

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DAGOBERTO OLIANI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 2% NO
CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE PERIODONTOPATÓGENOS NA
INTERFACE COROA/PILAR PROTÉTICO EM PRÓTESES DENTAIS
PARAFUSADAS SOBRE IMPLANTES**

SÃO PAULO

2004

DAGOBERTO OLIANI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 2% NO
CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE PERIODONTOPATÓGENOS NA
INTERFACE COROA/PILAR PROTÉTICO EM PRÓTESES DENTAIS
PARAFUSADAS SOBRE IMPLANTES**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro, para obtenção do título de mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Implantodontia, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo e co-orientação do Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos.

SÃO PAULO

2004

B. 20124006
Class. U617.69
Cutter O39 a
Patri nº 3033
Tipo entrada 2004
Nota Fiscal
Data rec. 22.1.12
Preço
Origem
Lig.

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

O39a Oliani, Dagoberto
Avaliação da eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle do desenvolvimento de periodontopatógenos na interface coroa/pilar protético em próteses dentais parafusadas sobre implantes / Dagoberto Oliani. Orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo e co-orientação do Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos . --São Paulo: 2004.
72 p.

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

1. Implantes Dentários
2. Clorexidina
3. Microbiologia
4. Próteses e Implantes I. Título

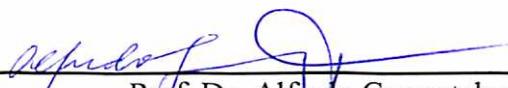
DAGOBERTO OLIANI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 2% NO
CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE PERIODONTOPATÓGENOS NA
INTERFACE COROA/PILAR PROTÉTICO EM PRÓTESES DENTAIS
PARAFUSADAS SOBRE IMPLANTES**

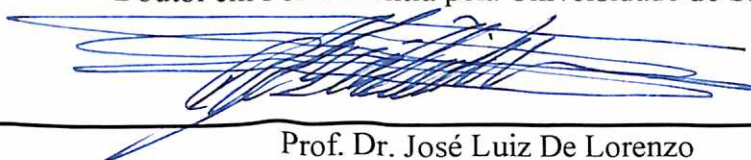
Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro,
para obtenção do título de mestre, pelo programa de Pós-
Graduação em Odontologia, área de concentração em
Implantodontia, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz De
Lorenzo e co-orientação do Prof. Dr. Mario Julio Avila-
-Campos.

APROVADA EM __/__/__

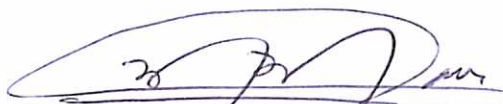
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alfredo Gromatzky
Doutor em Periodontia pela Universidade de São Paulo



Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo
Doutor em Microbiologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Márcio de Moraes
Professor Livre Docente da Área de Cirurgia Bucocomaxilofacial do Departamento de Diagnóstico
Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade de Campinas

Média Final de Aprovação: _____

Menção: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa **Sílvia Aparecida Gimenes Cantele Oliani** e à minha filha **Ana Lara Gimenes Oliani** pelo apoio, incentivo, carinho e compreensão durante todo o tempo em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo**, pela paciência, disponibilidade, sabedoria, sinceridade e compreensão demonstradas durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk**, pela oportunidade deste curso e pela transmissão, com integridade, dos seus conhecimentos e ensinamentos.

A todos os **Professores do Curso de Mestrado em Implantodontia** da UNISA pelos conhecimentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos** e sua **Equipe** do Laboratório de Anaeróbios do UCBUSP pela atenção e dedicação à nossa pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Edison Bueno**, ao **Dr. Nildemar Rubens Mendes Filho** e à **Dra. Lila Léa Cruvinel**, da CSS-CECOM Unicamp, por viabilizarem minha participação no mestrado, além do apoio e incentivo.

Aos grandes amigos do Curso de Mestrado: **Seió, Marco, Roberto, Adilson, Fábio Munhoz, Pedro, Fábio Chiarelli, Frederico, Kátia, André, Leonardo, Marcelo, Luiz**

Fernando, Maurício, Nilson, Pérsio, Tarcila, Vicente e Valdir, pela amizade, apoio e companheirismo.

Às funcionárias **Sabrina** e **Juliana** pela atenção, respeito, seriedade e dedicação durante a minha formação.

À funcionária **Luciana Costa** pela paciência, dedicação, ensinamentos e compreensão que me dedicou na realização deste trabalho.

