

Dr. Milton Jordani Aronso
POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR),
PRESENÇA DOS PATÓGENOS PORPHYROMONAS
GINGIVALIS, TREPONEMA DENTICOLA E TANNERELLA
FORSYTHENSIS EM SULCOS GENGIVAIS, BOLSAS
PERIODONTAIS E SULCOS PERIMPLANTARES
EM MESMOS PACIENTES

B0122734

U617.69 A76a 2004 ex.1

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NILSON ROBERTO ARMENTANO

ANÁLISE, POR REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR), DA PRESENÇA DOS
PATÓGENOS *Porphyromonas gingivalis*,
Treponema denticola e *Tannerella forsythensis*
EM SULCOS GENGIVAIS, BOLSAS
PERIODONTAIS E SULCOS PERIMPLANTARES
EM MESMOS PACIENTES

SÃO PAULO

2004

UNISA - Universidade Santo Amaro
Biblioteca Campus I

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NILSON ROBERTO ARMENTANO

ANÁLISE, POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), DA PRESENÇA DOS PATÓGENOS *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis* EM SULCOS GENGIVAIS, BOLSAS PERIODONTAIS E SULCOS PERIMPLANTARES DOS MESMOS PACIENTES

SÃO PAULO

2004

NILSON ROBERTO ARMENTANO

ANÁLISE, POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), DA PRESENÇA DOS PATÓGENOS *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis* EM SULCOS GENGIVAIS, BOLSAS PERIODONTAIS E SULCOS PERIMPLANTARES DOS MESMOS PACIENTES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação, nível de Mestrado, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE LORENZO

Co-orientador: Prof. Dr. MARIO JULIO AVILA-CAMPOS

SÃO PAULO

2004

B..... B0122734
Class..... V.617.69
Cutter..... A76a
Patri nº..... 3835
Tipo entrada..... UDACIN
Nota Fiscal.....
Data rec..... 23/10/05
Preço.....
Origem.....
Dep.....

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

Armentano, Nilson Roberto

A76a Análise, por reação em cadeia da polimerase (PCR), da presença dos patógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythesis* em sulcos gengivais, bolsas periodontais e sulcos perimplantares dos mesmos pacientes /

Nilson Roberto Armentano. Orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo. -- São Paulo: 2004.

63 p.

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

1. Bactérias
2. Implantes Dentários
3. Microbiologia
4. Reação em Cadeia da Polimerase I. Título

NILSON ROBERTO ARMENTANO

ANÁLISE, POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), DA PRESENÇA DOS PATÓGENOS *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis* EM SULCOS GENGIVAIS, BOLSAS PERIODONTAIS E SULCOS PERIMPLANTARES DOS MESMOS PACIENTES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação, nível de Mestrado, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Implantodontia

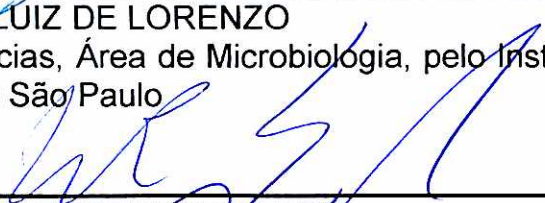
APROVADA EM 18 / 10 / 2004

BANCA EXAMINADORA:



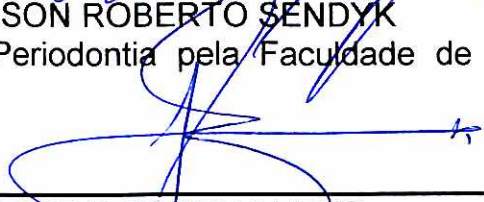
Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE LORENZO

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



Prof. Dr. WILSON ROBERTO SENDYK

Doutor em Periodontia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



Prof. Dr. LAURINDO BORELLI NETO

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

CONCEITO FINAL: 10,0 OBSERVAÇÃO: Distinção e Louvor

DEDICATÓRIA

À minha esposa RENATA, que com seu apoio e amor incondicionais me fortalece para compartilhar de todas as minhas conquistas.

Às minhas adoráveis filhas CATARINA e GIOVANA, frutos de amor e razão da minha vida.

Aos meus pais ROBERTO e ANA por terem alicerçado bases sólidas de educação, respeito e responsabilidade.

*“TEUS OMBROS SUPORTAM O MUNDO E ELE NÃO PESA MAIS
QUE A MÃO DE UMA CRIANÇA”*

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A DEUS por guiar meu caminho e iluminar minha vida.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE LORENZO que com sua excepcional capacidade de educar me incentivou e guiou com sabedoria a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. MARIO JULIO AVILA-CAMPOS pela sua atenção, dedicação e orientação na execução de toda a parte experimental.

Ao Prof. Dr. WILSON ROBERTO SENDYK pela oportunidade e confiança em mim depositada ao longo da minha carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. G. C. GENOFRE pelo empenho e dedicação com que conduziu a minha capacitação docente.

Aos meus grandes amigos de MESTRADO que com atitudes dignas de irmãos me ajudaram a transpor as dificuldades. MEU MUITO OBRIGADO.

À SABRINA MORAIS e JULIANA OLIVEIRA pela eficiência e dedicação.

À LUCIANA COSTA pelo seu empenho e presteza na parte bibliográfica.

RESUMO

Em função do reconhecimento da participação das bactérias que constituem o complexo vermelho do biofilme subgengival (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis*) na etiopatogenia da periodontite crônica e da perimplantite, o objetivo deste trabalho é avaliar sua ocorrência em sulcos gengivais, bolsas periodontais e sulcos perimplantares dos mesmos pacientes. Foram selecionados para este estudo cinco pacientes parcialmente desdentadas portadoras de um ou mais implantes dentais. As coletas foram feitas com pontas de papel absorvente esterilizadas em três sítios de cada paciente: num sulco gengival sadio (controle), numa bolsa periodontal com profundidade de sondagem igual ou superior a cinco milímetros e num sulco perimplantar sem sinais clínicos de perimplantite. A análise da presença dos três patógenos nessas amostras foi realizada por método PCR (reação em cadeia da polimerase) em função de seus resultados rápidos, alta sensibilidade e especificidade e possibilidade de identificação de microrganismos dificilmente cultiváveis ou até mesmo não cultiváveis. Em adição, cultivos em ágar-sangue foram utilizados para determinar os morfotipos bacterianos presentes nas amostras analisadas. Os DNA dos três patógenos estudados não foram detectados em duas amostras de sulco gengival; o de *P. gingivalis* foi identificado em três amostras, sendo duas não diluídas e uma diluída até 10^{-2} e o de *T. forsythensis* em uma amostra não diluída. Em nenhuma dessas amostras foi evidenciada a presença conjunta das três espécies. Com relação às amostras coletadas de cinco bolsas periodontais, em três delas foram identificados os DNA das três espécies-alvo, em uma os DNA de *P. gingivalis* e *T. forsythensis* e, na outra, os de *P. gingivalis* e *T. denticola*. A presença desses patógenos foi detectada em amostras com diluições

variáveis entre 10^{-1} a 10^{-4} , indicando maiores frequências do que as verificadas nos sulcos-controle. Apesar da presença em sítios periodontais, não foi encontrado o DNA de nenhuma das espécies-alvo em nenhum dos sítios perimplantares, embora tenha ocorrido sangramento à sondagem em quatro deles. Nossos resultados confirmam que o método PCR é de grande valia na detecção de patógenos periodontais, possibilitando um diagnóstico microbiológico aplicável tanto na análise de risco de doença quanto na sua confirmação. Confirmam, também, estudos que sugeriram que a ocorrência de patógenos em sítios periodontais pode implicar em risco de doença perimplantar, justificando que o controle do biofilme dental, notadamente em pacientes parcialmente desdentados, deve passar a ser mais rigoroso.

Palavras chave: bactérias, implantes dentários, microbiologia, reação em cadeia da polimerase

ABSTRACT

Bacteria (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythensis*) composing the red complex of subgingival biofilm have been recognized as participators in the pathogenesis of chronic periodontitis and peri-implant inflammation. The present work intends to evaluate their occurrence in healthy and pathologic periodontal sites, as well as in peri-implant sites of the same patients. Five partially edentulous patients who had one or more dental implants, were selected for the study. Collections were performed by soaking sterilized absorbent points in three sites: a healthy periodontal sulcus (control), a 5 mm or deeper periodontal pocket, and a peri-implant site, free from periimplantitis clinical signs. Presence of these three pathogens was investigated by PCR (polimerase chain reaction) method, as it provides fast results, has high sensitivity and distinctiveness, and makes possible the identification of microorganisms that are hardly cultivable or, even though, non-cultivable. Furthermore, agar-blood cultivations were used to figure which bacterial morphotypes were present in the samples. In two samples from gingival sulcus no DNA from the three pathogens was found; *P. gingivalis* DNA was detected in three samples, two non-diluted and one diluted to 10^{-2} ; *T. forsythensis* DNA was found in one non-diluted sample. None of these samples demonstrated mutual presence of the three species. Samples were collected from five periodontal pockets, three of them had DNA identification for the three species; one presented DNA from *P. gingivalis* and *T. forsythensis*; and another presented DNA from *P. gingivalis* and *T. denticola*. These pathogens were detected in samples with variable dilutions, from 10^{-1} to 10^{-4} , which indicates frequencies higher than those observed in the controls. Instead of

being present in periodontal sites, no DNA, from any specie, was found in peri-implant sites, although bleeding has been noticed in four of those sites during probing. Results confirm that PCR method is useful in detecting periodontal pathogens, allowing an applicable microbiological diagnosis, either for the analysis of disease risk, or for its confirmation. They also corroborate studies suggesting that pathogens occurrence in periodontal sites may imply in risk of peri-implant disease, which justify the need of more rigorous supervision on dental biofilm, particularly for partially edentulous patients.

Key words: bacteria, dental implants, microbiology, polimerase chain reaction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fluxograma 42
- Figura 2 - Desenvolvimento bacteriano obtido em ágar-sangue, a partir de amostras não diluídas. B: bolsa periodontal, C: controle (sulco gengival sadio) e I: sulco perimplantar 43
- Figura 3 - Amplificação por PCR do DNA de *T. forsythensis* detectado em amostras clínicas 48
- Figura 4 - Amplificação por PCR do DNA de *P. gingivalis* detectado em amostras clínicas 48
- Figura 5 - Amplificação por PCR do DNA de *T. denticola* detectado em amostras clínicas 48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Iniciadores específicos, temperaturas de anelamento e produtos amplificados utilizados no teste PCR para as bactérias-alvo deste estudo 40
- Tabela 2 - Dados relativos às regiões dos sítios examinados, aos parâmetros clínicos analisados (profundidade de sondagem e sangramento à sondagem), ao hábito de tabagismo, à idade dos pacientes e aos morfotipos das bactérias cultivadas diretamente das amostras coletadas desses sítios 44
- Tabela 3 - Resultados das detecções, pela reação em cadeia de polimerase (PCR), dos DNA de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis* contidos nos materiais analisados não diluídos e em diferentes diluições 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: di-nucleotídeo fosfato (mistura de oligonucleotídeos)

g: gravidade

kb: quilobase

MgCl₂: cloreto de magnésio

ml: mililitro

mM: milimolar

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

Taq: *Termophilus aquaticus*

U: unidade

V: volt (voltagem)

°C: grau Celsius

μl: microlitro

μM: micromolar

μg: micrograma

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 6 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 17 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODO | 37 |
| 4.1 Seleção de Pacientes | 37 |
| 4.2 Exame Clínico | 37 |
| 4.3 Coleta Microbiológica | 38 |
| 4.4 Processamento Laboratorial | 38 |
| 4.4.1 Cultivos Bacterianos | 38 |
| 4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase | 39 |
| 4.4.2.1 Extração dos DNA Bacterianos | 39 |
| 4.4.2.2 Amplificação dos DNA Bacterianos | 39 |
| 4.4.2.3 Detecção dos Produtos de Amplificação | 40 |
| 5 RESULTADOS | 43 |
| 6 DISCUSSÃO | 49 |
| 7 CONCLUSÕES | 55 |
| REFERÊNCIAS | 56 |
| ANEXO A | 61 |
| ANEXO B | 62 |
| ANEXO C | 63 |

1 INTRODUÇÃO

Na Odontologia moderna é indiscutível a eficácia da utilização de implantes osseointegrados como opção de tratamento para repor dentes perdidos ou otimizar o tratamento odontológico, com o objetivo de devolver melhor forma e função ao sistema estomatognático.

