosca dos parafusos dos componentes protéticos, por meio de aplicadores com pontas estéreis (Figura 5-A). A ativação destes componentes foi realizada por chave e aparafulamento (Figura 5-B1) e torquímetro nos implantes com hexágono interno, utilizando o torque 30N (Newton), recomendado pelo fabricante (Figura 5-B2). Apenas um conjunto implante+munhão foi colocado em cada tubo ficando submerso no meio de cultura líquido até a porção média do munhão conectado ao implante, para evitar contaminações pelo acesso do parafuso de cobertura (Figura 5-C). Foram utilizados vinte implantes para cada medicação estudada, sendo dez submersos em meio contendo *Staphylococcus aureus* e dez imersos em meio contendo *Escherichia coli*, incluindo em cada experimento, mais dois implantes conectados aos componentes protéticos para avaliação dos controles Positivo e Negativo.

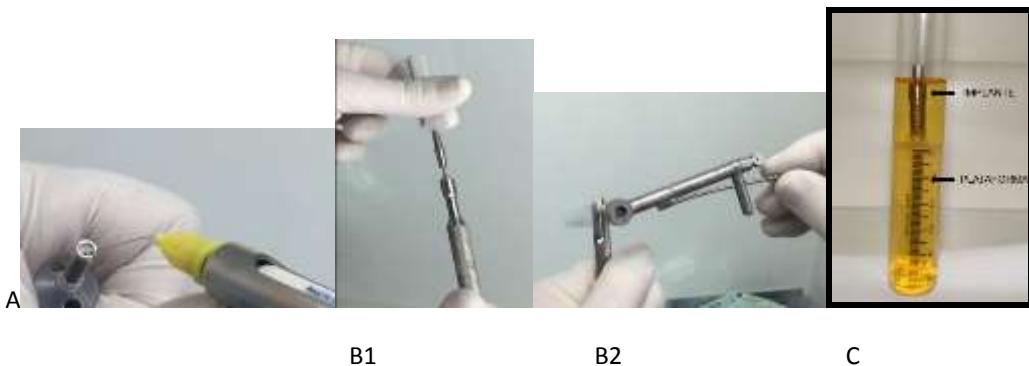


Figura 5. **A-** Aplicação do medicamento antimicrobiano e vedador no interior do Implante cônico Implacil De Bortoli modelo HI 4.0; **B1-** instalação do componente protético; **B2-aplicação** do torque 30N; **C- .Conjunto Implante+conexão protética submersos no meio de cultura.**

Após isso, os 96 tubos contendo os implantes foram identificados e levados a estufa bacteriológica a 37°C por 48h. Decorrido o tempo de incubação, a superfície externa dos implantes foram descontaminadas (Figura 6A) mediante a aplicação de agente antisséptico (Solução de clorexidina 2%) e para constatar se esta assepsia externa foi eficiente, com um swab estéril na superfície externa, foi colhido amostra dos implantes para teste de verificação de possível contaminação externa pós-assepsia (Figura 6B).

Posteriormente foi coletado de dentro da câmara interna dos 96 implantes (20 com Proheal®, 20 com Clorexoral®, 20 com Calen®, 20 com Hydropast + I®, 8 para o

controle positivo e 8 para o controle negativo), através de swab estéril (Figura 6C), o material para análise de crescimento microbiano, onde foi realizada a semeadura em placa com meio ágar sólido com a finalidade de observar a eficácia do medicamento (Figura 6D). A placa foi então levada a estufa por 48h a 37 °C, para se verificar após este tempo o crescimento da cultura.