A **Todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle da proliferação bacteriana na interface coroa/pilar protético de próteses dentais parafusadas em fixações de hexágono externo. Foram removidos as coroas e dois pilares de próteses do tipo Multi-unit de quatro pacientes portadores de dois implantes cada. Após a desinfecção da área interna de cada coroa, foram coletadas duas amostras da microbiota dessa região, com cone de papel absorvente estéril, para serem analisadas no Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após a primeira coleta, antes da recolocação das próteses, uma interface coroa/pilar protético foi tratada com solução de clorexidina a 2%, e a outra (área-controle), não. Após 30 dias, foi feita a segunda coleta em dois pacientes e após 90 dias, depois da primeira coleta, nos outros dois, para a identificação das espécies patogênicas *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythensis* em cultivos anaeróbios. Para a detecção dos DNA dessas espécies e de *Treponema denticola*, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) diretamente das amostras clínicas. Nas duas amostras coletadas após 30 dias das áreas (controles) não tratadas com clorexidina, o PCR evidenciou a presença do DNA de *T. denticola*. Das espécies-alvo da pesquisa, nas amostras tratadas com clorexidina foi identificado *F. nucleatum* na primeira (por cultivo) e nenhuma nas outras. Após 90 dias foram identificados *P. gingivalis* e *P. intermedia* em todas as amostras, embora em menor quantidade nas tratadas com clorexidina. Estes

resultados sugerem que a clorexidina pode inibir a proliferação de *P. gingivalis* e *P. intermedia*, mas não de *F. nucleatum*, na interface coroa/pilar protético nos primeiros 30 dias. No entanto, não é capaz de evitar a colonização de *P. gingivalis* e *P. intermedia* tal como observamos nos resultados das amostras de 90 dias.

Palavras-chave: Implantes Dentários; Clorexidina; Microbiologia; Próteses e Implantes.

ABSTRACT

The present study evaluated the efficiency of a 2% chlorhexidine solution in the control of bacterial proliferation in the crown / implant post interface of dental prosthesis screwed in external hexagonal fixtures. Two crowns and two prosthetic Multi-unit posts were removed from four patients, with two implants each. After disinfection of the internal crown area, two microbiota samples were collected from the internal area of each crown. The samples were collected with a sterile absorbent point and analyzed by the Laboratory of Anaerobes of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo. Before prosthesis replacement, one crown / implant post interface was treated with a 2% chlorhexidine solution and the other was not (control area). The second sample collection was performed in two patients at 30 days and in the other two patients at 90 days in order to identify the following pathogenic species: *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Tannerella forsythensis* in anaerobic cultures. The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the DNA of these species and of *Treponema denticola* directly from the clinical samples. In the two samples collected at 30 days from the areas not treated with chlorhexidine (control areas) the PCR evidenced the presence of DNA from the *T.denticola*. In the areas treated with chlorhexidine *F.nucleatum* was identified in one sample and none of the other target species of this research were identified in the other samples. At 90 days *P.gingivalis* and *P.intermedia* were identified in all samples although in a smaller amount in the ones treated with chlorhexidine. These results suggest that chlorhexidine can

inhibit the proliferation of *P.gingivalis* and *P.intermedia* but not of *F.nucleatum* in the crown / implant post interface during the first 30 days. Nevertheless it was not able to avoid the colonization by *P.gingivalis* and *P.intermedia* when the analysis was performed at 90 days.

Key words: Dental Implants; Chlorhexidine; Microbiology; Protheses and Implants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Prótese fixa metalocerâmica instalada sobre implantes	37
Figura 02 – Pilar protético do tipo Multi-unit	38
Figura 03 – Desinfecção interna da coroa protética com álcool-iodado a 0,02%..	39
Figura 04 – Região da coleta da microbiota das coroas protéticas.....	40
Figura 05 – Material transferido para placa de Petri contendo agar-sangue suplementado.....	43
Figura 06 – Placas incubadas em condição de anaerobiose.....	44
Figura 07 – Eletroforese em gel de agarose	49
Figura 08 - Desenvolvimento primário em agar-sangue suplementado, em anaerobiose, a 37°C durante 15 dias, de amostra coletada da região interna da coroa (elemento 46) 30 dias após a aplicação de clorexidina.....	52
Figura 09 – Desenvolvimento primário, em agar-sangue suplementado, em anaerobiose, a 37°C durante 15 dias, de amostra de biofilme da coroa (elemento 35), 90 dias após a aplicação de clorexidina. Predomínio de colônias pigmentadas em negro e hemolíticas.....	52

LISTA DE TABELA

Tabela 01 - Identificação das espécies bacterianas encontradas em 30 e 90 dias, na região interna da coroa de implantes de hexágono externo que receberam ou não aplicação de clorexidina em solução a 2,0%.....	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l = microlitro

μ M = micromolar

μ m = micrômetro

$^{\circ}$ C = grau Celsius

DNA = ácido desoxirribonucléico

dNTP = di-nucleotídeo fosfato (mistura de oligonucleotídeos)

el = elemento examinado, correspondente ao dente do arco dental

ICBUSP = Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IgA = imunoglobulina A

IgG = imunoglobulina G

Kb = quilobase

MgCl₂ = cloreto de magnésio

ml = mililitro

mM = milimolar

PCR = reação em cadeia da polimerase

spp = espécies

Taq = *Thermophilus aquaticus*

U = unidade

ufc = unidade formadora de colônia

V = volt (voltagem)

