

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMPLANTOLOGIA**

**SAUL GALILEU SARTORI**

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE DA MEMBRANA  
DE SILICONE VEDAR A INFILTRAÇÃO DE BACTÉRIAS  
PERIODONTOPATOGÊNICAS NO MICRO-ESPAÇO ENTRE O PILAR  
PROTÉTICO E IMPLANTES DE HEXÁGONO EXTERNO**

**SÃO PAULO  
2006**

SAUL GALILEU SARTORI

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE DA MEMBRANA DE  
SILICONE VEDAR A INFILTRAÇÃO DE BACTÉRIAS  
PERIODONTOPATOGÊNICAS NO MICRO-ESPAÇO ENTRE O PILAR  
PROTÉTICO E IMPLANTES DE HEXÁGONO EXTERNO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Mestrado da  
Universidade Santo Amaro para obter  
o título de Mestre. Área de  
Concentração - Implantodontia, sob a  
orientação do Prof. Dr. José Luiz De  
Lorenzo.

SÃO PAULO  
2006

Tipo entrada .....  
Ncta Fiscal .....  
Data rec. .... 22.11.07 .....  
Preço .....  
Origem .....  
.....

**Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I**

S868a Sartori, Saul Galileu  
Avaliação da infiltração de bactérias periodontopatogênicas no microespaço entre pilar protético e implante dentário vedado por gel de silicone / Saul Galileu Sartori. Orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo. -- São Paulo: 2006. 69 p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.

1. Implantes Dentários 2. Microbiologia 3. Infiltração  
4. Géis de silicone 5. Bactérias I. Título. II. Orientador

**SAUL GALILEU SARTORI**

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE DA MEMBRANA DE  
SILICONE VEDAR A INFILTRAÇÃO DE BACTÉRIAS  
PERIODONTOPATOGÊNICAS NO MICRO-ESPAÇO ENTRE O PILAR  
PROTÉTICO E IMPLANTES DE HEXÁGONO EXTERNO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado da Universidade Santo Amaro para obter o título de Mestre. Área de Concentração - Implantodontia, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo.

APROVADA EM 06, 11, 2006

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE LORENZO

Doutor em Ciências, Área de Microbiologia, pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. JAMIL AWAD SHIBLI

Doutor em Periodontia pela Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP.

---

Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO CORTELLI

Doutor em Biopatologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

---

CONCEITO FINAL: \_\_\_\_\_

**À minha esposa e companheira STELA MARIS, que com seu entusiasmo, apoio e amor me fez ultrapassar os desafios, tornando possível mais esta conquista.**

**Às minhas queridas filhas ROBERTA E GABRIELA, pelo amor e razão do constante aprimoramento da minha vida.**

**Aos meus pais AMANDO e ALICE *in memoriam* pelos rígidos conceitos éticos de respeito e responsabilidade.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por estar sempre presente em minha vida.

Ao orientador Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE LORENZO que soube conduzir com maestria a realização deste trabalho, estimulando as bases sólidas da ciência dentro da ética e da moral, tornando-se um grande amigo.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. NÍVEA MARIA DE FREITAS pela sua dedicação, e orientação na execução de toda a parte experimental.

Ao Prof. Dr. WILSON ROBERTO SENDYK por desvendar os caminhos sinuosos da ciência.

À Prof<sup>a</sup> FÁTIMA NEVES FARACO pelo apoio e orientação para confecção do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. MARIO JULIO AVILA-CAMPOS pela atenção e contribuição com controles da parte experimental.

Ao Prof. Dr. CASEMIRO FERNANDO SOARES LEITE pelos seus ensinamentos em informática.

Ao Prof. Dr. FABIO DALMAS NUNES por permitir a utilização do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

À TODOS PROFESSORES envolvidos nos créditos do mestrado, o meu muito obrigado por colaborarem com minha evolução.

Aos colegas e amigos Marcello Roberto Manzi e Norma Terumi Kadowaki pelo companheirismo e trabalhos em equipe.

Aos colegas de MESTRADO pela amizade, troca de conhecimentos e incentivo para superar as dificuldades. MEU MUITO OBRIGADO.

À JULIANA OLIVEIRA e WELINGTON pela organização e distribuição dos materiais didáticos pedagógicos.

À LUCIANA CRISTINA COSTA pela ajuda no levantamento e formatação bibliográfica.

À RENATA DA SILVA pelo auxílio bibliográfico.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da colocação de uma placa de silicone no vedamento da interface entre o pilar protético e a base de 15 implantes de hexágono externo osseointegrados, em dez pacientes portadores de coroas protéticas instaladas havia dois a 36 meses e com boa condição clínica dos tecidos perimplantares. As amostras microbiológicas foram coletadas desses micro-espacos antes da inserção da membrana de silicone e 30 e 90 dias após. Após a extração do DNA, foram submetidas, em triplicata, à reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos patógenos periodontais e perimplantares *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythensis*. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em quatro amostras iniciais e persistiu em três coletadas 30 e 90 dias após a colocação da placa de silicone. *T. forsythensis* foi identificado em nove amostras iniciais e persistiu até 90 dias em quatro. *P. gingivalis* foi detectado em cinco amostras iniciais e nas coletadas após 30 dias, mas somente em duas após 90 dias. *P. intermedia* foi identificado em 12 amostras iniciais, em sete após 30 dias e em igual número após 90 dias. Assim, ficou evidenciado que a placa de silicone não foi suficiente para impedir a penetração de nenhuma dessas espécies na interface entre o pilar protético e o implante.

**Palavras-chave** - Implantes dentários, Microbiologia, Infiltração, Géis de silicone, Bactérias.

## ABSTRACT

The purpose of this study is to test the effectiveness of silicone gel sheets as a barrier in the inner microgap between the abutment protetic and the 15 osseointegrated implants of the external hexagon, in ten patients with protetic crowns in function for 2 – 36 months and good clinical peri-implant tissues conditions. Samples were collected from the inner space of external hexagon implants, prior, 30 and 90 days after the silicone gel sheeting insertion, and submitted three times to a polimerase chain reaction (PCR) to detect the DNA of periodontal and peri-implant pathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Tannerella forsythensis*. *A. Actinomycetemcomitans* was detected in four initial samples and persisted in three collected 30 and 90 days after placing the silicone gel sheet. *T. forsythensis* was identified in nine initial samples and was still detected in 90 days in four of the samples. *P. gingivalis* was detected in five of the initial samples and in those collected after 30 days, but only in two after 90 days. *P. intermedia* was identified in 12 of the initial samples, in seven after 30 and 90 days. Results have shown that the silicone gel sheeting was not proven to be an effective barrier against infiltration of the species mentioned through the microgap between the abutment protetic and the implant.

**Key words-** Dental Implants, Microbiology, Infiltration, Silicone gels, Bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Coleta, com cone de papel absorvente, das amostras bacterianas contidas na parte interna do implante.....	34
<b>Figura 2</b> - Cones no interior de tubo Eppendorf, contendo amostras para serem analisadas por PCR.....	34
<b>Figura 3</b> - Cuba ultrassônica.....	35
<b>Figura 4</b> - Desinfecção da região interna dos implantes com álcool-iodado.....	35
<b>Figura 5</b> - Embalagem do silicone comercial MEDGEL® SILIMED.....	36
<b>Figura 6</b> - Prótese limpa e desinfetada com placa de silicone para ser conectada ao implante.....	36
<b>Figura 7</b> - Radiografias periapicais confirmando a adaptação entre a coroa protética e o implante.....	37
<b>Figura 8</b> - Aparelho Vortex.....	39
<b>Figura 9</b> - Estufa utilizada para a secagem.....	39
<b>Figura 10</b> - Espectrofotômetro Beckman DU® 640.....	40
<b>Figura 11</b> - Iniciadores de PCR espécie-específicos ( <i>primers</i> ) para <i>T. forsythensis</i> .	41
<b>Figura 12</b> - Termociclador.....	42
<b>Figura 13</b> - Fonte elétrica (voltagem) utilizada para a corrida eletroforética.....	43
<b>Figura 14</b> - Gel de agarose a 2%.....	44
<b>Figura 15</b> - Cuba horizontal com tampão de corrida TAE.....	44
<b>Figura 16</b> - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e observado em transiluminador ultravioleta, correspondente à espécie <i>Prevotella intermedia</i> 575pb.....	47

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Relação dos iniciadores espécie-específicos utilizados e dos fragmentos esperados..... 41
- Quadro 2** - Detecção, por PCR, do DNA de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 60 dias após a incorporação da membrana de silicone. .... 48
- Quadro 3** - Detecção, por PCR, do DNA de *Tannerella forsythensis* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 60 dias após a incorporação da membrana de silicone. .... 49
- Quadro 4** - Detecção, por PCR, do DNA de *Porphyromonas gingivalis* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 60 dias após a incorporação da membrana de silicone..... 50
- Quadro 5** - Detecção, por PCR, do DNA de *Prevotella intermedia* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 60 dias após a incorporação da membrana de silicone. .... 51

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Comparação entre a frequência de identificação de pelo menos uma das bactérias-alvo no material coletado do micro-espço entre pilar protético e 15 implantes antes e 30 e 90 dias após a colocação da membrana de silicone. ....52
- Tabela 2 -** Relação de positividade e negatividade da identificação, por PCR, do DNA de espécies-alvo no material coletado do micro-espço entre pilar protético e 15 implantes antes e 30 dias após a colocação da membrana de silicone. Análise pelo teste Qui-quadrado com correção de Yates e pela série de Taylor para estabelecer o cálculo do risco relativo no intervalo de confiabilidade de 95%. ....53
- Tabela 3 -** Relação de positividade e negatividade da identificação, por PCR, do DNA de espécies-alvo no material coletado do micro-espço entre pilar protético e 15 implantes antes e 90 dias após a colocação da membrana de silicone. Análise pelo teste Qui-quadrado com correção de Yates e pela série de Taylor para estabelecer o cálculo do risco relativo no intervalo de confiabilidade de 95%. ....54
- Tabela 4 –** Relação de positividade e negatividade da identificação, por PCR, do DNA de espécies-alvo no material coletado do micro-espço entre pilar protético e 15 implantes 30 e 90 dias após a colocação da membrana de silicone. Análise pelo teste Qui-quadrado com correção de Yates e pela série de Taylor para estabelecer o cálculo do risco relativo no intervalo de confiabilidade de 95%. ....55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A = adenina

C = citosina

°C = grau Celsius

dATP = desoxiadenosina-trifosfato

dCTP = desoxicitidina-trifosfato

dGTP = desoxiguanosina-trifosfato

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNTP = solução de 2'-deoxinucleotídeo 5'-trifosfato- dATP, dTTP, dCTP  
e dGTP / deoxinucleotídeotrifosfato

dTTP = desoxiatimina-trifosfato

EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético

*g* = gravidade

G = guanina

GuSCN = tiocianato de guanidina

KCl = cloreto de potássio

M = molar ou molaridade

Mg = magnésio

MgCl<sub>2</sub> = cloreto de magnésio

ml = mililitro

mM = milimolar

μg = micrograma

μl = microlitro

$\mu\text{M}$  = micromolar

ng = nanograma

pb = pares de base

PCR = *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

$\text{SiO}_2$  = dióxido de silício

T = timina

TAE = Tris-acetato

Taq = *Termophilus aquaticus*

Tris-HCL = TRIS-hidroximetil-aminometano/ácido clorídrico

U = unidade

UV = ultravioleta

V = Volt (voltagem)