O conceito da osseointegração instituído por Branemark et al. (1969) permitiu a reabilitação bucal de pacientes totalmente desdentados com próteses sustentadas por implantes endósseos de titânio, tendo como princípio a obtenção de uma conexão direta, estrutural e funcional entre o leito receptor e a superfície do implante (ADELL et al., 1981). Os tecidos de suporte devem ser compatíveis com o estado de saúde, permitindo o sucesso clínico por longos períodos de tempo (ADELL et al., 1981; ALBREKTSSON, 1986; ERICSSON et al., 1986; VAN STEENBERGHE, 1988). Durante o primeiro ano após a instalação do pilar intermediário (segunda fase cirúrgica) considera-se aceitável uma perda óssea (remodelação) de até 2 mm e, após esse período, de 0,1 mm por ano (ADELL et al., 1986; ALBREKTSSON et al., 1986).

Em função do grande índice de sucessos, foi inevitável a extrapolação para reabilitar pacientes parcialmente desdentados. Os critérios de sucesso definidos por Albrektsson et al. (1986) são imobilidade do implante, ausência radiográfica de áreas com reabsorção óssea, ausência de inflamação, dor ou parestesia, sucesso em 85% dos casos após cinco anos e em 80% dos casos após dez anos.

Apesar do alto índice de sucesso obtido até os dias atuais, ainda ocorrem alguns insucessos. Seus principais fatores estariam relacionados com o trauma

cirúrgico, inadequado controle da temperatura durante a instalação do implante, quantidade e qualidade óssea, sobrecarga oclusal, parafunções e atividade de bactérias periodontopatogênicas (BECKER et al., 1990).

No aspecto microbiológico, observa-se grande semelhança na microbiota associada a dentes naturais e aos implantes colocados em pacientes parcialmente desdentados. Nas condições de saúde ocorre predominância de cocos e bacilos Gram positivos anaeróbios facultativos e imóveis, enquanto na doença predominam bacilos Gram negativos anaeróbios estritos e espiroquetas (QUIRYNEN; LISTGARTEN, 1990; RAMS et al., 1984; ROSENBERG; TOROSIAN; SLOTS, 1991).

Esta transição ou sucessão bacteriana costuma ocorrer em função do aumento do fluxo de exsudato gengival, que acarreta aumento do nível local de proteínas, favorecendo o predomínio de espécies bacterianas dotadas de metabolismo essencialmente proteolítico e carentes de fatores de desenvolvimento encontrados em hemoderivados como o fluido gengival (DE LORENZO; MAYER, 2004b). Por outro lado, em função da migração apical do epitélio juncional, há aumento das condições de anaerobiose (DE LORENZO; SIMIONATO; DE LORENZO, 1997; GATEWOOD; COBB; KILLOY, 1993). Para que ocorra doença, ainda deve ocorrer ruptura do equilíbrio microbiota-hospedeiro (MOMBELLI et al., 1995).

Conforme o conceito da translocação bacteriana, bolsas periodontais e mucosas são reservatórios de bactérias que podem colonizar sítios perimplantares na mesma boca. Para que ocorra a instalação de patógenos específicos e conseqüentemente de risco de instalação da doença perimplantar, faz-se necessária a prévia colonização de algumas espécies bacterianas que propiciem a instalação posterior das bactérias periodontopatogênicas (GOUVOUSSIS; SINDHUSAKE; YEUNG, 1997; LEE et al., 1999; SOCRANSKY et al., 1998).

Com base nesses fatos, pode-se acreditar na importante participação da microbiota patogênica, associada à resposta imuno-inflamatória, na instalação e progressão da doença perimplantar. Assim, com o tratamento e o controle da doença periodontal, principalmente se fundamentados em testes microbiológicos, podemos fazer diminuir o grau de risco de os pacientes desenvolverem perimplantite e, com isso, obter um tratamento com maior possibilidade de resultados eficazes.

Dentre as espécies microbianas reconhecidas pelo *World Workshop of Periodontology* (1996) como associadas com a periodontite crônica, merecem destaque as anaeróbias que compõem a associação que Socransky et al. (1998) viriam a denominar de “complexo vermelho”: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (em 2002 reclassificada como *Tannerella forsythensis*) e *Treponema denticola*. Segundo De Lorenzo e Mayer (2004a e b), essas espécies distinguem-se pela produção de importantes fatores de virulência como enzimas histolíticas (principalmente as proteases), toxinas citotóxicas (principalmente as endotoxinas) e fatores de evasão às defesas do hospedeiro.

Tanto *P. gingivalis* como *T. forsythensis* apresentam desenvolvimento bastante lento em meios de cultivo e *T. denticola* é muito sensível a pequenos teores de oxigênio e dificilmente cultivável. A partir da década de 1990, o advento de métodos moleculares de identificação microbiana, como o PCR, resultou em maiores possibilidades de detecção, particularmente de *T. denticola*, em materiais clínicos, pois conseguem evidenciar mínimas quantidades de DNA de microrganismos, mesmo que eles não estejam mais viáveis (MAYER; DE LORENZO, 2004), sendo altamente sensível e específico (WATANABE; FROMMEL, 1993).

2 PROPOSIÇÃO

Tendo em vista as considerações feitas no capítulo Introdução, este estudo tem como propostas principais:

1- utilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para determinar a ocorrência dos patógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis* em sulcos gengivais, bolsas periodontais e sulcos perimplantares de pacientes parcialmente desdentados, com a finalidade de observar se a sua colonização pode ser baseada na translocação bacteriana a partir de bolsas periodontais presentes na mesma boca;

2- contribuir para confirmar, por parâmetros clínicos e microbiológicos, a importância do controle da microbiota do biofilme periodontal em pacientes portadores de implantes, com o objetivo de diminuir o risco de perimplantite.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Desde o trabalho pioneiro de Løe; Theilade e Jensen (1965), acredita-se que o biofilme dental é o componente de maior importância na instalação e desenvolvimento da doença periodontal.

Socransky et al. (1963) já haviam descrito que em sítios periodontalmente doentes ocorre significativo aumento do número de espiroquetas e víbrios.

Listgarten e Lewis (1967) relataram a ocorrência de invasão de espiroquetas e bacilos fusiformes nos tecidos gengivais em casos de gengivite ulcerativa necrotizante (GUN) e Listgarten (1976) reportou, usando microscopia óptica e eletrônica, a presença de espiroquetas e outras espécies flageladas tanto em sítios doentes como em saudáveis.

Com o advento da Implantodontia, muitos trabalhos foram feitos com o objetivo de extrapolar as informações a respeito do papel dos microrganismos nos dentes e implantes.

Rams et al. (1984) estudaram, por microscopia de contraste de fase, a microbiota associada a 17 implantes bucais instalados em 13 pacientes. Ao contrário dos implantes bem-sucedidos, nos sulcos ao redor dos mal-sucedidos (profundidade igual ou superior a 5 mm) foram observadas elevadas contagens de espiroquetas e de leucócitos polimorfonucleares. Relataram que com o aumento da profundidade de sondagem, ocorre aumento do número de espiroquetas e diminuição de células cocóides, sugerindo que a microbiota instalada ao redor de implantes é similar à que coloniza os dentes naturais. Assim, a determinação do nível de espiroquetas pode ser um fator importante na avaliação de risco de doença no sítio perimplantar.

Listgarten (1986) investigou a distribuição de morfotipos bacterianos em regiões em torno de implantes bucais, tendo confirmado diferenças significativas entre a microbiota presente nos casos de saúde e doença. Relatou que pacientes que haviam sido tratados de periodontite e que haviam apresentado proporções elevadas de espiroquetas são mais susceptíveis a desenvolver retornos subseqüentes de periodontite do que os indivíduos com baixas proporções desses morfotipos bacterianos. Dada a dificuldade de se determinar a atividade bacteriana, ressaltou a importância do controle e manutenção periodontal a fim de manter um baixo nível de microrganismos.

Mombelli et al. (1987) compararam a microbiota de sítios perimplantares saudáveis e com perimplantite, nas mesmas bocas. Observaram que nos implantes que falharam havia um alto índice de bacilos móveis, bactérias fusiformes e espiroquetas, sendo que 41% eram Gram negativos anaeróbios, com predomínio de *Fusobacterium spp* e *Prevotella intermedia*. Nos sítios perimplantares saudáveis o predomínio era de cocos Gram positivos. Com esses achados, sugeriram que a perimplantite é um processo que acomete os implantes de forma similar ao da doença periodontal no aspecto microbiológico.

Quirynen e Listgarten (1990) estudaram a microbiota perimplantar de pacientes desdentados totais e parciais. Não observaram diferenças significantes nos morfotipos bacterianos instalados em dentes naturais e implantes na mesma boca. Esta similaridade ocorria tanto em saúde como em doença, porém mostraram diferenças significativas nos morfotipos bacterianos entre desdentados totais e parciais e que bolsas periodontais podem servir de reservatório bacteriano para a colonização nos implantes.

Becker et al. (1990) analisaram a microbiota associada ao insucesso de 36 implantes, utilizando sondas de DNA com o objetivo de identificar a presença dos

patógenos *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* (atualmente *Porphyromonas gingivalis*) e *Bacteroides intermedius* (atualmente *Prevotella intermedia*). Os autores relataram que muitas são as causas do insucesso dos implantes, como trauma cirúrgico, inadequado controle da temperatura durante a instalação, qualidade e quantidade óssea, sobrecarga oclusal e parafunções. Observaram moderadas concentrações de *B. gingivalis* (37,5%), *B. intermedius* (35,4%) e *A. actinomycetemcomitans* (27,8%). Evidências de radiolucidez, aumento na profundidade de sondagem e presença de bactérias periodontopatogênicas são fatores importantes que contribuem para a falha dos implantes.

Rosenberg; Torosian e Slots (1991) examinaram as diferenças entre as microbiotas isoladas de implantes que haviam falhado por trauma oclusal e de implantes falhos por infecção. Os implantes que falharam devido ao trauma oclusal exibiam uma microbiota semelhante à dos implantes saudáveis e naqueles que apresentavam infecção, as bactérias eram as mesmas encontradas em dentes com comprometimento periodontal.

Alcoforado et al. (1991) avaliaram, por cultivos, a microbiota associada ao insucesso de 18 implantes dentais em 12 indivíduos. Foram constatados altos índices de periodontopatógenos nos sítios perimplantares e ainda, em alguns casos, de microrganismos exógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Relataram a importância dos testes microbiológicos para a identificação de patógenos e para adequada administração de antibióticos, pois seu uso indiscriminado pode levar à resistência bacteriana. Destacaram, por outro lado, que antibióticos são ineficazes contra *C. albicans*, sendo necessária a administração de um agente antifúngico.

Gatewood; Cobb e Killooy (1993) estudaram a progressiva colonização bacteriana em superfícies de dentes (esmalte e cimento) e de implantes (titânio liso,

plasma de titânio e hidroxiapatita), utilizando microscopia eletrônica de varredura em material coletado das áreas supra e subgengival. Constataram a presença de cocos, bacilos (incluindo os filamentosos e fusiformes) e espiroquetas, indicando que nessas superfícies ocorre maturação de placa bacteriana de forma similar.

Wikström et al. (1993) relacionaram a interação entre espécies microbianas que apresentam efeitos sinérgicos e antagonistas que determinam seletivamente a composição da placa subgengival. O desenvolvimento de microrganismos periodontopatogênicos oportunistas pode suprimir o efeito benéfico de outras espécies, resultando em aumento de atividade de doença. A presença de bactérias por si só não determina a doença, porém a associação delas e dos fatores individuais são determinantes na sua instalação.