VMGA = Viability Maintaining Microbiostatic Medium

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 PROPOSIÇÃO.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Colonização bacteriana na região perimplantar.....	18
3.2 Infiltração e colonização de bactérias na interface coroa/pilar protético...29	
3.3 Efeito antimicrobiano da clorexidina.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	37
4.1 Seleção dos pacientes e coleta da microbiota.....	37
4.2 Isolamento bacteriano.....	43
4.3 Identificação bacteriana.....	45
4.4 Detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos DNA dos espécimes-alvo, diretamente das amostras clínicas.....	46
4.4.1 Extração dos DNA bacterianos.....	46
4.4.2 Reação de amplificação dos DNA bacterianos.....	47
4.4.3 Eletroforese em gel de agarose.....	48
5 RESULTADOS.....	50
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	67
ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Há três décadas, os implantes dentais vêm sendo utilizados como uma alternativa eficaz no tratamento de indivíduos parcial ou totalmente desdentados e seu sucesso primário se deve à comprovação da osseointegração. No entanto, em alguns casos, esta é comprometida pelo ciclo infecção/inflamação inicialmente resultante da ação de patógenos que podem colonizar a região perimplantar (ausência de controle do biofilme) ou por ação de forças anormais sobre a coroa protética. Estudo de Mombelli et al. (1987) demonstrou que as microbiotas de sítios periodontais saudáveis e doentes, ao redor de dentes naturais, atuam como reservatório para a colonização de sítios perimplantares. Assim, pacientes parcialmente desdentados que albergam periodontopatógenos correm o risco de terem seus implantes colonizados por esses microrganismos, podendo desenvolver uma doença perimplantar.

No entanto, esse risco também pode ocorrer em função da inexistência de uma perfeita adaptação entre o implante e seus componentes protéticos, pois esta situação favorece a colonização bacteriana, podendo levar ao desenvolvimento de patologia perimplantar e, portanto, podendo colaborar para a perda da osseointegração (GROSS; ABRAMOVICH; WEISS, 1999; JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; STEFLIK et al., 1991; VIDIGAL JR. et al., 1995). Em longo prazo, existe sugestão de que a atividade patogênica de vários microrganismos que se instalam na região vizinha à interface do implante com sua respectiva conexão protética deva ser considerada como fator de risco para doença perimplantar (BECKER et al., 1990). Esta ocorrência ainda não foi devidamente comprovada; de qualquer maneira, ela é responsável por manifestações

clínicas extremamente indesejáveis como o mau odor e o mau gosto freqüentemente queixados pelos pacientes.

O conhecimento da ocorrência de infiltração de material orgânico, incluindo microrganismos, entre os componentes do implante bucal, teve início a partir do trabalho publicado por Traversy e Birek (1992).

Quirynen e van Steenberghe (1993) confirmaram a presença de quantidades significantes de microrganismos na porção apical de 18 parafusos de implantes Branemark regulares que tinham estado em função por três meses.

Segundo Dottori; Sendyk e Gromatzky (2003), existe sempre a colonização bacteriana na interface pilar intermediário/implante, sendo que a quantidade de passagem de fluidos e da colonização de microrganismos pode variar entre os vários sistemas de implantes.

Na Implantodontia, assim como na Periodontia, análises microbiológicas devem ser feitas para obtermos conhecimento de quais os tipos de bactérias que colonizam a superfície dos implantes e dos dentes remanescentes, para melhor garantir o sucesso de um tratamento implantológico em pacientes desdentados, parciais ou totais. Assim, as análises microbiológicas podem ser indicadas para a predição de risco de doença nos casos em que as condições clínicas parecem satisfatórias. Já as análises microbiológicas, baseadas em cultivo, são fundamentais nos casos de mucosite e de perimplantite, pois possibilitam a execução dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos, contribuindo decisivamente para a tentativa de erradicação do(s) patógeno(s) e para o controle da infecção (LEITÃO, 2003; SILVA, 2003).

Métodos moleculares tornaram-se disponíveis, a partir da década de 1990, para a identificação e discriminação de espécies bacterianas periodontopatogênicas tais

como *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, entre outras, representando uma excelente opção para o monitoramento microbiológico na área da Implantodontia. Dentre esses métodos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem se destacando pela sua rapidez e especificidade na detecção de microrganismos envolvidos em diferentes processos infecciosos bucais (SLOTS et al., 1995).

Na Implantodontia atual, recomendam-se o uso adequado de técnicas de assepsia e a utilização de agentes antimicrobianos como medidas preventivas, visando à diminuição ou controle de microrganismos que podem colonizar os implantes dentais, evitando com isto a produção de substâncias bacterianas que agredem os tecidos do hospedeiro.

A clorexidina está consagrada, após 20 anos de uso, como a melhor substância no controle químico da placa bacteriana e, por isso, o interesse científico voltado para ela é compreensível, pelo vasto potencial de sua eficácia e utilização ainda a ser explorado nas diversas formas de uso (DOTTORI et al., 2002).