V/V = volume/volume

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1 Infiltração de fluidos e bactérias entre as peças do implante.....	18
2.2 Mensuração dos micro-espacos entre os componentes dos implantes	
Dentários.....	25
2.3 Tentativas de impedir a infiltração entre as peças do implante dentário.....	26
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 Seleção dos pacientes.....	31
4.2 Coleta do material.....	32
4.3 Extração dos DNA bacterianos.....	37
4.4 Quantificação.....	39
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
4.6 Análise estatística .....	45
<b>5 RESULTADOS</b> .....	47
5.1 Análise microbiológica .....	47
5.2 Análise estatística.....	52

<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar de a infiltração de fluidos orgânicos e microrganismos na interface pilar/implante e pilar/coroa protética de implantes osseointegrados causar efeitos indesejáveis como o mau odor e sabor desagradáveis, ainda são poucas as pesquisas que abordam esse tema. O número dos que buscam alternativas para eliminar essa infiltração, notadamente de bactérias patogênicas, é ainda consideravelmente menor. Esses trabalhos demonstraram a ineficácia do aumento de torque (GROSS; ABRAMOVICH; WEISS, 1999) e da utilização de membrana de silicone (RIMONDINI et al., 2001), soluções de clorexidina (FERRARI, 2004; GROENENDIJK et al., 2004; OLIANI, 2004) e gutapercha (PROFF et al., 2006).

Os implantes dentários não são totalmente cobertos pelos tecidos, pois parte deles fica exposta ao ambiente bucal e é facilmente colonizada por biofilme formado pela microbiota bucal e alguns membros suplementares dessa microbiota podem ocasionar, posteriormente, doenças perimplantares (DE LORENZO; CAVENAGUE, 2004). A mais grave é a perimplantite, caracterizada pela perda óssea progressiva associada à inflamação dos tecidos localizados ao redor do implante dental. Suas características clínicas são semelhantes às da periodontite: inflamação, aumento da profundidade clínica de sondagem, sangramento à sondagem, supuração, dor, mobilidade e evidências radiográficas de perda óssea (LEKHOLM et al., 1986; TANNER; STILLMAN, 1993). Devido à osseointegração que persiste na parte mais profunda do implante, pode ocorrer perda óssea sem sinais notáveis de mobilidade, até que o implante seja completamente perdido (MOMBELLI, 2002).

A infiltração e a posterior colonização de microrganismos podem ocorrer na interface pilar/implante de implantes osseointegrados. Apesar de sua reduzidíssima dimensão, esse microvalamento permite a infiltração de fluidos orgânicos e microrganismos, processo responsável pelo mau odor (McCARTHY; GUCKES, 1993) e provável inflamação dos tecidos perimplantares (GROSS; ABRAMOVICH; WEISS, 1999), pois os microrganismos podem se translocar novamente para a região perimplantar.

Traversy e Birek (1992) despertaram esse conhecimento ao constatarem *in vitro* a infiltração bidirecional de fluido e bactérias nessa interface. Quirynen e van Steenberghe (1993) confirmaram a presença de quantidades significantes de microrganismos na porção apical de 18 parafusos de pilares-padrão Bränemark que haviam estado em função por três meses.

Estas pesquisas pioneiras, baseadas em cultivos e em microscopia de contraste de fase, abriram novo campo de investigação na Microbiologia aplicada à Implantodontia. Métodos moleculares tornaram-se disponíveis, a partir da década de 1990, para uma identificação mais acurada das espécies bacterianas, passando a representar uma excelente opção para o monitoramento microbiológico também na área da Implantodontia. Dentre essas técnicas, a reação da polimerase em cadeia (PCR) destaca-se pela rapidez e alta especificidade na detecção de microrganismos envolvidos em diferentes processos infecciosos bucais (SLOTS et al., 1995). Tanto a PCR como as sondas genéticas detectam mínimas quantidades do DNA de microrganismos ( $10^2$  e  $10^4$ , respectivamente) e também apresentam as vantagens de permitir a detecção de espécies bacterianas não-cultiváveis ou de difícil cultivo, como *Treponema* spp e *Tannerella forsythensis*, e a diferenciação de espécies não

identificáveis pelo perfil bioquímico, como *Prevotella intermedia* e *P. nigrescens* (MAYER; DE LORENZO, 2004).

Este trabalho é uma seqüência da linha de pesquisa iniciada por Ferrari e Oliani em suas dissertações de Mestrado apresentadas a esta Universidade em 2004 e que constatou a ineficácia da solução de clorexidina a 2% no impedimento da sobrevivência, durante 30 dias, de bactérias que se infiltram nos microvalamentos entre os componentes de implantes dentários. Em função desses resultados, optamos pela tentativa de vedar mecanicamente esses micro-espacos utilizando uma membrana de silicone já empregada em Medicina para uso em cicatrizes.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Infiltração de fluidos e bactérias entre as peças do implante

*In vitro*, Traversy e Birek (1992) demonstraram, na interface pilar/implante do sistema Bränemark, a infiltração bidirecional de fluido contendo *Streptococcus sanguinis* (denominação atual), um dos colonizadores iniciais encontrados em grande número tanto no biofilme dental como no perimplantar.

Quirynen e van Steenberghe (1993) investigaram a presença de bactérias no filamento interno da fixação pilar/implante do sistema Bränemark. Em nove voluntários a parte apical dos dois parafusos de apoio dos pilares colocados havia três meses foi examinada por microscopia de contraste de fase diferencial. Todos os parafusos abrigaram uma quantidade significativa de células bacterianas, principalmente cocóides (86,2%) e bastonetes sem mobilidade (12,3%), enquanto bastonetes móveis (1,3%) e espiroquetas (0,1%) foram observados apenas esporadicamente.

De acordo com McCarthy e Guckes (1993), os portadores de pilar angulado do sistema de implante Bränemark freqüentemente reclamam de gosto desagradável e cheiro repugnante, provavelmente como resultado de infiltração e conseqüente colonização bacteriana dentro do espaço de acesso do parafuso no pilar. Sugeriram, como método de prevenção da infiltração e colonização bacteriana, o uso de um cimento temporário colocado dentro do espaço de acesso ao parafuso, antes de a

prótese ser parafusada no lugar; os pacientes relataram a completa eliminação do gosto desde que o cimento foi adicionado em conjunto à fixação do parafuso.

Quirynen et al. (1994) examinaram a infiltração bacteriana *in vitro* em 32 montagens implante/pilar e prótese/pilar do sistema Brånemark®, imersas em meio de cultivo contendo microrganismos isolados de placas dentais de indivíduos com doença periodontal. Submergiram parcialmente 16 montagens e totalmente as demais e, depois de sete dias de incubação anaeróbica, encontraram maior número de bactérias nas totalmente submersas e menor número nas parcialmente submersas. Dentre as bactérias isoladas nesse estudo, algumas são associadas com a perimplantite: *Peptostreptococcus (Micromonas) micros*, *Eubacterium* spp, *Fusobacterium nucleatum* e *Bacteroides* spp (na atualidade, provavelmente *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythensis*).

Persson et al. (1996) examinaram a microbiota da superfície interna de 28 componentes de implantes do sistema Brånemark® instalados em dez parcialmente desdentados que haviam recebido próteses parciais fixas e que estavam em função de um a oito anos. Os pilares protéticos foram removidos e classificados como estáveis, facilmente removidos e frouxos, e destes foram coletadas amostras da superfície interna dos implantes, analisadas pela coloração de Gram, cultivo aeróbico e anaeróbico em agar-sangue e testes bioquímicos. A microbiota detectada era heterogênea e predominantemente anaeróbica. Não pôde ser observada relação entre o tipo e o comprimento do pilar protético, a estabilidade do pilar de prótese, a perda óssea e o tipo e número de microrganismos encontrados nas amostras. Estreptococos anaeróbicos e facultativos predominavam na microbiota, também constituída por bastonetes anaeróbicos Gram-positivos dos gêneros *Propionibacterium*, *Eubacterium* e

*Actinomyces* e bastonetes anaeróbicos Gram-negativos como os dos gêneros *Fusobacterium* e os atuais *Prevotella* e *Porphyromonas*. Existem razões para sugerir que a presença de bactérias nas superfícies internas dos implantes ocorra pela contaminação dos componentes pilar/implante das próteses pela transmissão dos microrganismos do ambiente bucal.

Keller; Bragger e Mombelli (1998) compararam as características clínicas e microbiológicas da área em torno de implantes que levam tanto sobreestruturas retidas por parafusos como as cimentadas. O objetivo foi investigar a relação entre as microbiotas perimplantar, a interna da sobreestrutura parafusada e a periodontal do mesmo indivíduo. Em 15 parcialmente desdentados que portavam implantes ITI® usados como pilares para reconstrução de coroas e pontes, foram coletadas amostras de microrganismos da bolsa periodontal mais profunda de cada quadrante, do sulco dos implantes e da superfície interna das estruturas parafusadas. As amostras foram cultivadas em condição de anaerobiose contínua. Nos cinco pacientes que apresentavam próteses tanto cimentadas como parafusadas, as contagens médias totais do cultivo foram significativamente mais altas nas amostras perimplantares de próteses cimentadas que nas parafusadas. Entretanto, as amostras perimplantares do grupo “parafusado” tiveram uma proporção maior de células cocóides no microscópio de campo escuro e demonstraram ausência de espiroquetas longos. Nos 15 pacientes foram detectados *P. gingivalis* em 10% das amostras periodontais e apenas uma perimplantar, *P. intermedia* em 33% das amostras periodontais e em 30% das perimplantares, *Fusobacterium* ssp. em 58% das periodontais e 50% das perimplantares; não se detectou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em nenhuma das amostras, porém em um caso foi detectado na parte interna da prótese. A análise

linear demonstrou relação significativa entre a frequência de microrganismos nas amostras dentais, perimplantares e das superfícies internas da sobreestrutura das próteses parafusadas. Estes achados indicam que a infiltração de microrganismos através do espaço entre a sobreestrutura e o pilar tem um papel importante na colonização bacteriana na parte interna das coroas e pontes retidas por parafusos, confirmando o impacto da microbiota dental na colonização microbiana dos implantes.

Orsini et al. (2000) removeram os blocos ósseos que continham implantes osseointegrados de uma falecida. Esses blocos foram submetidos à análise histológica, que revelou a presença de infiltrado inflamatório na interface pilar-implante e de placa bacteriana e cálculo salivar na região interna dos implantes. Segundo os autores essa infiltração ocorre sempre em implantes de dois estágios.

Discutindo trabalhos encontrados na literatura, Quiryneen; de Soete e van Steenberghe (2002) enfatizaram que o espaço na interface pilar-implante propicia a instalação e permanência de placa bacteriana, preferencialmente se a união pilar-implante da prótese for subgingival; entretanto não há evidência de estar relacionada com o desencadeamento da perimplantite.