Koka et al. (1993) usando uma técnica imunológica (*slot immunoblot assay*) para detecção de antígenos bacterianos, estudaram a colonização de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Actinomyces viscosus* (na atualidade *Actinomyces naeslundii* genótipo 2), *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema socranskii* e *Treponema denticola* 14 e 28 dias após a instalação do cicatrizador em dez implantes do tipo Branemark. Constataram, nos dois períodos de observação, que os antígenos dessas seis espécies estavam presentes na porção marginal do implante (supragengival). Subgengivalmente, em 14 dias, somente o antígeno de *A. viscosus* estava presente e depois de 28 dias todos os outros foram observados, exceto o de *T. denticola*. Desta forma, os autores puderam concluir que a colonização bacteriana ocorre logo a partir da segunda semana após a reabertura (segunda fase cirúrgica).

Num estudo ao longo de 36 meses em pacientes parcialmente desdentados portadores de implantes, Leonhardt et al. (1993) examinaram a presença de três microrganismos (*P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans*), com o objetivo de relacionar a presença de bactérias em bolsas periodontais e a colonização

bacteriana ao redor dos implantes, associando com o grau de risco de doença. Observaram que a colonização dessas espécies nos sulcos perimplantares ocorria um mês após a sua exposição (segunda fase cirúrgica). Não observaram, no período estudado, perda óssea significativa, apesar da presença dessas bactérias. Esta constatação, segundo os autores, não significa que esses microrganismos não tenham um papel decisivo na instalação da doença, mas que certamente existem outros fatores envolvidos no processo, principalmente os relacionados ao hospedeiro.

Com o objetivo de detectar patógenos periodontais, Watanabe e Frommel (1993) mostraram as vantagens de se utilizar o método PCR (reação em cadeia da polimerase) na avaliação do grau de risco dos pacientes desenvolverem periodontite e no monitoramento nas fases de manutenção da terapia periodontal. Relataram algumas vantagens em relação ao cultivo e à sonda de DNA. O cultivo requer muito tempo para a detecção de patógenos específicos e podem ocorrer alterações nos resultados durante a coleta e transporte do material. A principal limitação da sonda de DNA é o limite baixo de sensibilidade. Demonstraram que o PCR é um método eficaz para a detecção de *P. gingivalis* em amostras de placa bacteriana num curto espaço de tempo (aproximadamente quatro horas).

Silverstein et al. (1994) reafirmaram a similaridade existente entre a microbiota associada à falha de implantes e a classicamente associada à doença periodontal (em sua grande maioria, bactérias Gram negativas anaeróbias). Ressaltaram a importância do tratamento periodontal prévio à instalação de implantes e que o controle e manutenção periodontal e perimplantar são essenciais para manter o controle da microbiota e perpetuar a longevidade dos implantes.

Sugerindo que patógenos associados com a periodontite ocorrem freqüentemente em sítios perimplantares com inflamação gengival, podendo contribuir para a instalação de perimplantite, Kalykasis et al. (1994) fizeram um

estudo em 98 implantes instalados em 24 pacientes desdentados e parcialmente desdentados, para determinar a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*, utilizando teste de aglutinação de látex. Observaram que *A. actinomycetemcomitans* estava presente igualmente em desdentados e parcialmente desdentados, porém *P. gingivalis* e *P. intermedia* ocorreram em maiores taxas no grupo dos parcialmente desdentados. Com relação ao tempo, a colonização bacteriana foi maior no grupo em que os implantes foram instalados entre três a quatro anos quando comparado com o grupo de um a dois anos de instalação. Esses achados ressaltam a importância do controle da microbiota para se obter longevidade dos implantes.

Mombelli et al. (1995) estudaram 20 pacientes com histórico de doença periodontal para determinar a ocorrência da colonização bacteriana três e seis meses após a exposição dos implantes ao meio bucal. Observaram que nos implantes instalados em pacientes parcialmente desdentados a colonização bacteriana é similar à encontrada em bolsas periodontais e que em pacientes desdentados os microrganismos são originários dos tecidos moles, com predominância de cocos. Relatam ainda a importância da existência de condições ecológicas para a colonização bacteriana, devendo haver uma ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro, uma vez que patógenos encontrados nos casos de saúde, como *F. nucleatum* e *P. intermedia*, são considerados oportunistas.

Ashimoto et al. (1996) utilizaram PCR, sondas de DNA e cultivos para estudar a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *T. denticola* na placa subgingival de 150 pacientes com gengivite ou periodontite. Enfatizaram as vantagens do PCR em relação aos outros métodos, por ter alta sensibilidade e baixo índice de reações cruzadas. Observaram altas relações de

simbiose entre as oito espécies bacterianas testadas, principalmente entre *C. rectus* e *T. denticola*, *B. forsythus* e *T. denticola* e *B. forsythus* e *P. gingivalis*, sendo que esta simbiose é muito prevalente em bolsas periodontais; assim, um regime terapêutico direcionado à supressão ou eliminação dessa simbiose pode ser benéfico para a prevenção ou controle da doença periodontal.

Com base no conceito da translocação bacteriana, Papaioannou; Quirynen e van Steenberghe (1996) analisaram a microbiota presente em bolsas rasas e profundas de seis pacientes (três com periodontite crônica e três com periodontite refratária) que possuíam implantes, com o intuito de determinar a presença ou ausência de microrganismos periodontopatogênicos. A frequência desses microrganismos foi menor em bolsas rasas do que em profundas e esta relação se repetiu quando se comparou periodontite crônica com refratária. Em bolsas profundas, nos pacientes com periodontite refratária, tanto em dentes como em implantes foram encontrados todos os microrganismos testados, exceto *A. actinomycetemcomitans*. Em pacientes com periodontite crônica, praticamente todas as espécies foram detectadas em bolsas profundas ao redor de dentes, mas ao redor de implantes, somente *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *T. denticola* foram freqüentemente detectados. Em bolsas rasas a maioria dos microrganismos examinados estavam ausentes. Essas observações sugerem que bolsas periodontais podem ser responsáveis pela transmissão de periodontopatógenos para sulcos perimplantares.

Baseados também na teoria da translocação bacteriana, Gouvoussis; Sindhusake e Yeung (1997) fizeram um estudo em 15 dentes e dez implantes de nove pacientes parcialmente desdentados, utilizando sondas de DNA. O modelo adotado aceita a hipótese da presença ou ausência de determinada espécie bacteriana que, se constatada sua ocorrência nos dois sítios (dente e implante), pode

ter ocorrido infecção cruzada. Se a espécie é detectada no dente e não no implante, a possibilidade de infecção cruzada não ocorre, porém se a detecção não ocorrer no dente e ocorrer no implante, a possibilidade de sítios extrabucais de infecção pode ser considerada (microrganismo exógeno). Nessa pesquisa foram observados altos índices de colonização bacteriana, chegando em alguns casos a 100% (*A. actinomycetemcomitans* e *E. corrodens*) e 83% (*P. intermedia* e *F. nucleatum*). Esses achados suportam a proposição de que microrganismos presentes em bolsas periodontais podem freqüentemente deslocar-se e colonizar sulcos perimplantares, levando a risco de doença. Assim, o controle da doença periodontal e da microbiota a ela associada, devem ser buscados no intuito de proporcionar saúde perimplantar.

De Lorenzo; Simionato e De Lorenzo (1997) descreveram as semelhanças entre as patologias periodontal e perimplantar. No aspecto histológico, ocorrem ulceração do epitélio sulcular, vasodilatação capilar, infiltrado de polimorfonucleares, linfócitos e plasmócitos, perda de colágeno gengival, migração do epitélio juncional e perda óssea. No aspecto clínico, ocorrem sinais como edema, sangramento, aumento de exsudato, eventual supuração e alto índice de placa bacteriana. No aspecto microbiológico observa-se, nos casos de saúde, predominância de cocos e bacilos Gram positivos facultativos imóveis, com uma porcentagem mínima de bacilos Gram negativos móveis e de espiroquetas. Na medida que a doença evolui, há uma transição (sucessão bacteriana) caracterizada por aumento progressivo da freqüência de espécies Gram negativas anaeróbias estritas, incluindo os espiroquetas. Para que ocorra esta situação, são necessárias algumas condições que mudam o habitat, como o aumento de fluxo do exsudato gengival e o aumento das condições de anaerobiose. Chama a atenção a presença eventual de microrganismos não pertencentes à microbiota bucal, presentes em doenças avançadas em que a antibioticoterapia pode não ser efetiva se houver a presença de fungos. Como os

implantes estão sujeitos aos mesmos patógenos que acometem os dentes, torna-se imperativo o controle do desenvolvimento microbiano na região periodontal e perimplantar antes e após a execução do procedimento cirúrgico, uma vez que bactérias presentes em bolsas periodontais podem colonizar sulcos perimplantares.

Avaliando os complexos microbianos que freqüentemente se associam na acumulação gradativa da placa subgengival, Socransky et al. (1998) analisaram 13.261 sítios em 185 pacientes, com o propósito de determinar o agrupamento das comunidades bacterianas. Foram descritos complexos que colonizam gradativamente o biofilme subgengival, formando uma pirâmide. Em sua base são encontradas as espécies colonizadoras iniciais, que formam os complexos azul (*Actinomyces* spp), roxo (*Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*), verde (três espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella. corrodens* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo "a") e amarelo (*Streptococcus sanguis* – hoje *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. intermedius*). Estes complexos basilares fornecem condições para a subsequente implantação dos colonizadores intermediários que formam o complexo laranja (*Fusobacterium nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* – na atualidade *Micromonas micros*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *C. showae*, *C. gracilis* e *Streptococcus constellatus*). No ápice da pirâmide, correspondendo aos colonizadores tardios do biofilme subgengival, estão as espécies que constituem o complexo vermelho, representado por *Bacteroides forsythus* (na atualidade *Tannerella forsythensis*), *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. O complexo vermelho estava fortemente relacionado ao aumento de profundidade de bolsa e ao sangramento à sondagem. Foi observada intensa relação entre os complexos, principalmente entre o laranja e vermelho, sendo que os dados sugerem que espécies do complexo laranja precedam a colonização por espécies do

vermelho. O propósito da investigação foi de usar análise de agrupamento e técnicas de ordenação de comunidade para examinar as relações entre as espécies bacterianas em amostras de placa subgengival e relacionar os complexos a parâmetros clínicos de doença periodontal, e assim entender a ecologia complexa observada na placa bacteriana, com o intuito de auxiliar no diagnóstico e tratamento da doença periodontal.

Numa revisão de literatura, Richard (1998) procurou relacionar a patogênese das doenças periodontal e perimplantar, com base em similaridades na microbiota, uma vez que sulcos perimplantares seriam colonizados por bactérias oriundas de bolsas periodontais em pacientes parcialmente desdentados e dos tecidos moles (mucosas) em pacientes totalmente desdentados. Pacientes com histórico de doença periodontal possuem mais chance de ocorrência de colonização bacteriana do que pacientes que nunca foram acometidos por doença, sendo recomendável a normalização dos tecidos periodontais antes da instalação dos implantes. O autor resalta algumas diferenças que podem ser importantes na instalação da placa bacteriana, uma vez que implantes estariam menos propensos à formação do biofilme subgengival. Em dentes, a presença do cimento e inserção de fibras do ligamento periodontal diferem da situação encontrada em implantes, nos quais a superfície coronária é polida e não ocorre inserção de fibras; além disso, o tipo de tratamento da superfície do implante, o microvalamento entre o implante e a conexão protética e a exposição de espiras mais coronárias podem ser fatores decisivos na instalação da doença, porém o aspecto determinante para o sucesso dos implantes depende do controle da infecção.