Nosso trabalho, tendo como objetivo avaliar a eficácia da solução de clorexidina a 2% incluída nas fixações internas de implantes dentais, já estava em fase de execução quando Groenendijk et al. (2004) publicaram um estudo no qual investigaram os efeitos microbiológicos e clínicos da solução a 0,2%. Os autores obtiveram resultados indicando que, depois da cirurgia da primeira fase, é comum a contaminação dos espaços internos das fixações e que a aplicação dessa solução na segunda fase cirúrgica inibe o desenvolvimento ou a aquisição de bactérias nessas fixações. Ressaltamos que, embora haja semelhanças quanto ao propósito de pesquisa, nossos

estudos se diferenciam quanto à metodologia, como melhor explicaremos no capítulo referente à Discussão.

2 PROPOSIÇÃO

Baseado nos comentários apresentados na Introdução, este estudo teve o propósito de avaliar a eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle da proliferação bacteriana 30 e 90 dias após sua aplicação na região da interface coroa/pilar protético dos implantes além de analisar, de forma qualitativa, por cultivos e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* em amostras coletadas da região interna da coroa protética de implantes do tipo hexágono externo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Por finalidade didática, dividimos este capítulo em três blocos de assuntos, sendo estes: colonização bacteriana na região perimplantar, infiltração e colonização de bactérias na interface coroa/pilar protético e efeito antimicrobiano da clorexidina.

3.1 Colonização Bacteriana na Região Perimplantar

O comportamento dos implantes instalados na boca é muito semelhante ao de um dente, porém não existe o ligamento periodontal, ou seja, não existe inserção. O comportamento dos tecidos, em ambos os casos, também é muito semelhante. Um implante mal higienizado vai se comportar como um dente mal higienizado. O acúmulo de placa bacteriana (biofilme) na região perimplantar vai levar inicialmente a um estado inflamatório chamado mucosite perimplantar, clinicamente muito semelhante à gengivite, visto que ocorre inflamação dos tecidos moles, sem que ocorra perda óssea. Na ausência de controle adequado, o processo pode evoluir para perimplantite, caracterizada por inflamação e perda óssea ao redor do implante, levando à sua desestabilização (DE LORENZO; CAVENAGUE, 2004).

A semelhança também é evidente do ponto de vista microbiológico; como na periodontopatia, o aumento gradativo do número de bactérias instaladas no ambiente

perimplantar promove severas alterações nesse habitat e, conseqüentemente, ocorrem os mesmos tipos de sucessões bacterianas observadas na transição de periodonto clinicamente saudável para gengivite e de gengivite para periodontite (DE LORENZO, 1996).

Visto que os problemas infecciosos são considerados como importante causa de insucesso dos implantes dentais (DE LORENZO; SIMIONATO; DE LORENZO, 1997), é grande o número de pesquisas processadas no sentido de estabelecer comparações entre as microbiotas instaladas ao redor de implantes sadios e as existentes nos comprometidos por inflamação e reabsorção óssea, para determinar os patógenos responsáveis pelo risco de insucesso. Estima-se que aproximadamente 30 gêneros e mais de 500 espécies bacterianas constituam o biofilme dental subgengival (DE LORENZO, 2004).

As oito espécies bacterianas alvos deste trabalho são referidas por De Lorenzo e Mayer (2004) a partir de suas características básicas:

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: cocobacilo Gram negativo, reto ou encurvado, com extremidades arredondadas. Anaeróbio facultativo. Única espécie bucal do gênero, seu nicho primário é a região subgengival; coloniza mucosas e compõe também a microbiota da orofaringe humana. Relacionada principalmente com a etiologia da periodontite agressiva, mas também com casos severos de periodontite crônica. É a única espécie bucal que elabora leucotoxina, provavelmente seu principal fator de virulência. Fora da boca tem sido descrita como causadora de endocardite infecciosa, abscessos cerebrais e subcutâneos, osteomielite e otite média.

- *Campylobacter rectus*: bacilo Gram negativo reto, curvo ou helicoidal, com um flagelo polar que garante sua mobilidade. Microaerófilo, não utiliza carboidratos nem requer sangue ou soro para seu metabolismo, mas formiato ou fumarato. Espécie isolada de sulco gengival, canais radiculares de dentes sintomáticos e, principalmente, de bolsas periodontais; é admitida como periodontopatógena, devido à frequência aumentada em bolsas ativas e progressivas associadas com inflamação gengival e também por causar perda óssea quando inoculada em animais gnotobiotas.

- *Eikenella corrodens*: bacilo Gram negativo pequeno, reto ou curvo. Anaeróbio facultativo assacarolítico. Espécie endógena da boca e da nasofaringe de humanos, é isolada de lesões periodontais e causa reabsorção óssea alveolar em ratos gnotobiotas. Já foi isolada de casos de endocardite, infecções da cabeça e pescoço, abscessos cerebrais e abdominais, osteomielite, meningites e peritonites.

- *Fusobacterium nucleatum*: bacilo Gram negativo. Anaeróbio estrito relativamente aerotolerante. É proteolítico (produz indol) e dotado de pouca atividade fermentativa. Considerado um agente de união importante entre os colonizadores iniciais e os tardios da placa subgengival. Seu principal habitat bucal é o ambiente subgengival, sendo isolado, em altos números, de sítios com gengivite e periodontite severas.