Cravinhos (2003) avaliou *in vitro* a infiltração de *S. sanguinis* na interface do pilar protético conectado ao implante em três sistemas de implantes (Colosso<sup>®</sup>, Conect<sup>®</sup> e Globtek<sup>®</sup>). Constatou que todos apresentaram infiltração bacteriana que pode a longo prazo comprometer a estabilidade dos implantes. A microfenda entre pilar protético e implante é inevitável, porém pode-se utilizar artifícios para minimizar clinicamente este efeito, como o posicionamento supracrestal da interface, o torque empregado no parafuso de conexão e o desenho do sistema na tentativa de reduzir a microfenda.

Segundo Dottori; Sendyk e Gromatzky (2003), a colonização bacteriana sempre ocorre na interface implante-pilar intermediário, podendo variar a quantidade de infiltração de fluido e bactérias entre os diversos sistemas de implantes. O significado clínico desta infiltração é incerto e sua correlação com a perimplantite e os componentes dos implantes nas áreas subgingivais não está totalmente esclarecida.

Broggini et al. (2003) avaliaram histomorfometricamente a conexão pilar-implante em três tipos de implantes instalados em mandíbulas de cães. Implantes de duas peças foram colocados na crista alveolar, um conectando pilar não-submerso e outro permaneceu submerso por três meses; o terceiro era de uma só peça. Foram analisados os tecidos intersticiais adjacentes. Em ambos os implantes de duas peças constatam grande número de células inflamatórias na região do micro-espço, principalmente de neutrófilos. Nos implantes de uma peça não foram observadas células inflamatórias. Nos implantes de duas peças foi observada perda óssea significativamente maior que nos de uma peça, sugerindo que a ausência de interface pilar-implante (micro-espço) na crista óssea esta associada com a redução da perimplantite, do número de células inflamatórias e da perda de osso.

As bactérias detectadas entre os componentes do implante provavelmente sejam translocadas do biofilme perimplantar, que apresenta composição semelhante à do biofilme subgingival dos dentes naturais. Mais de 500 espécies bacterianas já foram identificadas, por cultivos ou métodos moleculares, na microbiota do biofilme subgingival maduro (DE LORENZO, 2004; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002) e as espécies que geralmente o colonizam tardiamente cumprem papel decisivo na

etiopatogenia das doenças periodontais e perimplantares (DE LORENZO; CAVENAGUE, 2004; DE LORENZO; MAYER, 2004; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

As quatro espécies bacterianas-alvo deste trabalho são referidas por De Lorenzo e Mayer (2004) como tendo as seguintes características básicas:

a) *Actinobacillus* (na atualidade *Aggregatibacter*) *actinomycetemcomitans* - cocobacilo Gram-negativo, reto ou encurvado com extremidades arredondadas e facultativo. Única espécie bucal deste gênero, seu nicho primário é a região subgingival; coloniza mucosas e compõe a microbiota da orofaringe humana. Relacionado principalmente com a etiologia da periodontite agressiva, mas também com casos severos de periodontite crônica. É a única espécie bucal que elabora leucotoxina, provavelmente seu principal fator de virulência. Fora da boca tem sido descrita como causadora de endocardite infecciosa, abscessos cerebrais e subcutâneos, osteomielite e otite média. Suas dimensões são de 0,4 por 1,0µm.

b) *Porphyromonas gingivalis* - cocobacilo Gram-negativo anaeróbio estrito relativamente aerotolerante, apresenta limitada capacidade de fermentar carboidratos e é a mais proteolítica dentre as bactérias Gram-negativas da microbiota bucal. Produz proteases, como a colagenase, e fosfolipase A. Desenvolve colônias negro-pigmentadas. Fortemente associado com lesões severas de periodontite crônica. Suas dimensões são de 0,5 por 1,0 a 2,0µm.

c) *Prevotella intermedia* - bacilo Gram-negativo anaeróbio estrito; fermenta alguns carboidratos e é proteolítico, apresentando alta atividade de peptidase - digere gelatina e produz indol. Suas colônias apresentam-se pigmentadas geralmente em negro. Habita o sulco gengival com evidências de sua participação

na etiologia de gengivites, principalmente na que pode ocorrer na gestação e em outras alterações hormonais e na gengivite ulcerativa necrosante (GUN); também é isolado de bolsas periodontais que não apresentaram perda óssea recente. Suas dimensões são de 0,4 a 1,5 por 1,5 a 2,0 ou até 12,0 $\mu$ m.

d) *Tannerella forsythensis* - bacilo Gram-negativo fusiforme, podendo apresentar morfotipos pleomórficos como filamentos longos. Anaeróbio estrito com metabolismo sacarolítico. Apresenta desenvolvimento fastidioso e suas colônias não desenvolvem pigmento escuro. Tem expressiva atividade do tipo tripsina e está fortemente relacionado com periodontites severas. Suas dimensões são de 0,3 a 0,5 por 1,0 a 5,0 $\mu$ m.

Steinebrunner et al. (2005) avaliaram *in vitro* a infiltração bacteriana na interface pilar-implante associada a um simulador mastigatório em dois eixos de carga. Os autores teorizaram que o carregamento dinâmico diminuiria a estabilidade das conexões de pilar-implante, facilitando a penetração bacteriana no micro-espço criado. Testaram cinco sistemas de implantes (Brånemark<sup>®</sup>, Frialit-2/Hermetics<sup>®</sup>, Replace Select<sup>®</sup>, Camlog<sup>®</sup> e Screw-Vent<sup>®</sup>) com oito combinações de pilar-implante padrões para coroas únicas de molar. Estas foram imersas e incubadas em uma solução nutriente com *E coli* e carregadas com 1.200.000 ciclos de 120N no simulador mastigatório. Constataram diferenças significantes entre os sistemas de implantes em relação ao número de ciclos mastigatórios necessários para que ocorresse a penetração bacteriana: 172.800 ciclos para Brånemark, 43.200 ciclos para Frialit-2/Hermetics, 64.800 ciclos para Replace Select, 345.600 ciclos para Camlog e 24.300 ciclos para Screw-Vent. Sugeriram, assim, que a precisão de ajuste entre o pilar-implante, o grau de

micromovimentos entre os componentes e o torque que os conectava eram os responsáveis pelos resultados obtidos. Demonstraram que esse teste pode ser uma ferramenta sensível para as empresas aperfeiçoarem seus implantes e componentes protéticos, com o sentido de prevenir a penetração bacteriana em condições de carregamento dinâmico.

Utilizando sondas genéticas no material coletado da superfície interna de 43 implantes, Callan; Cobb e Williams (2005) identificaram *A. actinomycetemcomitans* em 41,9% deles, *T. forsythensis* em 60,5%, *C. rectus* em 44,2%, *E. corrodens* em 60,5%, *F. nucleatum* em 48,8%, *P. gingivalis* em 46,5%, *P. intermedia* em 55,8% e *T. denticola* em 51,2%.

## **2.2 Mensuração dos micro-espacos entre os componentes dos implantes dentários**

Utilizando microscopia eletrônica, Vidigal Jr et al. (1995) constataram que, na dependência do sistema analisado (Bränemark®, Screw-Vent®, IMZ®, TF® e SR-Press®), existem variações de 20 até 150µm na mensuração da interface pilar/implante. Segundo os autores, esses espaços favorecem o acúmulo de placa bacteriana, o que pode desencadear perimplantite.

Jansen; Conrads e Richter (1997) relataram a penetração *in vitro* de *Escherichia coli* na interface pilar-implante de dez sistemas diferentes de implantes. A menor infiltração ocorreu no Frialit-2®, que já vem fornecido com película de silicone. A largura do espaço marginal entre os componentes pré-fabricados, medidos em microscopia

eletrônica de varredura, foi menor que  $10\mu\text{m}$  em todos os sistemas. Essas fendas são inevitáveis e seu significado clínico tem sido negligenciado tanto pelos fabricantes como pelos clínicos.

Piattelli et al. (2001) compararam *in vitro* a penetração de fluidos e bactérias em dois sistemas de retenção de próteses sobre implantes: o cimento e o parafuso. Utilizando análises em microscópio eletrônico de varredura, penetração de fluido com papel absorvente e da penetração de *Pseudomonas aeruginosa*, avaliaram 12 implantes com próteses cimentadas e 12 parafusadas. No microscópio eletrônico foi possível observar nos parafusados um micro-espaco de 2 a  $7\mu\text{m}$  entre o implante e o pilar, enquanto que nos cimentados o micro-espaco foi de  $7\mu\text{m}$ , comprovando a existência de microfenda em ambos, porém este último é preenchido por cimento. Nos implantes parafusados foi possível observar a penetração de azul de toluidina e de bactérias na interface pilar-implante e na parte interna do implante, enquanto que nos cimentados não houve essa penetração. Concluíram, assim, que as próteses retidas por cimento oferecem melhores resultados relacionados com a permeabilidade de fluidos e bactérias.

### **2. 3 Tentativas de impedir a infiltração entre as peças do implante dentário**

A literatura dispõe de pequeno número de relatos sobre recursos para eliminar ou pelo menos reduzir a infiltração de bactérias entre as peças componentes dos implantes dentários.

Gross; Abramovich e Weiss (1999) avaliaram a microinfiltração ocorrida no micro-espaco entre pilar-implante em cinco sistemas de implantes (Bränemark®, Sulzer Calcitek®, 3i®, ITI® e Steri-Oss®) com diferentes torques de fechamento. Utilizaram sinal colorido dirigido por sistema de pressão de duas atmosferas no micro-espaco dos pilares-implantes, sendo determinado espectrofotometricamente. A microinfiltração no micro-espaco ocorreu em todos os sistemas. Com o aumento do torque de fechamento de 10Ncm para 20Ncm recomendado pelos fabricantes, a microinfiltração diminuiu significativamente em todos. Os resultados indicam que fluidos e pequenas moléculas são capazes de atravessar a interface de todos os sistemas estudados, contribuindo em parte com mau odor e perimplantites observados clinicamente.

Rimondini et al. (2001) estudaram, em pacientes com boa higiene bucal, dois componentes protéticos, um selado com fina camada de silicone e outro sem selamento. Avaliaram a contaminação da parte interna dos conjuntos pilar-implante retidos por parafusos, após a reconstrução protética provisória da oclusão. A contaminação orgânica e inorgânica foi examinada dois meses após, em microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia dispersa de raio-X (EDS). Foi encontrada uma contaminação amorfa e cristalina, sugestiva de componentes de cálcio e fosfato, em toda superfície do parafuso, enquanto a bacteriana foi observada entre os implantes selados e não-selados, sendo estes com uma frequência maior. Os cocos foram o tipo morfológico mais representativo, enquanto bastonetes foram vistos raramente. Os pesquisadores concluíram que a infiltração acontece na interface pilar-implante, embora a contaminação bacteriana seja limitada em pacientes com alto padrão de higiene bucal e ainda pode ser reduzida pela colocação de selamento com fina camada de silicone.