Esposito et al. (1998) baseados na literatura especializada, apontaram os principais fatores que contribuem para a falha dos implantes. Didaticamente, dividiram os fatores em dois grandes grupos: endógenos (sistêmicos e locais) e exógenos

(relacionados ao operador e aos biomateriais). Dentre os fatores endógenos sistêmicos têm-se a idade, fatores genéticos, estado de saúde e tabagismo e, dentre os fatores endógenos locais, a quantidade e qualidade óssea, localização anatômica, utilização de enxertos ósseos, parafunções, resposta imunológica local, histórico de periodontite, quantidade de gengiva inserida e radioterapia. Dentre os fatores exógenos têm-se aqueles relacionados ao operador (como experiência e técnica), trauma cirúrgico e contaminação bacteriana. Concluíram que a falha dos implantes tem aspecto multifatorial, porém o controle da infecção pré e pós-operatória, associada à correta biomecânica das próteses, são os fatores de maior importância na longevidade dos implantes.

Num estudo comparativo, Listgarten e Lai (1999) analisaram três grupos compostos de 41 pacientes cada: um composto por pacientes com implantes mal-sucedidos, outro por pacientes com periodontite e, o terceiro, por pacientes com periodontite refratária. Estudaram a frequência e o nível dos principais microrganismos periodontopatogênicos, tendo observado similaridade entre as bactérias encontradas no primeiro e no terceiro grupo. Uma constatação importante foi a ocorrência de alto índice de cocos no primeiro grupo; isto sugere que a amostra pode ter sido influenciada, por exemplo, por sobrecarga oclusal, além do que torna-se difícil diagnosticar grupos com periodontite refratária, uma vez que esta pode ser uma recorrência de periodontite e que apesar do resultado obtido, amostras derivadas de implantes com doença perimplantar, dentes com periodontite, ou periodontite refratária, tendem a ser microbiologicamente similares.

Lee et al. (1999) estudaram, usando sondas de DNA, a microbiota de implantes bem sucedidos em 43 pacientes parcialmente desdentados, obtendo amostras ao redor de coroas suportadas por dentes, por implantes e dentes sem coroas protéticas. Observaram a ocorrência dos microrganismos que constituem os

complexos amarelo, verde, roxo, laranja e vermelho. Os do complexo amarelo e verde estavam presentes em sítios de saúde gengival. A colonização pelo complexo laranja estava na dependência da presença dos complexos anteriores, da mesma forma que o complexo vermelho em relação ao laranja, caracterizando uma verdadeira sucessão bacteriana. *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola* (complexo vermelho) não foram encontrados na ausência de espécies dos outros complexos. Concluíram que a presença ou ausência de coroas não altera a composição bacteriana, ao contrário do histórico da doença periodontal, que pode determinar a provável transmissão de microrganismos de dentes para implantes. Além disso, fatores como susceptibilidade do hospedeiro, interações bacterianas, diferentes clones de espécies, transmissão de elementos genéticos e envolvimentos físico-químicos, poderiam determinar a instalação de doença.

Estudando, por cultivos, a microbiota associada ao insucesso de implantes, Leonhardt; Renvert e Dahlén (1999) avaliaram um total de 88 pacientes, dos quais 37 apresentavam implantes bucais com perda óssea maior que 3 mm e 51 com características de saúde perimplantar. Observaram que a simples presença de patógenos periodontais como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *B. forsythus* não determina obrigatoriedade de doença, sendo um fator de risco importante. Chamaram a atenção para a presença de *E. coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp e *Pseudomonas* spp, microrganismos oportunistas incomuns na cavidade bucal, que uma vez instalados em sulcos perimplantares, podem ter um papel importante na progressão da doença, resultando numa estratégia diferenciada de tratamento, objetivando o sucesso terapêutico.

Kasuga; Ishihara e Okuda (2000) avaliaram a importância de se detectar a presença de *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola* utilizando o método do PCR, num total de 165 sítios periodontais em 60 pacientes. Observaram que a severidade

da doença era maior onde as três bactérias estavam presentes (sítios de infecção mista) e que era mais prevalente com o aumento da idade. Concluíram que o estabelecimento de sítios de infecção mista tem um papel importante na patogenia e no desenvolvimento da doença periodontal e que a detecção desses três microrganismos é essencial para planejar o tratamento e o controle da periodontite.

Nestor (2000) observou a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em 60 pacientes com periodontite, utilizando sondas de DNA em materiais coletados de sítios ativos e inativos. Encontrou altos índices de *P. gingivalis* e de *P. intermedia* em sítios ativos, além da ocorrência de sangramento à sondagem nos mesmos. Não observou existir associação aparente entre *A. actinomycetemcomitans* e doença periodontal ativa, uma vez que esta espécie foi encontrada em maior número em sítios não ativos.

Num estudo longitudinal com duração de três a cinco anos, Mengel; Schröder e Flores-de-Jacoby (2001) avaliaram o índice de sucesso dos implantes instalados em pacientes com periodontite crônica e periodontite agressiva generalizadas. Em ambos os grupos, até o terceiro ano, observaram condições de saúde periodontal e perimplantar, porém após este período houve aumento da perda de inserção e profundidade à sondagem nos pacientes portadores de periodontite agressiva generalizada, sendo que o índice de sucesso dos implantes foi 10% menor. Não houve diferença entre dentes e implantes no que diz respeito à evolução da doença, com base nos critérios clínicos e na composição microbiana. Apesar das diferenças não serem significativas, a progressão e o tipo de doença certamente devem ser avaliados com critério.

Rutar et al. (2001) fizeram um estudo relacionando parâmetros clínicos e microbiológicos em pacientes parcialmente desdentados que possuíam implantes, durante um período de cinco a dez anos. Foram incluídos 45 indivíduos (20 mulheres

e 25 homens), com idades entre 27 e 83 anos, num total de 64 implantes, sendo que cada paciente possuía entre um e três implantes. Durante o período de observação em que os implantes foram monitorados e controlados, 15 deles exibiram sinais de perimplantite; nove apresentaram um episódio e seis apresentaram dois, sendo que todos eles foram tratados com sucesso por de terapias de suporte e antibacteriana; apenas um implante foi perdido em função de o paciente apresentar diabetes. No aspecto microbiológico foram estudadas treze bactérias por microscopia de campo escuro e cultivo. Pacientes com histórico de perimplantite mostraram maior frequência de espiroquetas, além de que a presença de *P. gingivalis* parece ser um indicativo para a ocorrência de patologia perimplantar. Ressaltaram a importância do controle e manutenção periodontal e perimplantar para a manutenção e longevidade dos dentes e implantes e que a perimplantite tem um bom prognóstico desde que detectada precocemente.

Numa revisão de literatura, Mombelli (2002) descreveu o papel dos microrganismos periodontopatogênicos na doença perimplantar, observando a similaridade com a doença periodontal. O autor fez uma abordagem a respeito da evolução da perimplantite associando aos tipos de tratamento que podem ser instituídos e que, com o auxílio de testes microbiológicos, pode-se incrementar com sucesso o tratamento com o uso de antimicrobianos sistêmicos.

Num estudo longitudinal ao longo de dez anos, Leonhardt et al. (2002) acompanharam 15 pacientes parcialmente desdentados com histórico de periodontite, portadores de 57 implantes, utilizando análises clínicas, radiográficas e microbiológicas. Antes da instalação dos implantes, os indivíduos foram tratados periodontalmente e submetidos a controle e manutenção. O índice de sobrevida dos implantes foi de 94,7%, com perda óssea média de 1,7mm. Em 50% dos implantes foi detectado acúmulo de placa bacteriana e em 61% sangramento à sondagem. No

aspecto microbiológico, foi observada a presença de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* spp e *C. rectus*. Concluíram que a presença desses patógenos não necessariamente influencia o resultado e o sucesso dos implantes, pois fazem parte da microbiota residente dos indivíduos, podendo ser detectados ao acaso.

Num estudo comparativo, van Winkelhoff et al. (2002) observaram, utilizando cultivos, a prevalência de patógenos periodontais em 210 pacientes, sendo 94 deles sem perda óssea (saúde e gengivite) e 116 com periodontite. Todos os microorganismos estudados foram encontrados em ambos os grupos, porém uma concentração extremamente maior de *P. gingivalis* e *B. forsythus* foi observada nos pacientes com periodontite. Este achado mostra que essas bactérias estão fortemente associadas à destruição periodontal, exceto *C. rectus* que foi encontrado em baixíssimas proporções. Relataram ainda que a simples presença de patógenos periodontopatogênicos não é suficiente para determinar a destruição periodontal, havendo a necessidade da presença de outros fatores como, por exemplo, a susceptibilidade do hospedeiro.

Com o intuito de observar a prevalência de patógenos periodontais, Avila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002) estudaram a microbiota de 50 pacientes saudáveis e 50 com periodontite, utilizando métodos de cultivo e PCR para compará-las. Relataram que o PCR, além de ser mais específico que o cultivo, permite a identificação de microrganismos que não podem ser cultiváveis. Constataram altas prevalências de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* tanto no estado de saúde como de doença, sugerindo que esses microorganismos fariam parte da microbiota indígena bucal. Como foram encontradas baixas prevalências de *B. forsythus* e de *T. denticola* em indivíduos com

saúde periodontal, os autores sugeriram que esses microorganismos são importantes no processo de destruição periodontal.

Com o objetivo de demonstrar que bactérias presentes em bolsas periodontais poderiam colonizar a superfície dos implantes, Sumida et al. (2002) estudaram, por PCR, material coletado de 15 pacientes, num total de 105 sítios (55 em dentes e 50 em implantes). *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. denticola* foram detectados em proporções de 65,5%, 72% e 40% em dentes e 38%, 14,5% e 18% em implantes, respectivamente. Para *B. forsythus* e *P. intermedia*, entretanto, os índices foram de 10,9% e 46% para dentes e de 20% e 30% para implantes respectivamente, mostrando que esses patógenos são detectados em alta frequência tanto ao redor de implantes como em bolsas periodontais. Conseqüentemente, sua eliminação das bolsas periodontais antes e depois da instalação de implantes pode inibir a colonização e diminuir o risco para perimplantite.

Em revisão bibliográfica, Socransky e Haffajee (2002) procuraram estabelecer a relação da doença periodontal com os principais microorganismos a ela associados e a dificuldade em se determinar estratégias no controle e progressão da doença. Relataram que muitas das bactérias periodontopatogênicas fazem parte da chamada microbiota indígena (própria do indivíduo) e que sua presença não necessariamente é sinal de atividade de doença. O precursor do processo patológico é a formação do biofilme, e chamaram a atenção para a sua complexidade e estrutura, em especial para a presença de água, glicocálice e exopolissacarídeos bacterianos, determinando a viabilidade e complexidade do mesmo. Reafirmaram as relações dos complexos bacterianos, onde uma verdadeira sucessão de grupos culmina com a colonização de bactérias dos complexos laranja e principalmente do vermelho (*P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola*), uma vez que estas bactérias estariam fortemente relacionadas com a severidade da doença periodontal. Fizeram algumas

considerações sobre o controle do biofilme, considerando que a alteração do habitat propicia o desequilíbrio da microbiota periodontal. A remoção mecânica do biofilme por parte do paciente e do profissional pode ser associada à terapia antimicrobiana. Descreveram grandes vantagens na administração de antibióticos, principalmente a associação de metronidazol e amoxicilina, na redução das bactérias dos complexos laranja e vermelho, sendo que a ação se daria de forma direta e indireta, uma vez que diminuindo o número de determinadas bactérias, automaticamente outras que necessitariam desta relação também teriam seu número diminuído. Os autores também fizeram alusão importante à resposta do hospedeiro e a fatores genéticos no envolvimento com a doença e salientaram que pacientes periodontais podem necessitar de terapias combinadas, requerendo especial controle da infecção por diferentes estratégias.

Em revisão de literatura, Heydenrijk et al. (2002) confrontaram as opiniões de diversos autores com relação à microbiota envolvida no insucesso de implantes, tentando estabelecer as possíveis relações que envolvem o aparecimento e desenvolvimento da perimplantite. Concluíram que os tecidos perimplantares são colonizados por uma variedade de complexos microbianos bucais e que a microbiota presente na cavidade bucal antes da instalação de implantes determina a composição da mesma ao redor deles; entretanto, salientaram que a simples presença de microrganismos periodontopatogênicos nem sempre leva à instalação do processo destrutivo e que marcadores genéticos influenciam de forma importante o aparecimento da doença.