- *Porphyromonas gingivalis*: cocobacilo Gram negativo. Anaeróbio estrito relativamente aerotolerante. Apresenta limitada capacidade de fermentar carboidratos e é a mais proteolítica dentre as bactérias Gram negativas da microbiota bucal. Produz proteases, como a collagenase, e fosfolipase. Desenvolve colônias negro-pigmentadas. Está fortemente associado com lesões severas de periodontite crônica.

- *Prevotella intermedia*: bacilo Gram negativo. Anaeróbio estrito. Fermenta alguns carboidratos e é proteolítico, apresentando alta atividade de peptidase; digere gelatina e produz indol. Suas colônias apresentam-se pigmentadas geralmente em negro. Habita o sulco gengival com evidências de sua participação na etiologia de gengivites, principalmente nas que podem ocorrer na gestação e em outras alterações hormonais e na ulcerativa necrosante (GUN); também é isolado de bolsas periodontais que não apresentam perda óssea recente.

- *Tannerella forsythensis*: bacilo Gram negativo fusiforme, podendo apresentar morfotipos pleomórficos como filamentos longos. Anaeróbio estrito com metabolismo sacarolítico. Apresenta desenvolvimento fastidioso e suas colônias não desenvolvem pigmento escuro. Tem expressiva atividade do tipo tripsina e está fortemente relacionado com periodontites severas.

- *Treponema denticola*: espiralado Gram negativo. Anaeróbio estrito muito sensível ao oxigênio. Obtém energia metabolizando aminoácidos ou fermentando carboidratos. Tem grande capacidade de se mover em ambientes com alta viscosidade, o que lhe permite que migre pelo fluido gengival e penetre a barreira epitelial atingindo o tecido conjuntivo gengival. Em cortes histopatológicos de casos de periodontite, são encontrados espiroquetas no epitélio juncional, no conjuntivo adjacente e na proximidade do tecido ósseo alveolar. Seu número aumenta expressivamente em bolsas periodontais profundas. É citotóxico para fibroblastos e células epiteliais. Aglutina e lisa eritrócitos e também hidrolisa proteínas do hospedeiro como anticorpos IgA e IgG, albumina sérica, fibrinogênio, transferrina e laminina.

Adell et al. (1981) realizaram um estudo, com a duração de 15 anos, em 2.768 implantes colocados em 371 pacientes que tinham sido altamente incentivados a fazer um controle de higiene bucal; a placa bacteriana, em quadrantes em torno da junção do intermediário protético com a gengiva, foi encontrada em 6,7%. Durante o primeiro ano após a colocação da coroa protética, houve perda óssea de 1,5 mm e anualmente perda de 0,1 mm. Na opinião dos autores, os insucessos em Implantodontia podem ocorrer devido a falhas técnicas na instalação do implante, à força excessiva oclusal nele aplicada (ADELL et al., 1981) e ao acúmulo de placa bacteriana na sua superfície externa (VAN STEENBERGHE et al., 1993).

Rams e Link (1983) relacionaram bactérias com doença perimplantar, analisando por microscopia eletrônica de transmissão o material colhido de três sítios ao redor de implantes que apresentavam sangramento e bolsas maiores que 10 mm de profundidade. Observaram predominância de bactérias Gram negativas, principalmente espiroquetas.

Com o propósito de comparar as microbiotas perimplantar e periodontal, Lekholm et al. (1986) examinaram as condições dos tecidos moles em torno dos pilares protéticos transmucosos de dez pacientes parcialmente desdentados portadores de próteses fixas. Biópsias indicaram que cerca de 80% dos sítios dentais e perimplantares continham apenas pequeno infiltrado de células inflamatórias. Os morfotipos bacterianos encontrados nas placas supra e subgengivais dos dentes naturais sadios eram similares aos isolados da superfície dos implantes bem sucedidos, havendo predominância de cocos e bacilos Gram positivos imóveis e ausência ou números baixíssimos de espiroquetas.

Quiryne e Listgarten (1990) compararam a microbiota de implantes e de dentes em pacientes parcialmente desdentados. Na superfície dos implantes, os autores encontraram 65,8% de cocos; 2,3% de bacilos móveis; 2,1% de espiroquetas e 30% de outras bactérias, frequências muito similares às encontradas na superfície dos dentes (56% de cocos; 5% de bacilos móveis; 3,6% de espiroquetas e 35% de outras bactérias). Entretanto, quando esta comparação foi feita em pacientes totalmente desdentados, o resultado foi significativamente diferente, visto que ao redor dos implantes foi observado maior número de cocos (71,3%), poucas células móveis (0,4%) e 0% de espiroquetas. Este resultado sugere a contaminação dos implantes por bactérias translocadas dos dentes remanescentes. Este estudo mostrou que a presença de dentes influencia a composição da placa subgengival ao redor dos implantes, presumivelmente servindo como um reservatório de formas bacterianas ausentes em locais desprovidos de dentes.