Em 2004, foram feitos três relatos sobre a possibilidade de inibir a infiltração

bacteriana com solução de clorexidina, dois executados por alunos do Mestrado em Implantodontia da UNISA (Ferrari e Oliani) e um por pesquisadores da equipe de Quirynen, na Bélgica (Groenendijk et al.).

Groenendijk et al. (2004) utilizaram a solução a 0,2% no espaço pilar-implante e constataram redução do número de bactérias cultiváveis no grupo-teste, mas não as identificaram.

Ferrari (2004) avaliou, por cultivos e PCR, a infiltração de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* e *T. denticola* no espaço interno entre pilares protéticos e implantes osseointegrados de hexágono externo e a eficácia da solução de clorexidina a 2%, durante 30 e 90 dias, no controle bacteriano neste espaço. Detectou *F. nucleatum* e *T. denticola* nas amostras coletadas 30 dias após a aplicação de clorexidina e *T. denticola* e *P. intermedia* nas que não receberam essa aplicação. Aos 90 dias foi detectada a presença de *C. rectus* nas amostras dos espaços sem clorexidina e de *P. gingivalis* e *P. intermedia* indiferentemente da aplicação ou não do antisséptico. O autor concluiu que existe a necessidade de novos estudos à procura de mecanismos para impedir a infiltração microbiana na interface pilar/implante.

Utilizando parâmetros idênticos, Oliani demonstrou as presenças de *F. nucleatum* por cultivo nas amostras coletadas 30 dias após a aplicação de clorexidina e de *T. denticola*, por PCR, nas que não receberam essa aplicação. Aos 90 dias foram detectados *P. gingivalis* e *P. intermedia* em todas as amostras, embora em menor número nas tratadas com clorexidina.

Proff et al. (2006) analisaram in vitro a infiltração de *P. gingivalis* no interior das

roscas de 20 implantes Straumann® com diâmetro de 3,3mm e comprimento de 5,5mm. Seis foram selados com gutapercha antes de serem parafusados os pilares com 20Ncm de torque. As amostras microbiológicas do interior dos implantes foram coletadas e cultivadas 24 e 72 horas após. A presença do periodontopatógeno no interior dos implantes com e sem selamento foi constatada já nas amostras colhidas em 24 horas, mostrando que a gutapercha não foi efetiva para impedir a infiltração bacteriana.

### 3 PROPOSIÇÃO

Em função do limitado número de pesquisas a respeito da possibilidade de melhor vedamento dos micro-espacos entre o implante bucal e o pilar protético, neste trabalho nos propusemos a analisar de forma qualitativa, pela PCR, se a inserção de uma placa de silicone nesse espaço, em implantes de hexágono externo, conseguiria impedir a infiltração dos patógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythensis* em observações realizadas 30 e 90 dias após sua colocação.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento seguiu as Diretrizes Internacionais de Pesquisa em Seres Humanos (2000), a Declaração de Helsink (2001), a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde para Pesquisa com Seres Humanos e a RDC 33 da ANVISA para Manuseio e Descarte de Material Biológico, tendo sido seu planejamento aprovado pela Comissão de Ética da Universidade de Santo Amaro (ANEXO C) e todos os pacientes que participaram do estudo foram informados sobre a natureza do trabalho pela Carta de Informação (Anexo A) e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

### **4.1 Seleção dos pacientes**

Foram selecionados dez pacientes de ambos os sexos, com idade entre 36 e 57 anos, inscritos na Clínica de Mestrado em Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro (UNISA). Todos eram portadores de próteses subgingivais do tipo UCLA parafusadas sobre 15 implantes de hexágono externo e com no mínimo uma coroa protética instalada em períodos que variaram de dois a 36 meses. Todos estavam em condição de saúde dos tecidos perimplantares e periodontais. Essa condição foi atestada pelos seguintes parâmetros clínicos: profundidade clínica de sondagem em seis sítios por dente ou implante ( $\leq 4$ mm), nível

clínico de inserção, sangramento a sondagem e por radiografias periapicais para confirmação da ausência de reabsorção óssea. Nenhum foi submetido a terapia com antibiótico 90 dias antes da coleta dos materiais e nem durante os 90 dias da fase experimental.

Foi realizada uma adequada investigação sobre o histórico médico e dental dos indivíduos para nos certificar de que todos apresentavam boa saúde. Foram excluídos os indivíduos fumantes, com história de diabetes, mulheres grávidas ou no período de lactação, imunocomprometidos e os submetidos à medicação com antibióticos durante 90 dias antes da coleta inicial.

#### **4.2 Coleta do material**

Após a avaliação clínica e o exame radiográfico para verificação da adaptação entre os componentes do implante, foi feita profilaxia externa do mesmo com taça de borracha e pedra-pomes e antissepsia bucal por bochecho com solução de diglucanato de clorexidina a 0,12%<sup>1</sup> por um minuto. Durante o procedimento, foi utilizado isolamento relativo com roletes de algodão e sistema de aspiração de alta potência.

As próteses foram removidas e em seguida as amostras correspondentes ao tempo zero foram coletadas com cones de papel absorvente esterilizados número 40<sup>2</sup>; para cada coleta foi utilizado um cone, esfregado no local por um minuto (BECKER et

---

<sup>1</sup> Noplak,<sup>®</sup> Laboratório Daudt Oliveira Ltda, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Endopoints Ind. Com. Ltda., RJ, Brasil

al., 1990) (Fig. 1). Em seguida, cada cone foi imediatamente colocado no interior de um tubo Eppendorf<sup>3</sup> conservado em gelo (Fig. 2), para conservar o material genético das espécies a serem submetidas à PCR. A seguir, as próteses foram limpas com escova e cuba ultrassônica contendo detergente enzimático<sup>4</sup> (Fig. 3), desinfetadas com solução de álcool-iodado a 0,02% e lavadas novamente para remover a solução. A região interna do implante foi desinfetada com álcool-iodado a 0,02% e depois lavada com água (Fig. 4). Após a coleta do material, limpeza e desinfecção, as próteses foram reposicionadas, recebendo vedação com a membrana de silicone<sup>5</sup> (Fig. 5) entre o pilar protético e o implante (Fig. 6). De acordo com o fabricante, essa membrana em placa é empregada em Medicina para uso em cicatrizes porque é macio, suavemente aderente, meio oclusivo, não contém carga elétrica, é permeável ao vapor d'água e impermeável a microrganismos, tem alta elasticidade e não é imunogênico nem tóxico. Outra vantagem constatada nos testes preliminares desta pesquisa é que seu excesso é removido com facilidade após ser colocado entre o pilar protético e o implante, reduzindo ainda mais a possibilidade de interferir na saúde dos tecidos perimplantares. Foram tomadas radiografias periapicais para confirmar o correto posicionamento das próteses (Fig. 7).

---

<sup>3</sup> Tubo Eppendorf, Millipore Ltda., SP, Brasil.

<sup>4</sup> Riozyme III E<sup>®</sup>, Rioquímica Ind. Com. Ltda., SP, Brasil.

<sup>5</sup> MEDGEL - gel de silicone, SILIMED<sup>®</sup>, RJ, Br.



**Figura 1** - Coleta, com cone de papel absorvente, das amostras bacterianas contidas na parte interna do implante.



**Figura 2** - Cones no interior de tubo Eppendorf, contendo amostras para serem analisadas por PCR.

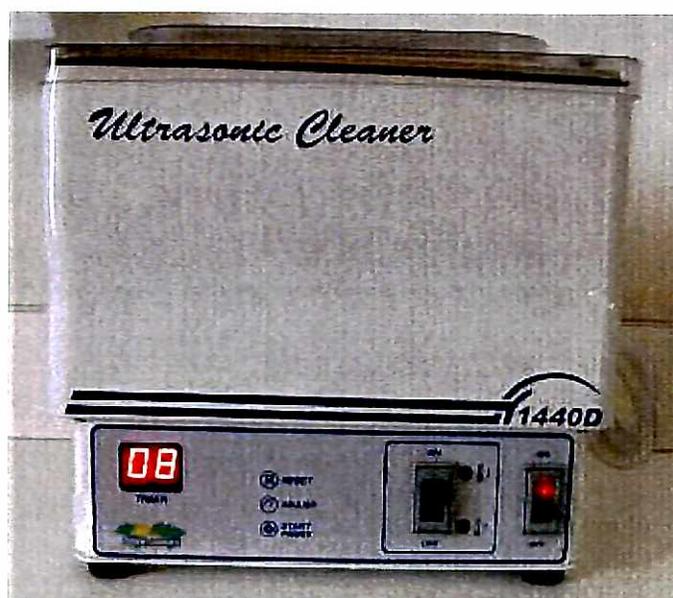
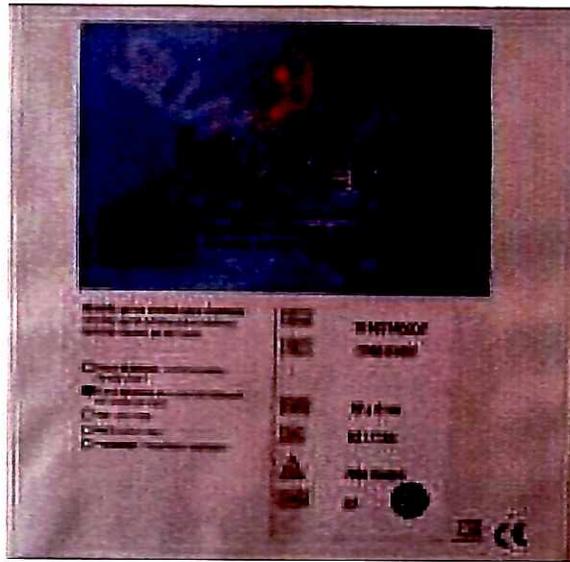


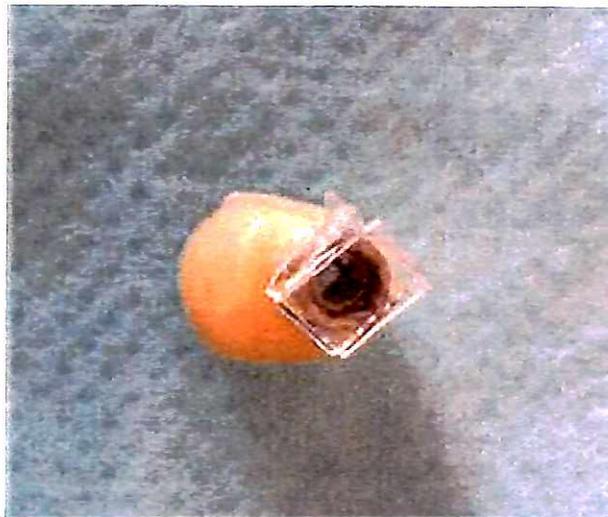
Figura 3 - Cuba ultrassônica.