Com o intuito de analisar a microbiota e a resposta inflamatória do hospedeiro ao redor de dentes e implantes, Hultin et al. (2002) estudaram 98 implantes instalados em 17 pacientes parcialmente desdentados; 45 deles apresentavam perda óssea maior ou igual a três roscas após o primeiro ano de carga. Dezenove pacientes com

condições teciduais estáveis serviram como controle. Os implantes estudados foram distribuídos em categorias: 1- com perimplantite (PI), 2- estáveis (SI) em pacientes com implantes estáveis e perimplantite, 3- de controle (CI) em pacientes somente com implantes estáveis. Também foram estudados dentes em pacientes (TP) e os controles (TC). Foram analisadas a atividade de elastase, lactoferina e as concentrações de IL-1 β no fluido sulcular de dentes e implantes. A atividade de elastase foi maior em PI do que nos controles. A concentração de lactoferina foi maior em PI do que nos pacientes SI com perimplantite. Encontraram-se níveis maiores de lactoferina e atividade de elastase em PI do que em dentes de pacientes. Concentrações de IL-1 β foram às mesmas em diferentes lugares. A análise microbiológica, feita com sondas de DNA, detectou altos níveis de patógenos periodontais nos sítios com perimplantite, apesar de terem sido encontrados em menor número em todos os sítios estudados. Os achados revelaram existência de inflamação específica local, mas que existe uma resposta específica associada ao hospedeiro.

Klein e Gonçalves (2003) estudaram a ocorrência de *P. gingivalis* e *B. forsythus* em 30 indivíduos, sendo dez saudáveis, dez que tinham profundidade de bolsa periodontal \leq 5mm e dez que apresentavam profundidade de bolsa $>$ 5mm. Em apenas uma pessoa periodontalmente saudável foi constatada a presença de *P. gingivalis*. No segundo grupo foram detectados *B. forsythus* (70%), *P. gingivalis* (40%) e ambos (30%). No terceiro grupo 100% albergavam *B. forsythus*, 90% *P. gingivalis* e 90% ambas. Esse estudo mostrou forte associação entre a severidade de doença e a presença desses microrganismos e que este alto índice de prevalência sugere uma associação ecológica entre as espécies e que o uso de monitoramento microbiológico pode ser um aliado importante no controle da doença, principalmente pelo método

PCR, em função do seu alto nível de sensibilidade na identificação de patógenos periodontais.

Em revisão de literatura, Quirynen e Teughels (2003) relacionaram os principais fatores que causam a falha dos implantes. Enfatizaram que falhas precoces podem ter origem no pré ou no trans-operatório e que bochechos com clorexidina a 0,12% reduzem a ocorrência de contaminação microbiana. A composição da microbiota ao redor de implantes em parcialmente desdentados está diretamente relacionada àquela ao redor de dentes, uma vez que uma determina a composição da outra, podendo em pacientes com periodontite, ocorrer translocação bacteriana, apesar dessa associação não necessariamente estabelecer uma relação causa-efeito. Fatores sistêmicos também têm importante papel na falha precoce dos implantes. Nos indivíduos afetados por esses problemas, foi observada baixa atividade de anticorpos séricos (deficiência na resposta imunitária) para *B. forsythus* e *Staphylococcus aureus*. Ressaltaram a importância do tratamento periodontal e do controle da microbiota antes da instalação de implantes, pois o histórico de periodontite pode ser considerado um fator de risco no paciente implantado.

Leitão (2003) estudou, por PCR, a ocorrência dos patógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetencomitans* em sulcos perimplantares de dezenove pacientes com e sem histórico de doença periodontal prévia à instalação de implantes. Observou a presença dos microrganismos em sítios perimplantares de alguns pacientes que não apresentavam histórico de doença periodontal e ausência dos mesmos em alguns com histórico de periodontopatia. Concluiu que mesmo nos casos em que os tecidos perimplantares não apresentam sinais significantes de doença, a detecção desses microrganismos pode ser interpretada como indicadora de risco, necessitando a instituição de um controle mais rigoroso, objetivando o sucesso do tratamento com implantes.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Seleção dos Pacientes

Para a realização deste estudo foram selecionados cinco pacientes parcialmente desdentados, do sexo feminino, da cor branca, com idades variando entre 34 e 68 anos, portadoras de um ou mais implantes dentais de hexágono externo tipo Branemark, todos com diâmetro de 3,75 mm e em função havia mais de dois anos. Todas as pacientes possuíam pelo menos um dente com bolsa periodontal com profundidade maior ou igual a 5mm e um ou mais dentes em situação de saúde periodontal, que serviram como controle. Todas encontravam-se em boas condições sistêmicas, não tendo recebido nenhum tipo de tratamento periodontal nos últimos seis meses, nem submetidas a antibioticoterapia nos três meses que antecederam o estudo.

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas (Anexo A), todas receberam Carta de Informação (Anexo B) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C).

4.2 Exame Clínico

De cada paciente, foram selecionados três sítios para análise, a saber:

- 1- um sítio num sulco gengival saudável com profundidade de sondagem menor ou igual a 3mm;
- 2- um sítio numa bolsa periodontal onde a sondagem deveria ter 5mm ou mais de profundidade;

3- um sítio num sulco perimplantar sem perimplantite, sendo que em pacientes que possuíam mais que um implante, a escolha foi de forma aleatória.

No exame clínico foi observada a presença ou ausência de sangramento à sondagem, utilizando sondas milimetradas de aço¹ (sítios periodontais) e de teflon¹ (sítios perimplantares). As próteses instaladas sobre os implantes não foram removidas.

4.3 Coleta Microbiológica

Antes do início de cada coleta, a placa bacteriana supragengival foi removida por uma limpeza superficial com hastes flexíveis com algodão. A coleta foi realizada inserindo dois cones de papel absorvente estéreis² no interior dos sítios periodontais e perimplantares, permanecendo por um minuto (BECKER et al., 1990). Os cones foram então levados ao interior de um tubo eppendorf contendo 300 µl de Água ultra-pura Milli-Q³ esterilizada e transportados imediatamente para o Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos.

4.4 Processamento Laboratorial

4.4.1 Cultivos Bacterianos

No laboratório as amostras clínicas foram cultivadas, em duplicata, em

¹ Hu-Friedy, - USA

² Dentsply Brasil[®] - tamanhos 35 e 40

³ Millipore Ltda., S.P

placas de Petri contendo ágar-sangue e incubadas em condições de aerobiose e em anaerobiose, com o objetivo de determinar os morfotipos bacterianos nelas presentes (identificação presuntiva inicial).

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.4.2.1 Extração dos DNA Bacterianos

Em seguida, as amostras foram diluídas até 10^{-10} e os DNA bacterianos foram extraídos pelo método de fervura a 100°C durante 15 minutos (AVILA-CAMPOS; VELÁSQUEZ-MELÉNDES, 2002). Após este procedimento as amostras foram centrifugadas a 14.000 g durante dez minutos e o sobrenadante (DNA) foi utilizado imediatamente ou estocado a -20°C .

4.4.2.2 Amplificação dos DNA Bacterianos

A amplificação dos DNA bacterianos foi realizada em volumes finais de $25\ \mu\text{l}$, contendo $2,5\ \mu\text{l}$ de tampão PCR ($10\ \text{x}$)⁴, $1,0\ \mu\text{l}$ de MgCl_2 ($50\ \text{mM}$)⁴, $1,0\ \mu\text{l}$ da mistura de dNTP⁴ ($0,2\ \mu\text{M}$), $1,0\ \mu\text{l}$ de cada iniciador específico⁴ ($0,4\ \mu\text{M}$), $0,25\ \mu\text{l}$ de *Taq* DNA polimerase⁴, $8,25\ \mu\text{l}$ de H_2O Milli-Q³ esterilizada e $10\ \mu\text{l}$ de DNA. Os pares de iniciadores específicos utilizados foram sintetizados segundo Ashimoto et al. (1996) e Avila-Campos et al. (1999), como pode ser observado na Tabela 1.

⁴ Invitrogen Ltda. Brasil, São Paulo, SP

Tabela 1 - Iniciadores específicos, temperaturas de anelamento e produtos amplificados utilizados no teste PCR para as bactérias-alvo deste estudo. Todos os iniciadores específicos foram utilizados na concentração final de 20 µM.

| Iniciadores específicos | Seqüência | | Temperatura de anelamento | Produto amplificado |
|-------------------------|--|----|---------------------------|---------------------|
| | 5' | 3' | | |
| <i>T. forsythensis</i> | GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T | | 60°C | 0,6 kb |
| <i>P. gingivalis</i> | AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT | | 60°C | 0,4 kb |
| <i>T. denticola</i> | TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA | | 55°C | 0,3 kb |

LEGENDAS:

G = guanina

C = citosina

A = adenina

T = timina

A reação de amplificação foi realizada em termociclador⁵ programado para: um ciclo de 94°C por cinco minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C ou 60°C (segundo cada par de iniciadores específicos) por 30 segundos, um ciclo a 72°C por 30 segundos e um ciclo a 72°C por cinco minutos, para extensão final do DNA.

4.4.2.3 Detecção dos Produtos de Amplificação

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em fonte de corrente⁶ a 70 V por duas horas e 30 minutos. Após o

⁵ Perkin Elmer, Gene Ampli PCR System 9700

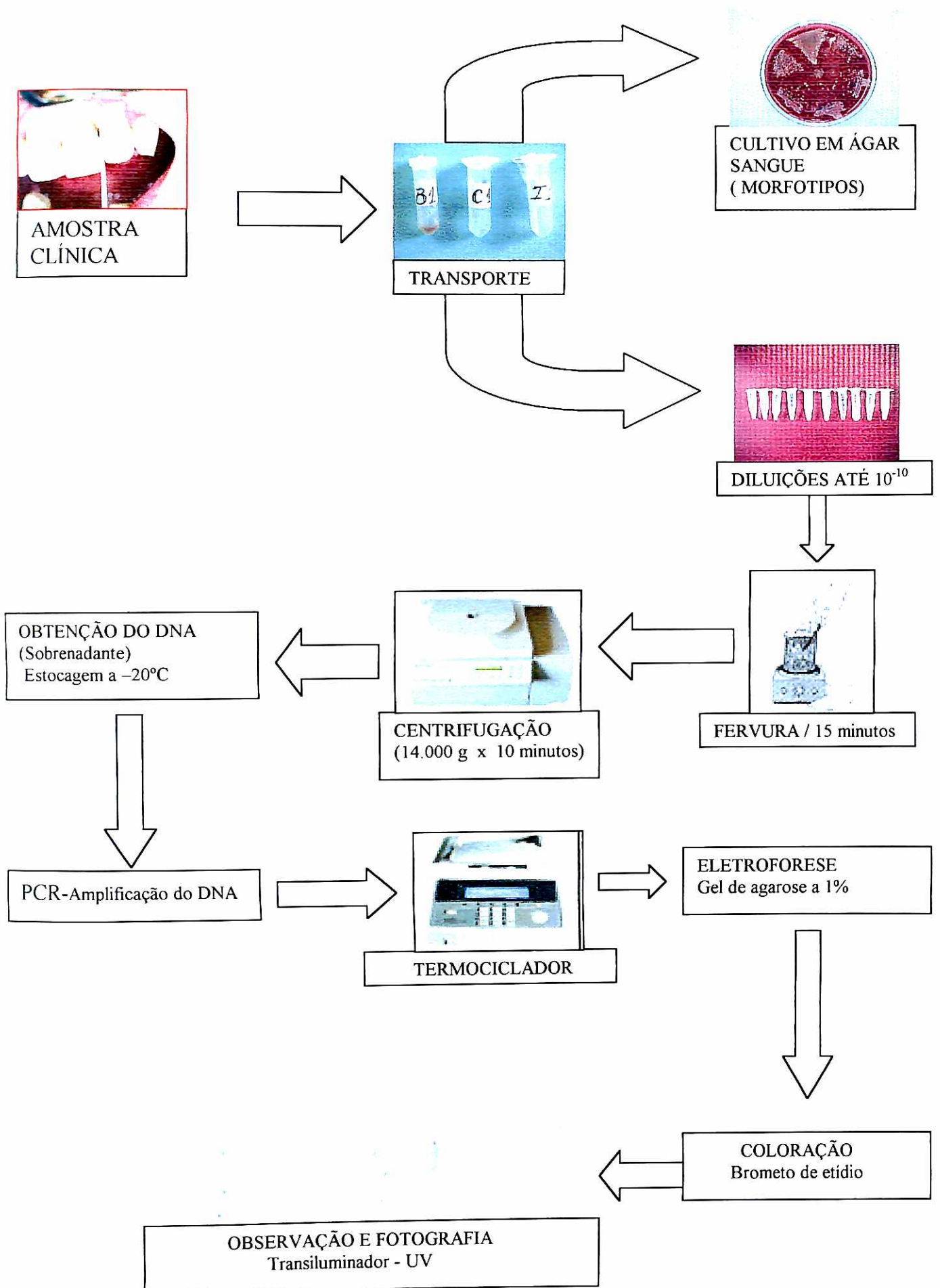
⁶ Biorad®

tempo da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), observado e fotografado sobre transiluminador ultravioleta utilizando-se o sistema Kodak Digital Science System-DC 120. Como controle de peso molecular foi usado 1 kb DNA *ladder*^A.