Rosemberg; Torosian e Slots (1991) examinaram as diferenças entre as microbiotas instaladas em um implante que havia fracassado devido à trauma oclusal e as instaladas em um que havia fracassado devido à infecção bacteriana. Os pesquisadores concluíram que os implantes perdidos devido ao trauma oclusal são colonizados por morfotipos bacterianos similares aos encontrados em implantes saudáveis, enquanto que a microbiota envolvida com a infecção perimplantar é similar à de dentes periodontalmente comprometidos.

Bauman et al. (1992) afirmaram, com base em levantamento bibliográfico, que a microbiota ao redor de implantes sem alterações perimplantares é muito semelhante à que reside no sulco gengival saudável, formada basicamente de bactérias Gram

positivas, cocos, espiroquetas e bacilos imóveis. Já, nos locais onde há envolvimento perimplantar, a microbiota residente possui grande quantidade de bactérias móveis, além de patógenos específicos como *Bacteroides intermedius* e *Bacteroides gingivalis*, posteriormente reclassificados como *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente.

Mombelli et al. (1995) analisaram a presença de patógenos periodontais na microbiota de implantes expostos ao ambiente bucal entre três e seis meses, em 20 pacientes com doença periodontal previamente tratada. Em muitos pacientes, encontraram altas prevalências de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Fusobacterium* spp, *Campylobacter rectus* e espiroquetas, mas não de *A. actinomycetemcomitans*, durante todo o período de observação.

Mombelli e Lang (1998) sugeriram que existem cinco linhas de evidência sustentando a idéia de que os microrganismos desempenham o principal papel na causa da perimplantite. São elas: experimentos de formação de placa em humanos podem induzir a uma mucosite; a demonstração das diferenças qualitativas e quantitativas na microbiota associada com implantes bem sucedidos e perdidos; colocação de ligaduras em animais para induzir à formação de placa, conduzindo à perimplantite; terapia antimicrobiana melhorando a condição de pacientes com perimplantite; e a evidência de que o nível de higiene bucal tem impacto no sucesso do tratamento implantológico em longo prazo. A freqüência total de perimplantite parece ser na média de 5 a 10% dos casos. Os autores sugeriram certos parâmetros de diagnóstico como radiografias, sondagem do implante, mobilidade, supuração, índices clínicos e microbiológicos. Cultura bacteriana, sondas de DNA, reação em cadeia de

polimerase (PCR) e testes enzimáticos para monitorar a microbiota subgingival têm sido propostos para determinar um elevado risco de doença periodontal ou perimplantite.

Lee et al. (1999) examinaram o impacto do tipo de implante, do tempo de colocação de carga, do histórico de infecções perimplantares ou periodontais, sobre a microbiota perimplantar de pacientes que apresentavam implantes dentais múltiplos ou unitários. Os microrganismos de interesse para os autores foram *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* (na atualidade, *Tannerella forsythensis*). Os resultados mostraram que os implantes estavam colonizados principalmente por estreptococos bucais, *Capnocytophagae*, *Veillonella parvula*, *Peptostreptococcus micros* (atualmente *Micromonas micros*) e *Fusobacterium nucleatum*. As espécies *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *C. rectus* foram detectadas em poucos pacientes. A microbiota encontrada em implantes com coroas e dentes com coroas foi similar. A complexidade da microbiota aumentou em relação direta com o tempo, mas a colonização por patógenos periodontais, incluindo espécies complexas, foi elevada em pacientes com doença periodontal prévia. Não foram observadas diferenças na microbiota dos implantes após o primeiro e o segundo estágio cirúrgico, ou entre implantes que suportavam próteses múltiplas ou unitárias. A presença de coroas teve um mínimo impacto na microbiota perimplantar, enquanto que a história de periodontite teve maior impacto nessa microbiota do que o tempo de carga do implante. A principal influência sobre a microbiota perimplantar foi, talvez, a microbiota dos dentes remanescentes. *P. gingivalis* e *B. forsythus* colonizaram algumas regiões em torno de implantes com osseointegração bem sucedida.

Em materiais colhidos de 41 casos de perimplantite, Listgarten e Lai (1999) confirmaram a similaridade entre a microbiota mais freqüentemente isolada de sítios com perimplantite e com periodontite que não responde ao tratamento periodontal convencional ou recorrente (*Bacteroides forsythus*, espiroquetas, *Fusobacterium* spp, *Peptostreptococcus micros* e *Porphyromonas gingivalis*).

van Winkelhoff et al. (2000) estudaram a seqüência de colonização de bolsas perimplantares em 20 pacientes parcialmente desdentados. No exame inicial, as espécies mais isoladas foram *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. micros*. Ressalta-se que *B. forsythus* foi isolado de nove pacientes, *P. gingivalis* de três e *A. actinomycetemcomitans* de dois.