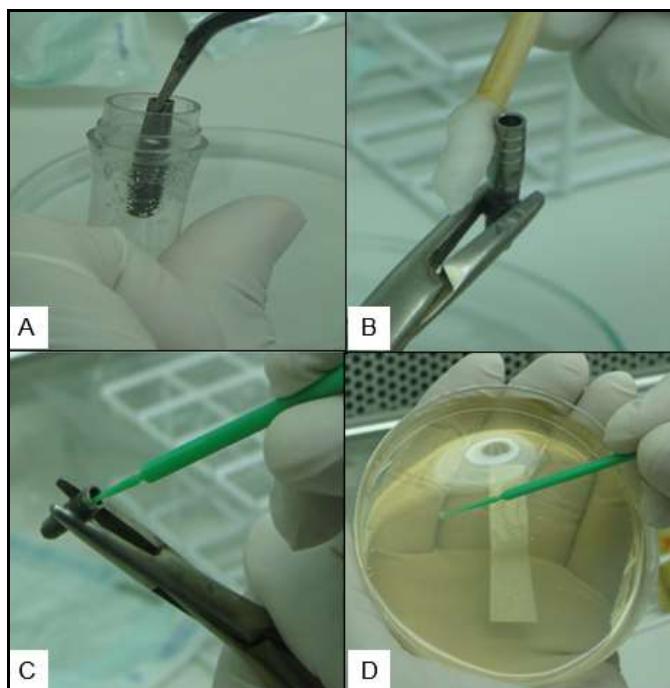


Figura 1. Assepsia do implante em clorexidina 2% após incubação em meio de cultura contendo bactérias e coleta de material do interior do implante (A e B); semeadura (C); placa de ágar (D).

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Material e Metodologia para o estudo Histopatológico

Animais:

Para realização deste estudo foram utilizados quinze ratos com idade próxima a 75 dias (*Rattusnorvegicus*, *AlbinusWistar*), machos, adultos, com peso corporal variando entre 200 e 250 gramas. Todos os animais serão acondicionados em caixas de polipropileno (40,0 x 32,0 x 17,0 cm) e receberão ração padrão (Nuvilab CR-1, Nuvital®, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o período da

pesquisa, com temperatura constante de 22°C, umidade entre 35% e 45%, em ambiente com ciclos claro-escuro de 12 horas cada (Damy et al., 2010), seguindo as normas e os princípios éticos de acordo com *Guide for the care and use of laboratory animals* (BARTHOLD, 2011) e conforme a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013). O experimento teve a duração de 50 dias para realização do procedimento operatório e eutanásia. Durante o experimento os animais permanecerão no Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas.

Técnica operatória

Para implantação do medicamento no tecido subcutâneo dos animais, foram confeccionados em tubos de polietileno a partir de uma sonda uretral de 1,2 mm de diâmetro (0,8 mm de diâmetro interno), segmentada em fragmentos de 10 mm de comprimento. Para impedir o extravasamento dos produtos antimicrobianos testados, os tubos tiveram uma das extremidades fechada à quente, com o auxílio de uma pinça hemostática e uma lamparina. Em seguida foram autoclavados a uma temperatura de 120°C durante 20 minutos.

Para este estudo utilizamos os seguintes produtos antimicrobianos:

- Grupo I = Proheal® (Iodofórmio 15,5%)
- Grupo II = Calen® (pasta de hidróxido de cálcio 49,77% com glicerina)
- Grupo III =Clorexoral® (clorexicidina 2%)
- Grupo IV=Hydropast+I® (pasta de hidróxido de cálcio 38% com iodofórmio 26%)
- Grupo V= Glicerina (controle)

Os materiais após serem acondicionados em tubos de polietileno foram implantados no tecido subcutâneo da região dorsal dos ratos, num total de 5 tubos por animal, ou seja, cada tubo continha o material em uma situação ou condição

diferente. Após 7, 21 e 42 dias, os animais foram sacrificados e as regiões que continham os tubos de polietileno foram removidas.

Desta forma, cada animal recebeu cinco implantes, sendo dois implantes próximos à região escapular, um direito e outro esquerdo e dois implantes pélvicos, um direito e outro esquerdo e mais um tubo contendo glicerina para controle. Assim, para cada grupo experimental e controle tivemos quatro amostras e um controle.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepan (25 mg/kg) e, para controle analgésico, foi utilizado butorfanol (1,0mg/kg). Para aplicação do anestésico com seringa de 1ml e agulha hipodérmica de 45 x 13mm, foi realizado a contenção dos animais através do dorso, posicionando-os sobre a mesa operatória em decúbito dorsal com os membros em extensão. Em seguida foi realizada a tricotomia da região dorsal do animal e desinfecção da área tricotomizada com gaze embebida em iodopovidona. Os procedimentos foram realizados sob rigorosas condições de assepsia.

Na sequência, 5 incisões de aproximadamente 5 mm de largura, com lâmina de bisturi 15 acoplada ao cabo de bisturi Bard Parker nº03, sendo duas incisões escapulares e duas pélvicas. A divulsão do tecido subcutâneo foi feita com tesoura de ponta romba, sendo introduzida aproximadamente 20 mm de comprimento no tecido subcutâneo. Então quatro lojas cirúrgicas foram preparadas no dorso do animal, e nestas serão implantados os tubos de polietileno com os medicamentos dos grupos I, II, III e IV em cada loja cirúrgica no sentido longitudinal com auxílio de uma pinça clínica. A extremidade aberta do tubo, ou seja, aquela onde o cimento ficará em íntimo contato com o tecido adjacente, foi introduzida na região oposta à da incisão, para que a reação inflamatória, formada na área incisada, não interferisse na avaliação microscópica na região onde será colocado o medicamento. As bordas da ferida foram suturadas com agulhas montadas de 1,6 cm com fio de seda 3-0.