Em todos os testes, como controle negativo, foi usada Água Milli-Q³ esterilizada.

A Figura 1 representa o fluxograma com a seqüência dos procedimentos realizados.

Figura 1 - FLUXOGRAMA



5 RESULTADOS

Conforme a seqüência apresentada no capítulo Materiais e Método, foram obtidos os resultados descritos a seguir:

A Figura 2 ilustra o desenvolvimento bacteriano em ágar-sangue, observado a partir do cultivo anaeróbico de seis das amostras clínicas, coletadas de dois pacientes.

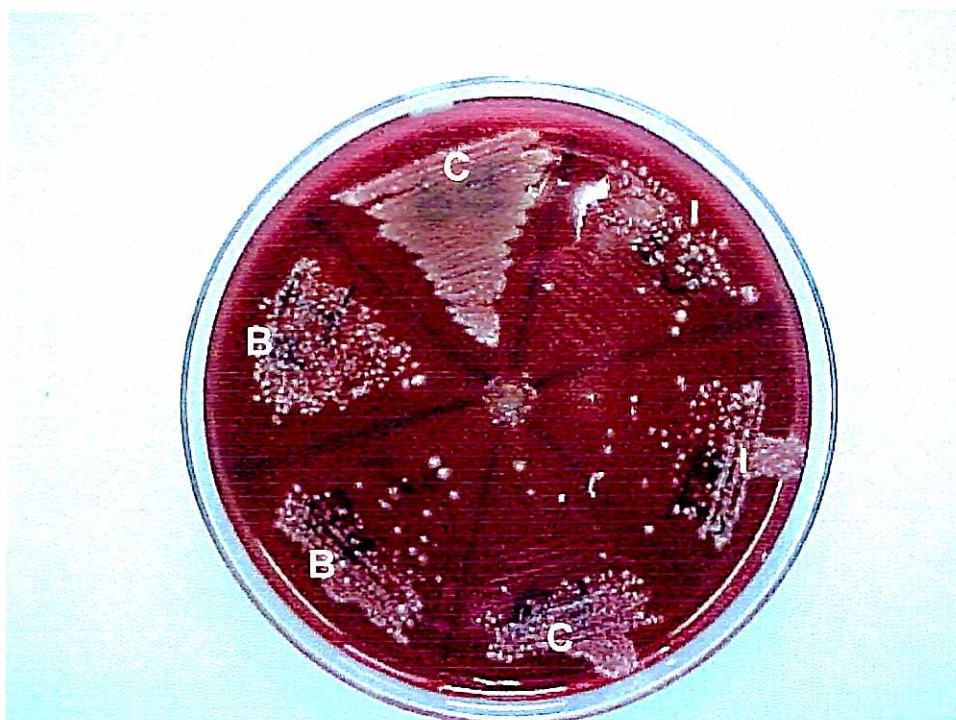


Figura 2 - Desenvolvimento bacteriano obtido em ágar-sangue, a partir de amostras não diluídas. B: bolsa periodontal, C: controle (sulco gengival sadio) e I: sulco perimplantar.

A Tabela 2 expressa os parâmetros clínicos anotados a partir do exame de cada caso e os morfotipos bacterianos detectados em cada um deles.

Tabela 2 - Dados relativos às regiões dos sítios examinados, aos parâmetros clínicos analisados (profundidade de sondagem e sangramento à sondagem), ao hábito de tabagismo, a idade dos pacientes e aos morfotipos das bactérias cultivadas diretamente das amostras coletadas desses sítios.

| | D.T./R.G. | P.S. | S.S. | FUMANTE | IDADE | M.B. |
|-------------------|-----------|------|------|---------|-------|--------------------------------|
| PACIENTE 1 | | | | - | 51 | |
| S.G.C. | 33 | 2mm | - | | | Cocos G + |
| B.P. | 38 | 5mm | + | | | Cocos G + ; bacilos G - |
| S.P.I. | 42 | 2mm | + | | | Poucos cocos G+ ; bacilos G - |
| PACIENTE 2 | | | | + | 44 | |
| S.G.C. | 23 | 3mm | - | | | Cocos G + |
| B.P. | 26 | 6mm | - | | | Cocos G + ; bacilos G - |
| S.P.I. | 22 | 3mm | + | | | Cocos G + ; poucos bacilos G - |
| PACIENTE 3 | | | | - | 68 | |
| S.G.C. | 32 | 3mm | - | | | Cocos G + |
| B.P. | 28 | 7mm | + | | | Bacilos G - |
| S.P.I. | 44 | 5mm | + | | | Cocos G + ; poucos bacilos G - |
| PACIENTE 4 | | | | - | 34 | |
| S.G.C. | 35 | 3mm | - | | | Cocos G + |
| B.P. | 36 | 6mm | + | | | Bacilos G - |
| S.P.I. | 24 | 3mm | + | | | Cocos G + |
| PACIENTE 5 | | | | + | 50 | |
| S.G.C. | 42 | 3mm | - | | | Cocos G + |
| B.P. | 11 | 6mm | - | | | Poucos cocos G+ ; bacilos G - |
| S.P.I. | 45 | 5mm | - | | | Cocos G + ; poucos bacilos G - |

LEGENDA:

D.T./R.G.: Dente/Região
P.S.: Profundidade de sondagem
S.S.: Sangramento à sondagem
M.B.: Morfotipos bacterianos
S.G.C.: Sulco gengival controle
B.P.: Bolsa Periodontal
S.P.I.: Sulco perimplantar
G+: Gram positivos
G -: Gram negativos

Analisando microscopicamente, com o auxílio da coloração de Gram, esfregaços obtidos das colônias desenvolvidas em ágar-sangue foi possível determinar que nos sítios-controle havia predominância de cocos Gram positivos,

dispostos isoladamente ou em arranjos naturais como diplococos, em cadeias ou em pequenos aglomerados. Nas bolsas periodontais, onde a profundidade de sondagem variou entre cinco e sete milímetros, verificou-se a presença de bacilos Gram negativos nas cinco amostras, sendo também detectados, em três amostras, arranjos de cocos Gram positivos. Nos sítios perimplantares, onde a profundidade de sondagem variou entre dois e cinco milímetros, foi constatada grande ocorrência de cocos Gram positivos e de poucos bacilos Gram negativos.

O sangramento à sondagem não foi um fator determinante para indicar a presença ou ausência dos diferentes morfotipos, na maioria dos casos examinados.

Na Tabela 3 estão expressos os resultados relativos à identificação (análise dos genomas por reações em cadeia da polimerase, PCR), da presença dos patógenos *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* nas amostras não diluídas e em suas diferentes diluições.

Tabela 3 - Resultados das detecções, pela reação em cadeia de polimerase (PCR), dos DNA de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* contidos nos materiais analisados não diluídos e em diferentes diluições.

| | SÍTIO | MO | DILUIÇÕES | | | | | | | | | | | |
|------------|--------|----|-----------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | | | SD | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻¹⁰ |
| PACIENTE 1 | S.G.C. | Pg | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B.P. | Pg | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Td | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Tf | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S.P.I. | Pg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PACIENTE 2 | S.G.C. | Pg | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | B.P. | Pg | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | S.P.I. | Pg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| PACIENTE 3 | S.G.C. | Pg | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | B.P. | Pg | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | S.P.I. | Pg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| PACIENTE 4 | S.G.C. | Pg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | B.P. | Pg | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | S.P.I. | Pg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| PACIENTE 5 | S.G.C. | Pg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | B.P. | Pg | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | S.P.I. | Pg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Td | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Tf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |

LEGENDA:Pg: *Porphyromonas gingivalis*Td: *Treponema denticola*Tf: *Tannerella forsythensis*

MO: Microrganismos

SD: Sem diluição

S.G.C.: Sulco gengival controle

B.P.: Bolsa periodontal

S.P.I.: Sulco perimplantar

Os resultados demonstrados na Tabela 3 mostram que em nenhum dos sulcos perimplantares foi constatada a ocorrência de nenhuma das três espécies bacterianas estudadas, apesar das detecções da presença desses patógenos nas bolsas periodontais dos cinco pacientes analisados e até mesmo nos sulcos gengivais de três deles, e também da constatação de sangramento à sondagem em quatro dos sítios perimplantares.

Na bolsa periodontal do paciente 1 (com 5 mm e sangramento à sondagem) o método PCR constatou a ocorrência de *P. gingivalis* até a diluição a 10^{-4} , de *T. denticola* até 10^{-2} e de *T. forsythensis* até 10^{-1} . No sulco gengival-controle apenas *P. gingivalis* foi encontrado até a diluição a 10^{-2} .

Na bolsa periodontal do paciente 2 (6 mm e ausência de sangramento à sondagem) o DNA de *P. gingivalis* foi detectado até a diluição a 10^{-3} , e o de *T. forsythensis* até 10^{-2} ; *T. denticola* não foi encontrado. No sítio-controle essas duas espécies foram encontradas nas amostras sem diluição.

Na bolsa periodontal do paciente 3 (7 mm e com sangramento à sondagem) constatou-se a ocorrência de *P. gingivalis* até a diluição a 10^{-3} e de *T. forsythensis* até 10^{-1} ; *T. denticola* foi encontrado apenas na amostra sem diluição. No sítio-controle apenas *P. gingivalis* foi encontrado na amostra sem diluição.

Na bolsa periodontal do paciente 4 (6 mm e com sangramento à sondagem), *P. gingivalis* ocorreu até a diluição a 10^{-2} , *T. denticola* até 10^{-1} e *T. forsythensis* não foi encontrado. Nenhuma das três espécies estudadas foi encontrada no sítio-controle.

Na bolsa periodontal do paciente 5 (6 mm e sem sangramento à sondagem) determinou-se a ocorrência de *P. gingivalis* até a diluição a 10^{-4} , de *T. denticola* até 10^{-1} e de *T. forsythensis* até 10^{-2} . No sítio-controle não foi encontrada nenhuma das três espécies estudadas.

As Figuras 3, 4 e 5 representam a amplificação por PCR dos DNA de *T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *T. denticola*.