Sumida et al. (2002) examinaram a colonização por bactérias periodontopatogênicas e a sua transmissão de bolsas periodontais para sulcos de implantes osseointegrados. A utilização de PCR detectou taxas de 80% de *P. gingivalis*; 53,3% de *P. intermedia*; 46,7% de *A. actinomycetemcomitans*; 60% de *B. forsythus* e 40% de *T. denticola*. As colonizações de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* foram estatisticamente correlacionadas com bolsas periodontais e regiões dos sulcos dos implantes. A transmissão de *P. gingivalis* e de *P. intermedia* pareceu ser da bolsa periodontal para a região perimplantar. A eliminação destes patógenos periodontais da cavidade bucal dos pacientes, por tratamento periodontal executado anteriormente à colocação dos implantes, pode inibir a colonização dos mesmos nos sítios perimplantares, reduzindo o risco de perimplantite.

Silva (2003) fez análise das microbiotas cultiváveis de sítios perimplantares com e sem perda óssea. O autor concluiu que as espécies bacterianas

periodontopatogênicas isoladas da grande maioria, tanto das amostras perimplantares coletadas de casos onde não se constatou perda óssea quanto nos casos que apresentavam profundidade de sondagem superior a 5,0 mm, onde foi encontrada maior concentração, foram *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium* spp.

Leitão (2003), em sua pesquisa, concluiu que o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) é eficaz para detectar a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em sulcos perimplantares, mesmo naqueles que se apresentaram com reduzidas profundidades. Além disso, constatou que a presença destes microrganismos em sítios clinicamente saudáveis pode ser interpretada como indicadora de risco à doença perimplantar.

A técnica de PCR, bem como as sondas genéticas, além de detectarem o DNA de microrganismos não mais viáveis, são particularmente valiosas para a detecção de microrganismos não cultiváveis ou dificilmente cultiváveis, como os treponemas bucais, e também para a identificação de espécies não distinguíveis pelo perfil bioquímico, como *P. intermedia* e *P. nigrescens* (DE LORENZO; MAYER, 2004).

Dentre os microrganismos mais reconhecidos como periodontopatogênicos, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* e alguns outros, estes são bacilos ou espiralados Gram negativos anaeróbios estritos. Outros microrganismos implicados são *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (facultativo), *Micromonas micros* (coco Gram positivo) e *Campylobacter rectus* (microaerófilo). A patogenicidade dessas espécies deve-se à produção de uma série de fatores enzimáticos e tóxicos que agredem diretamente as diferentes estruturas periodontais e à elaboração de importantes fatores

de evasão às defesas do hospedeiro (DE LORENZO; MAYER, 2004; DE LORENZO; SIMIONATO; DE LORENZO, 1997).

Também deve ser considerada a importância da capacidade dos catabólitos bacterianos incitarem as células de defesa local à produção e excreção de mediadores da resposta imuno-inflamatória (proteases lisossômicas, citocinas e prostaglandina, entre outros), que, assim produzidos em grande escala, contribuem para aumentar o dano tecidual iniciado pelos patógenos (DE LORENZO; AVILA-CAMPOS, 2004; DE LORENZO; MAYER, 2004).

Mombelli e Mericske-Stern (1990) mostraram que visitas de retorno regulares e terapias de suporte por um período de cinco anos mantiveram uma microbiota predominante de cocos e isenta de espiroquetas ao redor de implantes estáveis, o que sugere uma microbiota associada à saúde dos tecidos perimplantares.

Assim, a perimplantite pode ser considerada como uma infecção sítio-específica induzida por microrganismos causadores de periodontite em dentes naturais. Conseqüentemente, o risco da ocorrência de infecção perimplantar pode ser contrabalançado por cuidadoso controle da infecção e da inflamação dela resultante, tanto pelo paciente (higienização) como pelo profissional (controles periódicos dos sítios perimplantares e da situação periodontal dos dentes remanescentes) (DE LORENZO e CAVENAGUE, 2004; GROMATZKY; SENDYK, 2002; LEITÃO, 2003).

3.2 Infiltração e Colonização de Bactérias na Interface Coroa/Pilar Protético

Em um estudo retrospectivo de perda de implantes de vários tipos, Stefflik et al. (1991) concluíram que uma das causas de perda de implantes pode ser a má adaptação do implante com sua respectiva conexão protética, visto que nesta área pode ocorrer desenvolvimento bacteriano e comprometimento dos tecidos periodontais adjacentes, levando o tratamento ao fracasso.

O estudo de Traversy e Birek (1992) demonstrou que ocorre infiltração bidirecional de fluidos e/ou penetração de *Streptococcus sanguis* (espécie detectada em altos números no biofilme dental, na atualidade classificada como *Streptococcus sanguinis*) na interface pilar/implante do sistema Branemark.

A prótese sobre implante continua a se desenvolver como um método viável e freqüentemente preferível de substituição dentária. McCarthy e Guckes (1993), ao utilizarem o sistema Branemark (Nobelpharma USA, Chicago, Ill) de implantes odontológicos, observaram um problema associado com dois pilares de conexão-padrão que são semelhantes no desenho. Quando um pilar de conexão angulado é utilizado, os pacientes freqüentemente se queixam de um gosto ruim ou mau odor associado com o pilar de conexão. Isto provavelmente é resultado de infiltração de resíduos e de colonização bacteriana conjunta no estreito espaço de acesso do parafuso do pilar de conexão. Podem se acumular resíduos significantes após um período curto. Também existe um espaço entre o cilindro de ouro e o cilindro do pilar de conexão quando o pilar de conexão Estheticone (Nobelpharma) é utilizado. Quando colocado subgengivalmente, este espaço pode causar um abscesso periodontal.