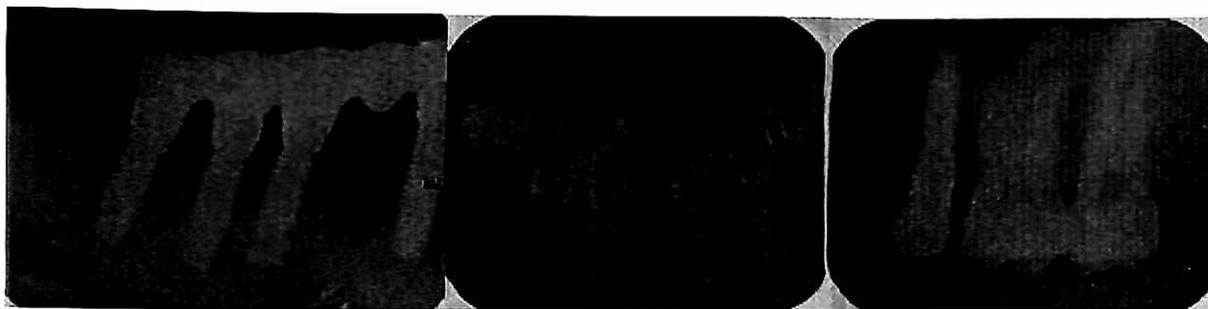
Figura 4 - Desinfecção da região interna dos implantes com álcool-iodado.



**Figura 5** - Embalagem do silicone comercial MEDGEL® SILIMED.



**Figura 6** - Prótese limpa e desinfetada com placa de silicone para ser conectada ao implante.



**Figura 7** - Radiografias periapicais confirmando a adaptação entre a coroa protética e o implante.

Novas coletas do material do interior dos implantes foram realizadas após 30 e 90 dias. Os cones de papel foram condicionados em tubos tipo Eppendorf de 2ml e conservados em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da extração do DNA, no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

#### **4.3 Extração dos DNA bacterianos**

A extração dos DNA das bactérias-alvo contidos nos materiais analisados foi realizada pela técnica da ligação à sílica em alta concentração de tiocianato de guanidina (GuSCN)<sup>6</sup>, descrita por Boom et al. (1990).

Aos tubos contendo os cones de papel foram adicionados 500 $\mu\text{l}$  de tampão L2 (GuSCN e Tris-HCL 0,1M, pH 6,4). Os tubos foram agitados por cinco segundos em

---

<sup>6</sup> Tiocianato de guanidina, Invitrogen Corporation, Germany

aparelho Vortex<sup>7</sup> (Fig. 8) e a 300 µl desta solução foram acrescentados 800µl de tampão L6 (GuSCN; Tris-HCL 0,1M, pH 6,4; EDTA 0,2M, pH 8,0 e Triton X-100) e 40µl de óxido de sílica com pH 2,0<sup>8</sup> (SiO<sub>2</sub> pH 2,0). Os tubos foram agitados em Vortex<sup>7</sup> e mantidos em temperatura ambiente por dez minutos. O complexo DNA-sílica foi recuperado após centrifugação a 12.000g x 15 segundos, após a qual o sobrenadante foi desprezado e ao qual foram acrescentados 1000µl de tampão L2. Este procedimento de lavagem foi repetido por duas vezes. Ao corpo de fundo foram acrescentados 1000µl de etanol a 70% V/V; os tubos foram agitados no Vortex, centrifugados a 12.000g x 15 segundos e o sobrenadante foi desprezado. Este procedimento foi repetido duas vezes sendo, então acrescentados 1000µl de acetona<sup>9</sup>, procedimento seguido de agitação no Vortex e centrifugação a 12.000g x 15 segundos. O sobrenadante foi desprezado e a amostra seca, com a tampa do tubo aberta a 56°C por dez minutos (Fig. 9). Após o acréscimo de 100µl de TE (Tris HCl<sup>10</sup> 10mM pH 7,4 e EDTA<sup>11</sup> 1mM pH 8,0), os tubos foram agitados e incubados a 56°C por dez minutos, com as tampas fechadas. Após este período os tubos foram novamente agitados e centrifugados a 12.000g x por dois minutos. O sobrenadante foi armazenado no congelador a -20°C até a quantificação em espectrofotômetro.

---

<sup>7</sup> Vortex, Scientific Industries, NY, USA.

<sup>8</sup> Óxido de Sílica, Invitrogen Corporation, Germany

<sup>9</sup> Acetona, Miyaco do Brasil, São Paulo, Brasil.

<sup>10</sup> Ácido clorídrico, Invitrogen Corporation, Brasil.

<sup>11</sup> EDTA Invitrogen Corporation, Germany.

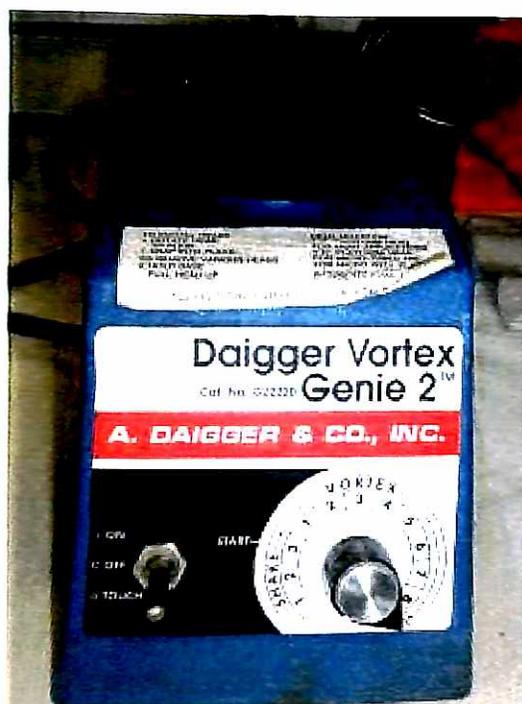


Figura 8 - Aparelho Vortex.



Figura 9 - Estufa utilizada para a secagem.

#### 4.4 Quantificação

A quantificação foi executada em espectrofotômetro Beckman DU<sup>®</sup> 640<sup>12</sup> (Fig. 10) com leitura em 260/280nm utilizando uma alíquota de 5µl de cada amostra em 995 µl de TE pH 8,0. A absorvência de 260nm equivale à quantidade de DNA e a de 280nm a de proteínas. A pureza dos extratos de DNA foi obtida pela razão de absorvência 260 nm/280 nm.

<sup>12</sup> Espectrofotômetro Beckman DU<sup>®</sup> 640, USA.



**Figura 10** - Espectrofotômetro Beckman DU<sup>®</sup> 640.

#### **4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Os DNA extraídos foram amplificados pela técnica da PCR utilizando-se iniciadores espécie-específicos (*primers*) (Fig. 11) baseados na seqüência do gene 16S rDNA de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythensis* (ASHIMOTO et al., 1996) (Quadro 1).

Microrganismo	Seqüência (5' -3')	Temperatura de anelamento (°C)	Peso molecular (pb)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC ATGCCAACTTGACGTTAAAT	57	557pb
<i>P. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG ACTGTTAGCAACTACCGATGT	62	404pb
<i>P. intermedia</i>	TTTGTGGGGAGTAAAGCGGG TCAACATCTCTGTATCCTGCGT	59	575pb
<i>T. forsythensis</i>	AGGCAATAGTTTTGAGGGCCAT TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	56	641pb

Legendas- A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina; pb: pares de bases.

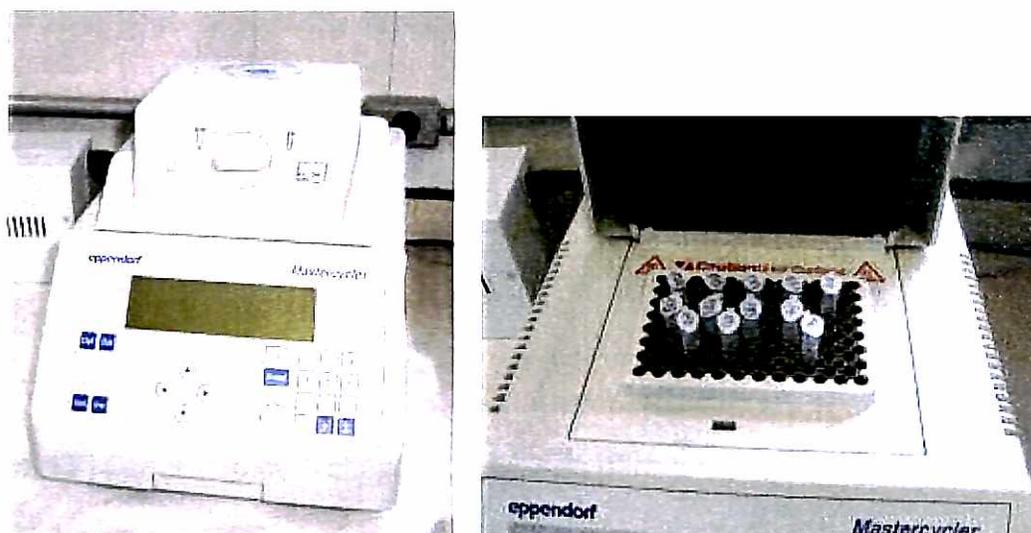
**Quadro 1** - Relação dos iniciadores espécie-específicos utilizados e dos fragmentos esperados.



**Figura 11** - Iniciadores de PCR espécie-específicos (*primers*) para *T. forsythensis*.

Todas as reações foram feitas em triplicata e executadas em tubos de 0,5ml para PCR adicionando-se tampão de PCR 1X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM)<sup>13</sup>, MgCl<sub>2</sub><sup>14</sup>, iniciadores senso e antisenso<sup>15</sup>, Taq DNA 2U<sup>16</sup>, 100-300ng de DNA genômico e água estéril para um volume final de 25µl.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador<sup>17</sup> (Fig. 12) e as condições de ciclagem da PCR foram otimizadas para os diferentes iniciadores. Como base foi utilizado um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 38 ciclos de desnaturação a 94°C durante um minuto, anelamento ao iniciador específico por 50 segundos, extensão a 72°C por um minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por sete minutos finalizou a reação.



**Figura 12** - Termociclador.

<sup>13</sup> PCR 1X (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM), Invitrogen Corporation, Germany.

<sup>14</sup> Cloreto de magnésio, Invitrogen Corporation, Germany.

<sup>15</sup> Iniciadores senso e antisenso, Invitrogen Corporation, Germany.

<sup>16</sup> Taq DNA 2U, Invitrogen Corporation, Germany.

<sup>17</sup> Termociclador, Eppendorf, Mastercycler, Germany

Em todas as reações foi utilizado um controle positivo (C+) e um negativo (C-), este constituído por todos os reagentes presentes na reação e isento de DNA. O resultado da reação foi visualizado por eletroforese do DNA amplificado (78 volts por 40 minutos) (Fig.13) em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (0,5g/ml)<sup>18</sup> (Fig.14) e utilizando-se uma cuba horizontal<sup>19</sup> com tampão de corrida TAE (Tris-acetato)<sup>20</sup> 1x, pH 8,1(Fig.15). Em todos os géis foi colocado, juntamente com as amostras a serem analisadas, um marcador de pares de base Low DNA Mass Ladder<sup>21</sup>, que representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000 a 100 pb.



**Figura 13** - Fonte elétrica (voltagem) utilizada para a corrida eletroforética.

o

<sup>18</sup> Brometo de etídio, Invitrogen Corporation, Germany.