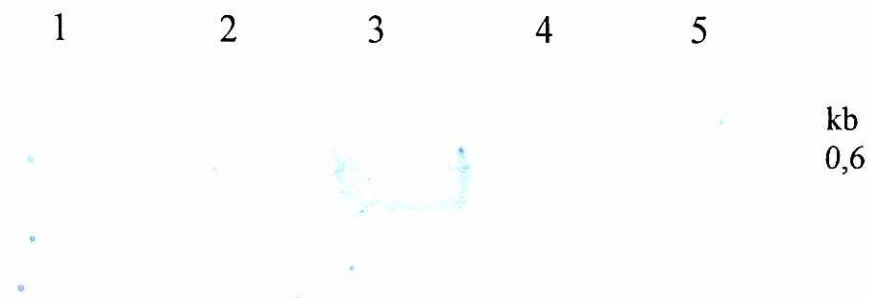


Figura 3 - Amplificação por PCR do DNA de *T. forsythensis* detectado em amostras clínicas. Coluna 1: amostra negativa; colunas 2 e 3: amostras positivas; coluna 4: controle negativo e coluna 5: marcador de peso molecular 1-kb *plus DNA ladder*

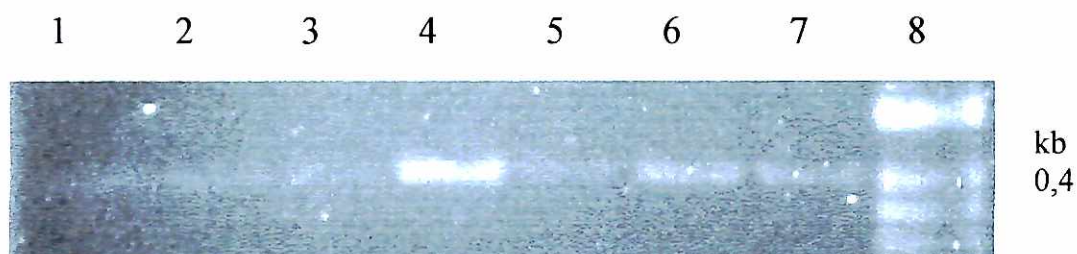


Figura 4 - Amplificação por PCR do DNA de *P. gingivalis* detectado em amostras clínicas. Colunas 1 a 7: amostras positivas; coluna 8: marcador de peso molecular 1-kb *plus DNA ladder*

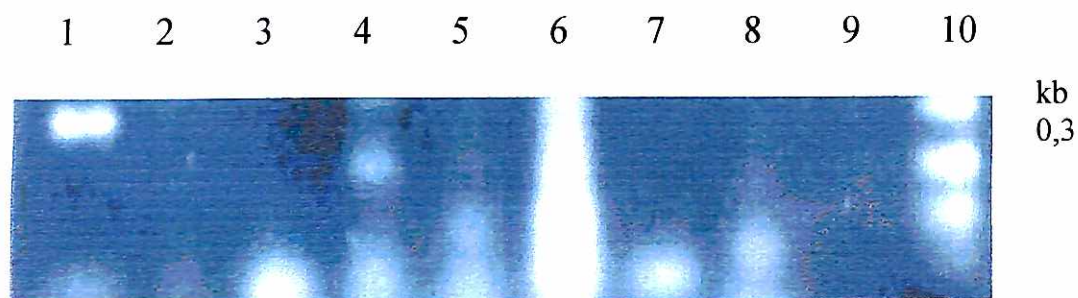


Figura 5 - Amplificação por PCR do DNA de *T. denticola* detectado em amostras clínicas. Coluna 1: amostra positiva; coluna 2: controle negativo; colunas 3 a 9 espécimes clínicos negativos; coluna 10: marcador de peso molecular 1-kb *plus DNA ladder*

6 DISCUSSÃO

De acordo com a Proposição, o objetivo do nosso trabalho foi determinar a ocorrência dos patógenos periodontais do complexo vermelho descrito em 1998 por Socransky et al. (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis*), em sulcos gengivais, bolsas periodontais e sulcos perimplantares na mesma boca, com o intuito de avaliar a importância do controle da microbiota na redução do grau de risco de desenvolvimento de perimplantite e, assim, obter longevidade dos implantes (KALYKASIS, 1994).

Essa questão está sustentada na teoria da translocação bacteriana, uma vez que microrganismos presentes em bolsas periodontais podem colonizar sulcos perimplantares da mesma boca (GOUVOUSSIS; SINDHUAKE; YEUNG, 1997; PAPAIOUANNOU; QUIRYNEN; VAN STEENBERGHE, 1996; QUIRYNEN; TEUGHELIS, 2003; RICHARD, 1998; SUMIDA et al., 2002).

Existe um consenso na literatura especializada de que a principal causa tardia da falha ou insucesso do implante é a perimplantite causada por expressiva presença de bactérias periodontopatogênicas no biofilme perimplantar.

A composição microbiana ao redor dos implantes é semelhante àquela encontrada ao redor dos dentes naturais (RAMS et al., 1984; SILVERSTEIN et al., 1994). Esta similaridade é verificada tanto em condições de saúde onde ocorre predomínio de cocos e bacilos Gram positivos facultativos imóveis com porcentagem mínima de bacilos Gram negativos móveis e de espiroquetas, como no estado de doença onde o predomínio é de espécies Gram negativas anaeróbias estritas, incluindo espiroquetas (DE LORENZO; SIMIONATO; DE LORENZO, 1997). Essas conclusões vastamente difundidas na literatura especializada puderam ser confirmadas pelos cultivos bacterianos aeróbios e anaeróbios executados em nosso

trabalho. Nos sítios-controle, onde a profundidade de sondagem variou entre 2 e 3 mm, encontramos predomínio de cocos Gram positivos, enquanto que nas bolsas periodontais, onde a sondagem variou entre 5 e 7 mm, encontramos predominantemente bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos. Nos sítios perimplantares, onde a profundidade de sondagem variou entre 2 e 5 mm, observamos a grande ocorrência de cocos Gram positivos e poucos bacilos Gram negativos.

A origem da composição bacteriana do biofilme perimplantar difere em pacientes desdentados e parcialmente desdentados. No primeiro caso, a origem dos microrganismos é a mucosa, com predomínio de cocos, enquanto que no segundo a principal fonte de origem são os sulcos periodontais, sendo que a composição do biofilme é determinada pelas condições de saúde ou doença em que estes se encontram (MOMBELLI et al., 1995; QUIRYNEN; LISTGARTEN, 1990; RICHARD, 1998).

Baseado nessas afirmações, muitos autores preconizam o rígido controle do biofilme dental antes e após a instalação de implantes, com o objetivo de manter o controle e a saúde gengival e obter longevidade do tratamento (GOUVOUSSIS; SINDHUSAKE; YEUNG, 1997; GROMATZKY; SENDYK, 2002, LISTGARTEN, 1986; RUTAR et al., 2001; SILVERSTEIN et al., 1994; SUMIDA, 2002), além do esforço em confeccionar próteses equilibradas biomecanicamente, pois a sobrecarga oclusal é um fator importante a ser considerado, apesar de ocorrerem diferenças na composição microbiana nos implantes que falham por trauma oclusal e infecção. Os implantes que falham por trauma oclusal exibem uma microbiota semelhante àquela encontrada em implantes saudáveis; por outro lado, naqueles que apresentam infecção, as bactérias são similares às encontradas em dentes com comprometimento periodontal (ROSENBERG; TOROSIAN; SLOTS, 1991).

A simples presença de bactérias em determinado tecido por si só não é suficiente para determinar obrigatoriamente a instalação da doença. É necessário que existam condições ecológicas para o aumento da freqüência de patógenos, incluindo mudanças consistentes no habitat, como o aumento do fluxo do exsudato gengival e da condição de anaerobiose, fatores responsáveis, dentre outros, pela ruptura da relação normal de comensalismo inicialmente existente entre a microbiota e o hospedeiro (DE LORENZO; AVILA-CAMPOS, 2004; DE LORENZO; SIMIONATO; DE LORENZO, 1997; HULTIN et al., 2002; LEONHARDT et al., 1993; MOMBELLI et al., 1995; VAN WINKELHOFF et al., 2002), além de existirem marcadores genéticos que influenciam de forma importante o aparecimento e a gravidade da doença (HEYDENRIJK et al., 2002).

Sabendo da íntima relação entre os microrganismos associados em comunidades como os biofilmes, Wikström et al. (1993) mostraram a existência de interação entre espécies microbianas que determinam seletivamente a composição da placa subgengival. Ashimoto et al. (1996) observaram altas relações de simbiose entre *C. rectus* e *T. denticola*, entre *B. forsythus* (atualmente *T. forsythensis*) e *T. denticola* e entre *B. forsythus* e *P. gingivalis*, sendo que estas simbioses são muito prevalentes em bolsas periodontais. Ainda deve ser considerada a importância da eventual presença de microrganismos exógenos como *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp e *Pseudomonas* spp, microrganismos oportunistas incomuns na cavidade bucal, que uma vez instalados em sulcos perimplantares, podem ter um papel importante na progressão da doença, resultando numa estratégia diferenciada de tratamento, objetivando o sucesso terapêutico (ALCOFORADO et al., 1991; LEONHARDT; RENVERT; DAHLÉN, 1999).

Em nossa pesquisa, a escolha pela determinação da ocorrência de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* foi baseada nos estudos que fortemente

relacionaram essas espécies ao aumento de profundidade de bolsa e ao sangramento à sondagem, parâmetros classicamente utilizados para determinar a atividade de doença (KASUGA; ISHIHARA; OKUDA, 2000; KLEIN; GONÇALVES, 2003; LEE et al., 1999; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002; SOCRANSKY et al., 1998).

Essas espécies distinguem-se pela expressiva atividade proteolítica e pela produção de endotoxinas que incitam a resposta inflamatória, resultando em elevada produção de mediadores que contribuem para a lise tecidual. Particularmente *P. gingivalis* destaca-se pela produção de collagenase, fosfolipase A e fosfatases ácida e alcalina, que contribuem para a reabsorção óssea. *T. denticola* também elabora collagenase, além de gelatinase e hialuronidase, sendo citotóxico para fibroblastos e epitelíócitos, tendo como característica a invasão do epitélio juncional e do conjuntivo adjacente (DE LORENZO; MAYER, 2004 a e b).

Dado o desenvolvimento bastante lento de algumas espécies bacterianas em meios de cultivo enriquecidos incubados em anaerobiose, foi possível a partir da década de 1990, utilizando o método PCR, a detecção e a identificação dessas espécies, principalmente de *T. denticola*, muito sensível a pequenos teores de oxigênio e dificilmente cultivável (MAYER; DE LORENZO, 2004; SLOTS et al., 1995).

A nossa escolha pela utilização do método PCR deu-se em função dele possuir algumas vantagens em relação à cultura e à sonda de DNA. Os cultivos, além de não conseguirem constatar a presença de espécies não cultiváveis, geralmente requerem muitos cuidados no transporte das amostras principalmente de nichos anaeróbios; além disso, demandam muito tempo para a detecção de vários patógenos periodontais. A principal limitação da sonda de DNA é o seu limite baixo de sensibilidade. Dentre as vantagens do PCR destacam-se a elevada especificidade, a alta sensibilidade e o baixo índice de reações cruzadas (ASHIMOTO et al., 1996;

AVILA-CAMPOS; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2002; KLEIN; GONÇALVES, 2003; WATANABE; FROMMEL, 1993).

Os resultados obtidos nos sítios-controle evidenciam a presença de *P. gingivalis* em três deles, sendo um em associação com *T. forsythensis*. Este fato ocorre em função de que essas bactérias periodontopatogênicas fazem parte da microbiota indígena (própria do sítio ecológico) de considerável parte dos indivíduos; assim, suas presenças, quando avaliadas apenas qualitativamente, não necessariamente indicam sinal de atividade de doença (LEITÃO, 2003; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

Em nossa pesquisa foi constatada a ocorrência dos DNA dos patógenos-alvo nas bolsas periodontais dos cinco pacientes estudados. Em três delas, sendo que duas apresentavam sangramento à sondagem, os três foram encontrados, em uma, sem sangramento à sondagem, os DNA de *P. gingivalis* e *T. forsythensis*, e na outra, com sangramento à sondagem, os de *P. gingivalis* e *T. denticola*. Esses resultados confirmam que os microrganismos do complexo vermelho estão fortemente relacionados com o processo de destruição periodontal. Indicam, também, que *P. gingivalis* foi a espécie-alvo mais prevalente nas amostras analisadas, pois foi a única que teve seu DNA detectado nas maiores diluições dos espécimes estudados, ou seja, 10^{-3} e 10^{-4} .