Após a realização dos implantes dos tubos de polietileno, todos os animais, receberam por via intramuscular uma dose 0,2 ml de pentabiótico veterinário (Laboratório Wyeth®, Itapevi, São Paulo, Brasil), para evitar infecções secundárias.

Durante todo o período de estudo, os ratos ficaram sob observação diária para verificação de uma possível alteração macroscópica no local dos implantes.

Coleta de tecidos

Após a eutanásia dos animais que foram realizadas por decapitação com guilhotina (com sedação prévia por Tiopental 50 mg/kg), as áreas que apresentavam materiais implantados foram removidas por meio de uma incisão local, abrangendo tecido adjacente além da área a ser estudada.

Após a coleta das amostras, as mesmas foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado durante 24 horas, mantidas em frascos unitários opacos, ao abrigo da luz, com identificação do rato, grupo e localização dos tubos, para posterior avaliação histopatológica no Laboratório de Patologia.

O descarte dos animais foi realizado de acordo com as Normas de Boas Práticas de Produção de Animais de Laboratórios e Biossegurança, ou seja, após a eutanásia, os animais foram acondicionados em sacos plásticos próprios para material biológico e levados ao freezer (-20°C) onde permaneceram até a coleta. A coleta foi realizada pela empresa Ambienttus (Coleta de Resíduos Infectantes).

Análise histopatológica

Após 24 horas de fixação, as peças foram lavadas em água corrente e analisadas macroscopicamente, sendo aparadas e seccionadas com lâminas de bisturi número 22. Este procedimento permitiu a localização dos tubos de polietileno, com manutenção de suficiente tecido ao redor deles para análise.

Após localização da extremidade aberta dos tubos contendo material antimicrobiano, que esteve em contato com tecido subcutâneo dos ratos, foi realizado corte nessa extremidade e cuidadosamente retirado a porção proximal da abertura do tubo.

Logo após, o material foi acondicionado em cassetes unitários para o correto processamento histológico realizado por um processador histológico automático (Modelo 893, Ancap®, São Paulo, Brasil). Em seguida o material será embebido em parafina, obtendo blocos para o corte histológico.

Os blocos de parafina foram corretamente identificados e posicionados em micrótomo, sendo os espaços que eram ocupados pelos tubos de polietileno preenchidos com parafina e foram realizados os cortes com 5 micrômetros de espessura. Após a completa secagem das lâminas em estufa a 60°C, os cortes serão corados em hematoxilina e eosina.

De acordo com as respostas teciduais provocadas pelos produtos com ação antimicrobiana testados, foram realizadas as análises microscópicas das amostras, comparando-as entre si e ao controle.

A avaliação das respostas do tecido subcutâneo em contato com os produtos antimicrobianos foi realizada de forma descritiva, quantitativa subjetiva, levando-se em consideração o infiltrado inflamatório e fenômenos correlatos, tais como:

1. Tipo do infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e/ou células mononucleares).
2. Vascularização, através da presença e forma de apresentação dos vasos sanguíneos.

Todos os dados relativos às análises microscópicas foram registrados numa ficha previamente preparada para cada material e períodos analisados.

A leitura das lâminas foi realizada com o auxílio de um microscópio (5x e 40x), por dois observadores, que não tiveram conhecimento da ordem dos materiais analisados, em duas ocasiões diferentes.

As lâminas representativas de cada grupo experimental foram fotomicrografadas em aparelho Zeiss, utilizando-se filme Elite Gold-Kodak, ASA 100.

Análise estatística

As análises estatísticas e gráficos foram feitos utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0®. Para comparar médias entre os controles foi usado Test T Student. Para comparar as médias de contaminação entre implantes tratados com diferentes drogas foi usado ANOVA de uma via seguida de Tukey. Para comparar a frequência dos scores da reação tecidual aos medicamentos foi usado o teste de Qui quadrado. Os dados são apresentados na forma de média \pm EPM e foram considerados significativos os valores de p menores que 0,05.