<sup>19</sup> Cuba horizontal, OWL Scientific Plastics, Inc, USA.

<sup>20</sup> TAE (Tris-acetato), Invitrogen Corporation, Germany.

<sup>21</sup> Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corporation, Germany.



**Figura 14** - Gel de agarose a 2%.



**Figura 15** - Cuba horizontal com tampão de corrida TAE.

#### 4.6 Análise estatística

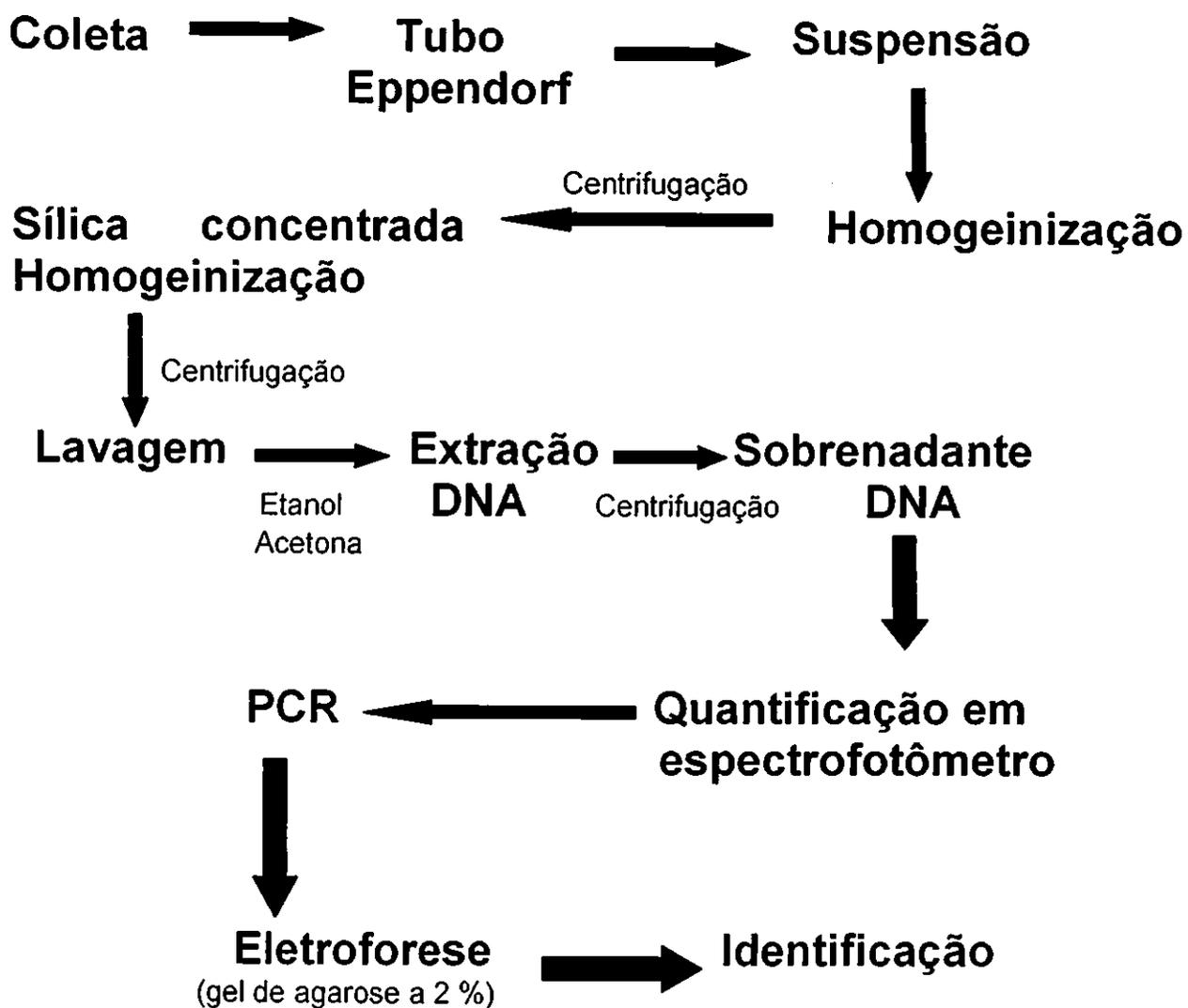
Os resultados estatísticos, obtidos pelo programa EPI INFO<sup>22</sup>, foram analisados pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates para estabelecer a diferença significativa das amostras coletadas 30 e 90 dias após a inserção da placa de silicone ( $p \leq 0,05$ ) em relação às iniciais. O estudo prospectivo analisou se houve ou não infiltração bacteriana, utilizando o cálculo do risco relativo (RR). De acordo com Haddad (2004), em estudos prospectivos da área de saúde deve-se utilizar um intervalo de confiabilidade de 95% para o cálculo do RR. Quando o limite inferior desse intervalo é superior a 1 (um) indica que o risco da ocorrência do problema analisado na amostra inicial é maior que nas subseqüentes (HADDAD, 2004).

O Fluxograma apresentado na página seguinte ilustra a seqüência dos procedimentos adotados desde a coleta do material até a identificação das espécies bacterianas por PCR.

---

<sup>22</sup> [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

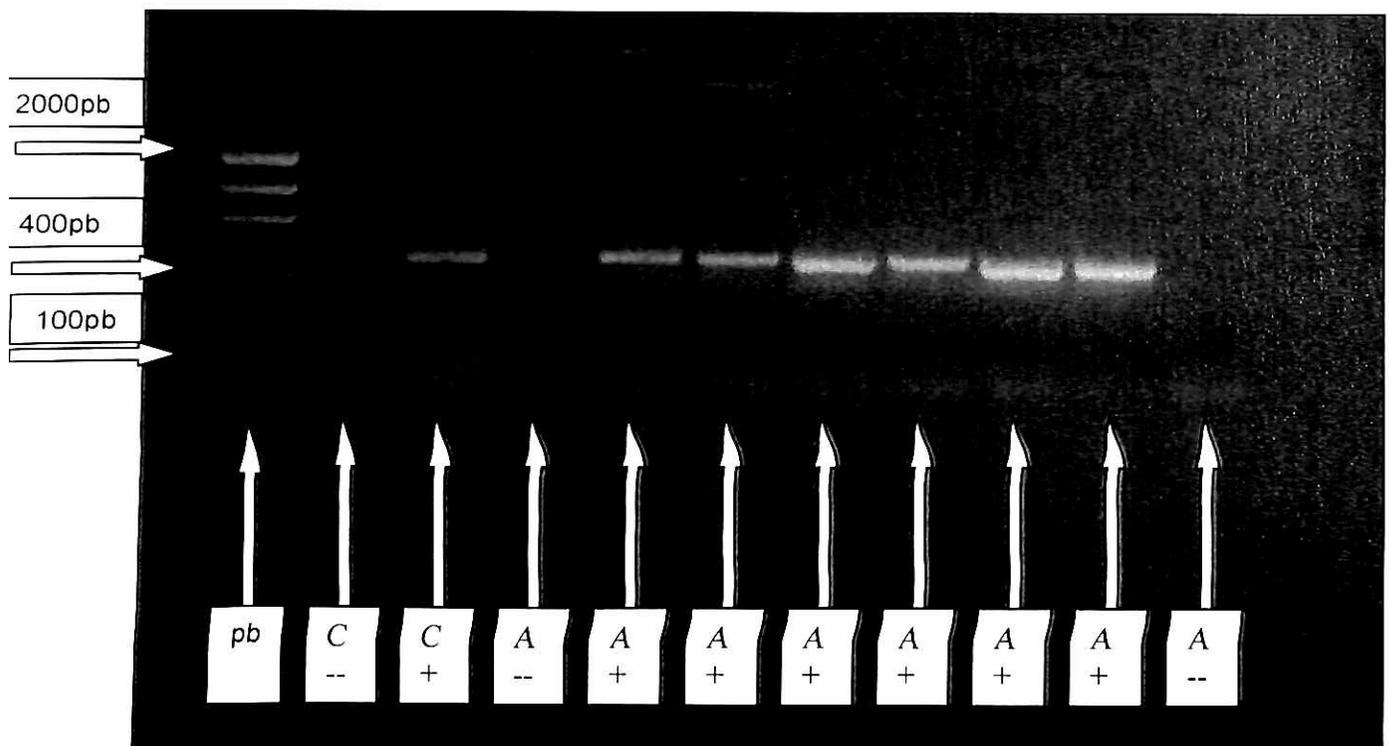
## FLUXOGRAMA



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise microbiológica

Os resultados obtidos pela PCR dirigida especificamente para *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Fig. 16) foram classificados como positivos (identificação do DNA da bactéria) ou negativos (ausência identificação do DNA da bactéria) e registrados em quadros individuais por espécies (Quadros 2 a 5).



Legenda: pb = pares de base; C - = controle negativo; C + = controle positivo; A + = amostra positiva; A - = amostra negativa.

**Figura 16** - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e observado em transiluminador ultravioleta, correspondente à espécie *Prevotella intermedia* 575pb.

O material genético de *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em quatro das 15 amostras iniciais e em três das coletadas 30 e 90 dias após a colocação da membrana de silicone (Quadro 2).

<i>A. actinomycetemcomitans</i>				
Paciente	Posição do implante na arcada dentária	Amostras coletadas antes da colocação da membrana de silicone	Amostras coletadas 30 dias após a colocação da membrana de silicone	Amostras coletadas 90 dias após a colocação da membrana de silicone
1	16	+	+	+
2	25	+	-	-
2	26	-	-	-
3	46	+	+	+
3	47	-	-	-
4	36	+	+	+
4	37	-	-	-
5	15	-	-	-
5	25	-	-	-
6	36	-	-	-
6	37	-	-	-
7	32	-	-	-
8	24	-	-	-
9	24	-	-	-
10	21	-	-	-

**Quadro 2** - Detecção, por PCR, do DNA de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 90 dias após a incorporação da membrana de silicone.

O material genético de *T. forsythensis* estava presente em nove das 15 amostras iniciais e em quatro das obtidas 30 e 90 dias após a colocação da membrana de silicone. É interessante ressaltar que a distribuição não foi uniforme, pois no implante 25 do paciente 5 esse material genético não foi detectado na amostra inicial, mas somente na coletada após 30 dias (Quadro 3).

<i>T. forsythensis</i>				
Paciente	Posição do implante na arcada dentária	Amostras coletadas antes da colocação da membrana de silicone	Amostras coletadas 30 dias após a colocação da membrana de silicone	Amostras coletadas 90 dias após a colocação da membrana de silicone
1	16	+	-	-
2	25	+	-	+
2	26	+	-	-
3	46	+	-	-
3	47	+	+	+
4	36	+	-	-
4	37	-	-	-
5	15	-	-	-
5	25	-	+	-
6	36	-	-	-
6	37	+	+	+
7	32	-	-	-
8	24	+	-	-
9	24	+	+	+
10	21	-	-	-

**Quadro 3** - Detecção, por PCR, do DNA de *Tannerella forsythensis* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 90 dias após a incorporação da membrana de silicone.