O fato de não termos observado a presença dos microrganismos do complexo vermelho nos sulcos perimplantares, pode estar relacionado ao fato de que em nenhum dos casos examinados existiam indícios de perimplantite; no entanto em quatro desses sítios havia sangramento à sondagem, sinal clínico referido na literatura como associado à presença dessas espécies, mas em sítios com perimplantite, o que não era o caso dos pacientes por nós examinados.

Há de se ressaltar que um exame microbiológico cujo resultado foi negativo, não expressa de modo obrigatório a ausência de microrganismos, se levarmos em consideração que falhas podem ocorrer na coleta, no transporte e no processamento laboratorial (ESTRELA; PIMENTA; ESTRELA, 2001), sendo algumas vezes necessária a repetição do exame. Também é digno de menção o fato de trabalharmos com amostras de materiais, fato que implica em certa aleatoriedade no isolamento microbiano.

O fato de não termos conseguido comprovar a ocorrência de translocação bacteriana pode ser atribuído ao fato de que as amostras analisadas neste trabalho não tenham sido coletadas de regiões com sinais de perimplantite, confirmando o consenso da literatura segundo o qual o controle da microbiota desenvolvida ao redor dos pilares intermediários instalados sobre a superfície dos implantes bucais é fundamental para obter sua saúde e longevidade.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em nosso trabalho permitem-nos concluir que:

1. o método PCR detectou a presença dos patógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis* em amostras coletadas de sulco gengival e principalmente de bolsa periodontal, possibilitando um diagnóstico microbiológico aplicável tanto na análise de risco de doença quanto na de sua confirmação e de seu grau de severidade. Não foi possível determinar a translocação bacteriana dos três patógenos presentes em bolsas periodontais e seu estabelecimento em sítios perimplantares sem sinais clínicos de perimplantite.

2. a simples constatação qualitativa da presença de microrganismos patogênicos em sítios periodontais ou perimplantares não implica necessariamente na existência de doença já instalada, porém deve indicar que o controle do biofilme dental, notadamente em pacientes parcialmente desdentados, deve passar a ser mais rigoroso, com o intuito de evitar o risco de instalação de doença perimplantar;

REFERÊNCIAS*

- ADELL, R. et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (I). A 3-year longitudinal prospective study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 1, p. 39-52, 1986.
- ADELL, R. et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Intern. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v. 10, p. 387-416, 1981.
- ALBREKTSSON, T. et al. The long term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 1, p. 11-25, 1986.
- ALBREKTSSON, T.; JANSSON, T.; LEKHOLM, U. Osseointegrated dental implants. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 1, p. 151-174, 1986.
- ALCOFORADO, G.A.P. et al. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. **J. Parodontol.**, Paris, v. 10, p. 11-18, 1991.
- 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, p. 266-273, 1996.
- AVILA-CAMPOS, M.J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 44, p. 1-5, 2002.
- BECKER, W. et al. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 5, p. 31-38, 1990.
- BRANEMARK, P.-I. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand. J. Plastic. Reconstr. Surg.**, Stockholm, v. 3, p. 81-100, 1969.
- DE LORENZO, J.L.; AVILA-CAMPOS, M.J. Relações Microbiota-Hospedeiro: Infecção e Resistência. In: DE LORENZO, J.L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 11-32.
- DE LORENZO, J.L.; MAYER, M.P.A. Componentes Bacterianos da Microbiota Bucal. In: DE LORENZO, J.L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004a. p. 33-42.
- DE LORENZO, J.L.; MAYER, M.P.A. Microbiologia das Doenças Periodontais. In: DE LORENZO, J.L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004b. p. 127-150.

*De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DE LORENZO, J.L.; SIMIONATO, M.R.L.; DE LORENZO, A. Infecção: principal causa de insucessos em implantes dentários. **Rev. ABO Nac.**, São Paulo, v. 5, p. 321-324, 1997.

ERICSSON, I. et al. A clinical evaluation of fixed-bridge restorations supported by the combination of teeth and osseointegrated titanium implants. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 4, p. 307-312, 1986.

ESPOSITO, M. et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II) Etiopathogenesis. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, p. 721-764, 1998.

ESTRELA, C.; PIMENTA, F. C.; ESTRELA, C. R. A. Testes microbiológicos aplicados à pesquisa odontológica. In: ESTRELA, C., **Metodologia Científica, Ensino e Pesquisa em Odontologia**, São Paulo; Artes Médicas, 2001, p. 196-221.

GATEWOOD, R.R.; COBB, C.M.; KILLOY, W.J. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 4, p. 53-64, 1993.

GOUVOUSSIS, J.; SINDHUSAKE, D.; YEUNG, S. Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. **Int. J. Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 12, p. 666-673, 1997.

GROMATZKY, A.; SENDYK, W. R. Preservação da osseointegração através de um programa de controle e manutenção. **Periodontia**, Piracicaba, v. 13, p. 11-16, 2002.

HEYDENRIJK, K. et al. Microbiota around root-endosseous implants: A review of the literature. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 17, p. 829-838, 2002.

HULTIN, M. et al. Microbiological finding and host response in patients with peri-implantitis. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 13, p. 349-358, 2002.

KALYKAKIS, G. et al. Clinical and microbiological status of osseointegrated implants. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 65, p. 766-770, 1994.

KASUGA, Y.; ISHIHARA, K.; OKUDA, K. Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. **Bull Tokyo Dent. Coll.**, Tokyo, v. 41, p. 109-117, 2000.

KLEIN, M. I.; GONÇALVES, R.B. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by Polymerase Chain Reaction in Subjects with Different Periodontal Status. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 74, p. 798-802, 2003.

KOKA, S. et al. Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 70, p. 141-144, 1993.

LEE, K.H. et al. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 70, p. 131-138, 1999.

LEITÃO, J. A. O. Análise, por metodologia molecular (PCR), da presença de *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em sítios perimplantares. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Santo Amaro. São Paulo, 2003.

LEONHARDT, A. et al. Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 13, p. 127-132, 2002.

LEONHARDT, A.; RENVERT, S.; DAHLÉN, G. Microbial findings at failing implants. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 10, p. 339-345, 1999.

LEONHARDT, A. et al. A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 4, p. 113- 120, 1993.

LISTGARTEN, M.A. Direct microscopy of periodontal pathogens. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 1, p. 31-38, 1986.

LISTGARTEN, M. A. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 47, p. 1-18, 1976.

LISTGARTEN, M.A.; LAI, C.H. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 70, p. 431-437, 1999.

LISTGARTEN, M.A.; LEWIS, D. W. The distribution of spirochetes in the lesion of acute necrotizing ulcerative gingivitis. An electron microscopic and statistical survey. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 38, p. 379-386, 1967.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 36, p. 177-187, 1965.

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. p. 43-54.

MENGEL, R.; SCHRÖDER, T.; FLORES-DE-JACOBY, L. Osseointegrated implants in patients treated for generalized chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis: 3- and 5- year results of a prospective long-term study. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 72, p. 977-989, 2001.

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

MOMBELLI, A. et al. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, p. 124-130, 1995.

- MOMBELLI, A. et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 2, p. 145-151, 1987.
- NESTOR, J.L. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in Progressive Adults Periodontitis. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 71, p. 948-954, 2000.
- PAPAIIOANNOU, W.; QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 7, p. 405-409, 1996.
- QUIRYNEM, M.; TEUGHEL, W. Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 33, p. 119-128, 2003.
- QUIRYNEN, M.; LISTGARTEN, M.A. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 1, p. 8-12, 1990.
- RAMS, T.E. et al. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 51, p. 529-534, 1984.
- RICHARD, P.E. Microbial colonization of the peri-implant environment and its relevance to long-term success of osseointegrated implants. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 11, p. 433-441, 1998.
- ROSENBERG, E.S.; TOROSIAN, J.P.; SLOTS, J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 2, p. 135-144, 1991.
- RUTAR, A. et al. Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 12, p. 189-195, 2001.
- SILVERSTEIN, L.H. et al. The microbiota of the peri-implant region in health and disease. **Implant. Dent.**, Baltimore, v. 3, p. 170-174, 1994.
- SOCRANSKY, S.; HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 28, p. 12-55, 2002.
- SOCRANSKY, S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, p. 134-144, 1998.
- SOCRANSKY, S. et al. The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 8, p. 275-280, 1963.
- SUMIDA, S. et al. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 17, p. 696-702, 2002.

VAN STEENBERGHE, D. Periodontal aspects of osseointegrated oral implants modum Branemark. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 2, p. 355-370, 1988.

VAN WINKELHOFF, A.J. et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 29, p. 1023-1028, 2002.

WATANABE, K.; FROMMEL, T. O. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 6, p. 1040-1044, 1993.

WIKSTRÖM, M. et al. Microbial associations in periodontitis sites before and after treatment. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 8, p. 213-218, 1993.

ANEXO A



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 134/2004

PROTOCOLO N.º 087/04 - Apresentado em 17/02/2004

Projeto de Pesquisa: "Análise por reação em cadeia da Polimerase (PCR), da presença de patógenos do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola*), em sítios perimplantares, baseada na translocação a partir de bolsas periodontais.

Pesquisadores Responsáveis: Mestrando: Nilson Roberto Armentano
Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo

Área Temática Especial: Odontologia / Implantodontia

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 em referência, a ser desenvolvido na disciplina de Implantodontia do Curso de Mestrado em Implantodontia da Universidade de Santo Amaro - SP, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo.

Situação: Aprovado em 17/02/2004

São Paulo, 18 de Fevereiro de 2004

PROF.DR. LIBERATO JOHN ALPHONSE DI DIO
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro

ANEXO B

CARTA DE INFORMAÇÃO

ANÁLISE POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DA PRESENÇA DE PATÓGENOS PERIODONTAIS DO COMPLEXO VERMELHO EM SULCOS PERIIMPLANTARES BASEADA NA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA A PARTIR DE BOLSAS PERIODONTAIS.

Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo que visa avaliar a presença dos microorganismos do complexo vermelho presentes em sulcos periimplantares baseado na translocação bacteriana a partir de bolsas periodontais.

O procedimento realizado será:

- 1- para coleta do material serão colocados cones de papel absorvente no sulco periimplantar, em sulcos periodontais saudáveis e em bolsas periodontais por 1 minuto, sendo removidos imediatamente após decorrido o tempo mencionado.
- 2- O examinador medirá a profundidade do sulco periodontal e periimplantar com sondas milimetradas de aço e de teflon respectivamente.

Este procedimento não causa qualquer tipo de risco ou malefício ao paciente examinado. Não há benefício direto para o participante da pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o C.D. Nilson Roberto Armentano que pode ser encontrado na Universidade de Santo Amaro (Rua Prof. Enéas Siqueira Neto, 340 Telefone 5929-5477). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISA) à Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 Telefone 5929-5477, Fax: 520-9160.

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e a possibilidade de deixar a participação do estudo sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente participante.

Não há despesas pessoais para o participante do estudo em qualquer fase deste estudo, incluindo exames e consultas relativas à pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Muito obrigado pela sua participação.

Prof. Nilson Roberto Armentano – Disciplina de Periodontia e Implantodontia – UNISA

ANEXO C**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“ANÁLISE POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DA PRESENÇA DE PATÓGENOS PERIODONTAIS DO COMPLEXO VERMELHO EM SULCOS PERIMPLANTARES BASEADA NA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA A PARTIR DE BOLSAS PERIODONTAIS”**.

Eu discuti com o Dr. Nilson Roberto Armentano sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de minha participação é isenta de despesas e que tenho a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente / representante legal

data / /

Assinatura da testemunha

data / /

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

data / /