O DNA de *P. gingivalis* estava presente em cinco de 15 amostras iniciais, em cinco coletadas 30 dias após a colocação da membrana de silicone e em duas após 90 dias. É interessante ressaltar que no implante do paciente 1 esse material genético não foi detectado na amostra inicial, mas somente na coletada após 30 dias (Quadro 4).

<i>P. gingivalis</i>				
Paciente	Posição do implante na arcada dentária	Amostras coletadas antes da colocação da membrana de silicone	Amostras coletadas 30 dias após a colocação da membrana de silicone	Amostras coletadas 90 dias após a colocação da membrana de silicone
1	16	-	+	-
2	25	-	-	-
2	26	+	+	-
3	46	+	+	+
3	47	+	+	+
4	36	-	-	-
4	37	+	-	-
5	15	-	-	-
5	25	-	-	-
6	36	-	-	-
6	37	-	-	-
7	32	-	-	-
8	24	-	-	-
9	24	+	+	-
10	21	-	-	-

**Quadro 4** - Detecção, por PCR, do DNA de *Porphyromonas gingivalis* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 90 dias após a incorporação da membrana de silicone.

*P. intermedia* foi detectado em 12 das 15 amostras iniciais, mantendo-se em sete amostras coletadas 30 e 90 dias após a colocação da membrana de silicone (Quadro 5).

<b><i>P. intermedia</i></b>				
<b>Paciente</b>	<b>Posição do implante na arcada dentária</b>	<b>Amostras coletadas antes da colocação da membrana de silicone</b>	<b>Amostras coletadas 30 dias após a colocação da membrana de silicone</b>	<b>Amostras coletadas 90 dias após a colocação da membrana de silicone</b>
1	16	+	-	-
2	25	+	+	+
2	26	-	-	-
3	46	-	-	-
3	47	+	+	-
4	36	+	+	+
4	37	+	+	+
5	15	+	-	-
5	25	-	-	-
6	36	+	+	+
6	37	+	+	+
7	32	+	+	+
8	24	+	-	-
9	24	+	-	+
10	21	+	-	-

**Quadro 5** - Detecção, por PCR, do DNA de *Prevotella intermedia* em amostras coletadas de 15 micro-espacos pilar/implante antes, 30 e 90 dias após a incorporação da membrana de silicone.

## 5.2 Análise estatística

Os resultados da análise estatística estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

**Tabela 1-** Comparação entre a frequência de identificação de pelo menos uma das bactérias-alvo no material coletado do micro-espaco entre pilar protético e 15 implantes antes e 30 e 90 dias após a colocação da membrana de silicone.

	Frequência de pelo menos uma espécie-alvo nas amostras coletadas antes da colocação da membrana de silicone	Frequência de pelo menos uma espécie-alvo nas amostras coletadas 30 dias após a colocação da membrana de silicone	Frequência de pelo menos uma espécie-alvo nas amostras coletadas 90 dias após a colocação da membrana de silicone
Positividade	31 (52%)	19 (32%)	16 (27%)
Negatividade	29 (48%)	41 (68%)	44 (73%)
Total de amostras	60	60	60

A positividade verificada nas amostras iniciais foi de 52%, um valor estatisticamente diferente do encontrado nas amostras coletadas 30 e 90 dias após a inserção da membrana de silicone (32% e 27%, respectivamente).

**Tabela 2** - Relação de positividade e negatividade da identificação, por PCR, do DNA de espécies-alvo no material coletado do micro-espaco entre pilar protético e 15 implantes antes e 30 dias após a colocação da membrana de silicone. Análise pelo teste Qui-quadrado com correção de Yates e pela série de Taylor para estabelecer o cálculo do risco relativo no intervalo de confiabilidade de 95%.

	Freqüência de espécies-alvo nas amostras coletadas antes da colocação da membrana de silicone	Freqüência de espécies-alvo nas amostras coletadas 30 dias após a colocação da membrana de silicone	Risco relativo (RR) da ocorrência de infiltração de espécies-alvo	Intervalo de confiabilidade (95%)	Qui-quadrado Valor de p
Positividade	31	19	1,50	1,05<RR<2,13	0,04166697
Negatividade	29	41			

A infiltração das quatro bactérias-alvo, analisada pelo cálculo do RR, apresentou valor de 1,05 no limite inferior do intervalo de confiabilidade, indicando um risco relativo 1,5 vezes maior da presença de bactérias na amostra inicial em comparação com a verificada 30 dias após a aplicação da membrana de silicone. O valor do "p" do teste Qui-quadrado com correção de Yates (0,04166697) indica diferença significativa entre essas duas amostras.

**Tabela 3** - Relação de positividade e negatividade da identificação, por PCR, do DNA de espécies-alvo no material coletado do micro-espaco entre pilar protético e 15 implantes antes e 90 dias após a colocação da membrana de silicone. Análise pelo teste Qui-quadrado com correção de Yates e pela série de Taylor para estabelecer o cálculo do risco relativo no intervalo de confiabilidade de 95%.

	Freqüência de espécies-alvo nas amostras coletadas antes da colocação da membrana de silicone	Freqüência de espécies-alvo nas amostras coletadas 90 dias após a colocação da membrana de silicone	Risco relativo (RR) da ocorrência de infiltração de espécies-alvo	Intervalo de confiabilidade (95%)	Qui-quadrado Valor de p
Positividade	31	16	1,66	1,17<RR<2,35	0,008386
Negatividade	29	44			

A infiltração das quatro bactérias-alvo, analisada pelo cálculo do RR, apresentou valor de 1,17 no limite inferior do intervalo de confiabilidade, indicando que acontece um RR 1,66 vezes maior de haver bactérias na amostra inicial quando comparado com o verificado nas amostras coletadas 90 dias após a aplicação da membrana de silicone. O valor do "p" do teste Qui-quadrado com correção de Yates (0,008386) indica que houve diferença significativa entre essas duas amostras.

**Tabela 4** – Relação de positividade e negatividade da identificação, por PCR, do DNA de espécies-alvo no material coletado do micro-espaco entre pilar protético e 15 implantes 30 e 90 dias após a colocação da membrana de silicone. Análise pelo teste Qui-quadrado com correção de Yates e pela série de Taylor para estabelecer o cálculo do risco relativo no intervalo de confiabilidade de 95%.

	Frequência de espécies-alvo nas amostras coletadas 30 dias após a colocação de membrana de silicone	Frequência de espécies-alvo nas amostras coletadas 90 dias após a colocação de membrana de silicone	Risco relativo (RR) da ocorrência de infiltração de espécies-alvo	Intervalo de confiabilidade (95%)	Qui-quadrado Valor de p
Positividade	19	16	1,33	0,77<RR<1,64	0,6879216
Negatividade	41	44			

A infiltração das quatro bactérias-alvo, analisada pelo cálculo do RR, apresentou valor de 0,77 no limite inferior do intervalo de confiabilidade, indicando que neste caso ele foi semelhante ao das amostras colhidas 30 e 90 dias após a inserção da placa de silicone. O valor do “p” do teste Qui-quadrado com correção de Yates (0,6879216) indica que não houve diferença significativa entre essas amostras.

## 6 DISCUSSÃO

A partir dos trabalhos pioneiros de Quirynen e van Steenberghe (1993) e Traversy e Birek (1992), tomamos conhecimento da ocorrência de infiltração bidirecional de fluido e bactérias na interface do conjunto pilar/implante. A infiltração pode estar relacionada a fatores como o torque aplicado, a adaptação dos componentes, a estabilidade do parafuso de fixação da prótese e a carga mastigatória recebida (CALLAN; COBB; WILLIAMS, 2005; GROOS; ABRAMOVICH; WEISS, 1999; JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; PERSSON et al., 1996; STEINEBRUNNER et al., 2005; VIDIGAL Jr et al., 1995). Como resultado dessa infiltração são produzidos odor e sabor desagradáveis (MCCARTHY; GUCKES, 1993), as únicas manifestações clínicas comprovadas. Mas como existe a possibilidade do retorno de patógenos para o biofilme perimplantar, alguns pesquisadores sugeriram que assim pode aumentar o risco de inflamação dos tecidos perimplantares (GROSS; ABRAMOVICH; WEISS, 1999) e até de comprometimento da estabilidade do implante (CRAVINHOS, 2003). No entanto, de acordo com Quirynen; de Soete e van Steenberg (2002), não existem evidências de relação com o desencadeamento de perimplantite.

Apesar da importância desse tema, nosso levantamento bibliográfico mostra que foi publicado apenas cerca de um trabalho por ano a respeito da microbiota instalada entre os componentes dos implantes dentais. Algumas dessas pesquisas foram efetuadas *in vivo* (CALLAN; COBB, WILLIAMS, 2005; FERRARI, 2004; GROENENDIJK et al., 2004; KELLER; BRAGGER; MOMBELLI, 1998; OLIANI, 2004; PERSSON et al., 1996; PIATTELLI et al., 2001; QUIRYNEN et al., 1994; RIMONDINI et al., 2001),

enquanto outras o foram *in vitro* (CRAVINHOS, 2003; JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; PIATELLI et al., 2001; PROFF et al., 2006; QUIRYNEN et al., 1994; STEINEBRUNNER et al., 2005).

Por outro lado, chamou nossa atenção a precariedade de pesquisas destinadas a encontrar métodos para evitar a infiltração de bactérias patogênicas entre o implante e seus componentes protéticos. A esse respeito, merece destaque o esforço exercido por pesquisadores brasileiros advindos do Mestrado em Implantodontia da Universidade de Santo Amaro, UNISA, orientados por De Lorenzo (FERRARI, 2004; OLIANI, 2004), que tentaram inibir, sem sucesso, a sobrevivência de bactérias nesses espaços pela colocação de solução de clorexidina a 2%.

Proff et al. (2006) relataram que, *in vitro*, a gutapercha não conseguiu vedar esses microvalamentos nas 24 horas que sucederam sua colocação.

Apesar de suas dimensões micrométricas (2 a 7 $\mu$ m conforme Piatelli et al. (2001)), esses microvalamentos permitem a passagem de células bacterianas, cujos diâmetros nos cocos ou larguras nos bacilos são ainda mais diminutos. Conforme dados apresentados na Revisão da Literatura, a célula de *A. actinomycetemcomitans* mede em média 0,4 por 1 $\mu$ m, a de *P. gingivalis* 0,5 por 1 a 2 $\mu$ m, a de *P. intermedia* 0,4 a 1,5 por 1,5 a 2 $\mu$ m e a de *T. forsythus* 0,3 a 0,4 por 1 a 5 $\mu$ m. O vedamento desses espaços por barreiras físicas como a película de silicone teoricamente poderia impedir a infiltração de bactérias, motivo pelo qual resolvemos testar essa possibilidade.

Até onde nos foi possível encontrar na literatura odontológica, os únicos pesquisadores que anteriormente tentaram vedar esse micro-espaço usando selamento com membrana de silicone foram Rimondini et al. (2001). Seus resultados não podem ser integralmente cotejados com os nossos, pois não se preocuparam com a

identificação das espécies que ocuparam essa região. A conclusão desses pesquisadores foi que embora tenha reduzido a frequência de bactérias, a camada de silicone não impediu a sua infiltração. Nossos resultados estatísticos confirmam essa assertiva, pois os valores de  $p$  demonstraram diferença significativa entre as amostras coletadas antes, 30 e 90 dias após a colocação da placa de silicone. O mesmo ocorreu com o risco relativo, que evidenciou maior presença de bactérias nas iniciais, sugerindo que embora a barreira mecânica não tenha impedido a infiltração das bactérias-alvo, conseguiu reduzir o risco de de sua ocorrência.

A infiltração de patógenos pode ter limitada relevância clínica diante dos bons resultados a longo prazo dos implantes do tipo Bränemark (QUIRYNEN; DE SOETE; VAN STEENBERGHE, 2002), pelo fato de a doença não estar relacionada apenas com a presença qualitativa da bactéria. Conforme De Lorenzo (2004), residentes em uma microbiota são as espécies quase sempre nela presentes e, que de acordo com sua frequência, são classificadas como indígenas ou como suplementares. A espécie residente é considerada indígena quando existe em altos números na microbiota, em proporção maior do que 1% do total de microrganismos. A espécie residente é considerada suplementar quando ocorre em baixos números, ou seja, inferiores a 1%; nesse grupo estão inseridas bactérias patogênicas como os estreptococos do grupo *mutans*, lactobacilos, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*, *Treponema denticola* e outras, cujos números só aumentam se houver considerável alteração ambiental. Assim, não é raro o encontro dessas espécies mesmo em sítios sadios, como os analisados em todos os pacientes selecionados para esta pesquisa.

A falha dos recursos pesquisados até então no sentido de vedar os microvalamentos entre o pilar e seus acessórios protéticos (FERRARI, 2004; OLIANI, 2004; PROFF et al., 2006; RIMONDINI et al., 2001), aliada ao resultado da presente pesquisa, deve estimular pesquisadores e fabricantes a realizar novos estudos com essa finalidade.

## 7 CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais do presente estudo, pode-se concluir que a colocação de placa de silicone no micro-espaco existente entre o pilar protético e o implante de hexágono externo não foi suficiente para impedir a infiltração de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Prevotella intermedia*.

**REFERENCIAS<sup>23</sup>**

ASHIMOTO, A. et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 11, n. 4, p. 266-273, Aug. 1996.

BECKER, W. et al. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 5, n. 1, p. 31-38, Spring 1990.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.

BROGGINI, N. et al. Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 82, n. 3, p. 232-237, Mar. 2003.

CALLAN, D. P.; COBB, C. M.; WILLIAMS, K. B. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface- a preliminary study. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 76, n. 1, p. 115-120, Jan. 2005.

CRAVINHOS, J. C. **Análise *in vitro* da contaminação bacteriana na interface Implante/conector protético em três sistemas de implantes endósseos.** 2003. 78 f. (Dissertação em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais). Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003.

DE LORENZO, J. L. O Ecosistema Bucal. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 5, p. 55-72.

DE LORENZO, J. L.; CAVENAGUE, M. Microbiologia Perimplantar. In: DE LORENZO, J. L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 10, p. 151-162.

---

<sup>23</sup> De acordo com a NBR 14724 e NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002. Abreviaturas dos Periódicos segundo "Index to Dental Literature" e Seriadados em Ciências da Saúde (SECS).

DE LORENZO, J. L.; MAYER, M. P. A. Microbiologia Periodontal. In: DE LORENZO, J. L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 9, p. 127-150.

DOTTORI, R. H. G.; SENDYK, W. R.; GROMATZKY, A. A importância da colonização bacteriana na união entre implantes dentários e pilares intermediários. **Rev. Odontol. Univ. Santo Amaro**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 37-44, jan-jun. 2003.

FERRARI, R. B. **Identificação de patógenos periodontais na região interna de implantes bucais de hexágono externo e avaliação da eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle dessa microbiota**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2004.

GROENENDIJK, E. et al. Microbiological and clinical effects of chlorhexidine enclosed in fixtures of 3I-Titamed implants. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 15, p. 174-179, 2004.

GROSS, M.; ABRAMOVICH, I.; WEISS, E. I. Microleakage at the abutment - implant interface of osseointegrated implants - a comparative study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 14, n. 1, p. 94-100, Feb. 1999.

HADDAD, N. Delineamento de Estudos Analíticos. In: \_\_\_\_\_. **Metodologia e Estudos em Ciências da Saúde: Como Planejar, Analisar e Apresentar o Trabalho Científico**. São Paulo: Roca, 2004. cap. 6, p. 60.

JANSEN, V. K.; CONRADS, G.; RICHTER, E. J. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 12, n. 4, p. 527-540, July-Aug. 1997.

KELLER, W.; BRAGGER, U.; MOMBELLI, A. Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 209-217, Aug. 1998.

LEKHOLM, U. et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (II) A cross-sectional retrospective study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 15, n. 1, p. 53-61, Feb. 1986.

MAYER, M. P. A.; DE LORENZO, J. L. Métodos de Estudo em Microbiologia Oral. In: DE LORENZO, J. L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 4, p. 43-53.

MCCARTHY, G. R.; GUCKES, A. D. Preventing bacterial colonization associated with two types of implant abutments. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 70, n. 5, p. 479, Nov. 1993.

MOMBELLI, A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 28, p. 177-189, 2002.

OLIANI, D. **Avaliação da eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle do desenvolvimento de periodontopatógenos na interface coroa-pilar protético em próteses dentais parafusadas sobre implantes**. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2004.

ORSINI, G. et al. Tissue reactions, fluids, and bacterial infiltration in implants retrieved at autopsy- a case report. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 15, n. 2, p. 283-286, Mar.-Apr. 2000.

PERSSON, L. G. et al. Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark system implant components. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 90-95, June 1996.

PIATTELLI, A. et al. Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 72, n. 9, p. 1146-1150, Sept. 2001.

PROFF, P. et al. Bacterial colonisation of interior implant threads with and without sealing. **Folia Morphol. (Warsz)**, Warsaw, v. 65, n. 1, p. 75-7, Feb. 2006.

QUIRYNEN, M.; DE SOETE, M.; VAN STEENBERGHE, D. Infectious risks for oral implants- a review of the literature. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 1-19, Feb. 2002.

QUIRYNEN, M. et al. Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. An in vitro study. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 239-244, Dec. 1994.

QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 4, n. 3, p. 158-161, Sept. 1993.

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

SLOTS, J. et al. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 20, n. 2, p. 304-307, June 1995. Suppl.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 28, p. 12-55, 2002.

STEINEBRUNNER, L. et al. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 20, n. 6, p. 875-881, Nov.- Dec. 2005.

TANNER, A.; STILLMAN, N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria- clinical features, predominant pathogens, and treatment. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 16, n. 4, p. 304-309, June 1993. Suppl.

TRAVERSY, M. C.; BIREK, P. Fluid and microbial leakage of implant abutment assembly in vitro. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 71, p. 754, 1992. Abstract 1909.

VIDIGAL JR, G. M. et al. Evaluation of the implant-connection interface using scanning electron microscopy. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 1, p. 17-23, 1995.

## **ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido**

### **Carta de informação**

1. Esta carta tem como finalidade esclarecê-lo(a) sobre sua participação voluntária neste estudo, com procedimentos a serem realizados durante o desenvolvimento desta pesquisa.
2. A finalidade deste trabalho é desenvolver o vedamento entre pilar protético e implante de forma a evitar o desenvolvimento bacteriano presente neste espaço, melhorando o prognóstico na reabilitação com implantes dentários.
3. Relação dos procedimentos a serem realizados-
  - 3.1. Seleção dos pacientes mediante a exames clínicos e radiográficos.
    - Pacientes sob a ação farmacológica de medicamentos (antibióticos) que possam promover interação medicamentosa com os cultivos bacteriológicos e PCR não poderão compor neste estudo.
  - 3.2. Profilaxia com taça de borracha, pedra pomes e bochecho com solução de clorexidina a 0,12%
  - 3.3. Remoção das coroas parafusadas, limpeza e desinfecção
  - 3.4. Coleta de material da parte interna do implante com cone de papel
  - 3.5. Um dos implantes e sua coroa receberão enchimento com placa de silicone.
  - 3.6. O outro implante servirá de controle e não receberá nenhum complemento.
  - 3.7. As amostras serão enviadas para o Laboratório afim de serem analisadas quanto à presença de bactérias.
  - 3.8. Os tópicos acima serão repetidos decorridos 30 e 90 dias.

4. Desconforto e riscos esperados nos procedimentos - o possível risco está relacionado ao parafuso de fixação e a readaptação da prótese que será controlada através de radiografias durante as sessões de coleta.
5. Benefícios para o participante - o paciente receberá a profilaxia dos dentes nas duas sessões de coleta das amostras e a limpeza interna dos implantes.
6. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é **Saul Galileu Sartori**, que pode ser encontrado no endereço da instituição. Qualquer dúvida sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP - UNISA), Rua Professor Enéas de Siqueira Neto, 340 Jd das Embuias, SP - Fone (11) 55458811,
7. É garantida a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, da sua participação do estudo, sem qualquer prejuízo do paciente.
8. Serão mantidas a privacidade e a identidade dos pacientes participantes.
9. Os pacientes terão o direito aos resultados parciais da pesquisa quando em estudos abertos ou do conhecimento dos pesquisadores.
10. Não há despesas pessoais em qualquer fase do estudo, bem como não há compensação financeira relacionada com sua participação,
11. Em casos de dano pessoal diretamente ocasionado pelos procedimentos efetuados (nexo causal comprovado) o participante tem o direito a tratamento para a sua reparação.

## ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim (Carta de Informação ao Paciente) descrevendo a **“Avaliação da infiltração de bactérias periodontopatogênicas no micro-espaco entre pilar protético e implante dentário vedado por gel de silicone”**. Eu discuti com o pesquisador Saul Galileu Sartori sobre a minha decisão em participar nesse grupo de estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou até mesmo no meu atendimento neste serviço.

São Paulo, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006

\_\_\_\_\_ data \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_ data \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_  
(Nome e RG)

\_\_\_\_\_ data \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha  
\_\_\_\_\_  
(Nome e RG)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_ data \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_  
Saul Galileu Sartori, CD  
CROSP 24.292



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
Comitê de Ética em Pesquisas  
Registro CONEP n.º 306  
Aprovado em 16/05/2000

## PARECER N.º 012/2006

REGISTRO CEP UNISA N.º 060/06

**Projeto de Pesquisa:** “Avaliação da infiltração de bactérias periodontopatogênicas no microespaço entre pilar protético e implante dentário vedado por gel de silicone.”

**Pesquisadores Responsável:** Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo

Pós –Graduando: Saul Galileu Sartori

**Área Temática Especial:** Odontologia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa, avaliação da infiltração de bactérias periodontopatogênicas no microespaço entre pilar protético e implante dentário vedado por gel de silicone.

São Paulo, 08 de março de 2006

**PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas  
UNISA - Universidade de Santo Amaro

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte e comunicado ao autor a referência da citação.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

Assinatura- \_\_\_\_\_