Para Ferrari et al. (1994), a maior parte dos estudos sobre a adaptação marginal tem sido feita *in vitro*; apenas poucos estudos investigaram a adaptação marginal e a microinfiltração de coroas *in vivo*. No estudo executado pelos autores, coroas de ouro foram preparadas e cimentadas sobre pilares e suas discrepâncias marginais foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, de acordo com os métodos de réplica de moldagem e corte transversal. Três observadores mediram as discrepâncias marginais de cada coroa. A variância interobservadores da precisão foi de 10 μm pelo método de réplica de moldagem e 15 μm pelo corte transversal. Os valores médios foram 124,16 μm pelo método de réplica de moldagem e 129,79 μm pelo corte transversal. Os dois métodos testados demonstraram resultados semelhantes.

Persson et al. (1996) examinaram a microbiota presente na superfície interna dos componentes de 28 implantes Branemark em dez pacientes parcialmente desdentados que haviam sido tratados com uma prótese parcial fixa cada, que estavam em função em períodos de um a oito anos. Amostras bacterianas foram obtidas das várias superfícies internas do sistema de implante. A estimativa e a identificação da espécie mais predominante foram executadas em placas de agar-sangue. A identificação foi baseada em coloração de Gram, sensibilidade ao oxigênio e provas bioquímicas. Superfícies internas de diferentes componentes do implante Branemark, depois de permanecerem em função durante variados períodos na cavidade bucal, abrigaram consistentemente uma microbiota heterogênea e anaeróbica. As amostras individuais mostraram uma grande variação. A microbiota consistiu principalmente de estreptococos facultativos, bastonetes Gram positivos anaeróbicos tais como *Propionibacterium* spp, *Eubacterium* spp e *Actinomyces* spp, além de bastonetes Gram

negativos anaeróbicos incluindo espécies de *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyromonas*. Há razões para sugerir que a presença de bactérias é o resultado de uma contaminação do implante e dos componentes de pilar protético durante a primeira ou segunda etapa cirúrgica da instalação do implante e/ou de uma transmissão de microrganismos do ambiente bucal durante a função subsequente à instalação da prótese fixa. Clinicamente os tecidos moles, ao redor dos pilares protéticos de titânio, eram saudáveis na maioria dos casos. A inflamação na porção marginal da mucosa perimplantar foi observada só em alguns locais (5%). A placa bacteriana, entretanto, foi achada em 28% das superfícies dos pilares protéticos. Todas as sete instalações ligadas a pilares protéticos do tipo Estheticone tiveram, ao seu redor, perda marginal de osso variando entre uma e duas roscas do implante. Na amostra inteira não havia relacionamento aparente entre o tempo do implante em função e a perda marginal de osso.

O objetivo do estudo de Jemt e Book (1996) foi correlacionar estatisticamente medidas *in vivo* da desadaptação protética e mudança do nível ósseo marginal em implantes colocados na maxila desdentada. Dois grupos, cada um com sete pacientes, foram observados por um ano ou retrospectivamente por quatro anos, do período de cinco anos, após o segundo estágio cirúrgico. Medidas da desadaptação protética foram feitas pela técnica fotogramétrica tridimensional, e os níveis do osso marginal foram medidos a partir de radiografias intrabucais. Os resultados mostraram que nenhuma das próteses apresentou desadaptação completamente passiva aos implantes *in vivo*. Além disso, distorções similares das próteses foram encontradas nos dois grupos, indicando que os implantes pareciam estáveis e não se moviam, mesmo

após vários anos em uso. A máxima variação da distorção tridimensional dos pontos do cilindro central foi por volta de 275 μm em ambos os grupos. A desadaptação média do ponto central foi de 111 (SD 59) e 91 (SD 51) para grupos de um e cinco anos, respectivamente. Não foi observada nenhuma correlação estatística ($P > .05$) entre a mudança de nível ósseo marginal e parâmetros diferentes da desadaptação da prótese nos dois grupos. O estudo indicou que uma certa tolerância biológica para desadaptação pode estar presente. O grau de desadaptação relatado neste estudo foi clinicamente aceitável em relação à perda óssea marginal observada.

A microfenda existente na interface implante/pilar protético pode ser capaz de causar odor desagradável, além de inflamação dos tecidos perimplantares. Gross, Abramovich e Weiss (1999), comparando cinco sistemas de implantes (Branemark System; Sulzer Calcitec; 3i; ITI e Steri-Oss), encontraram microfendas em todas as composições implante/pilar protético. Os resultados indicaram que fluidos e pequenas moléculas são capazes de penetrar na estrutura interna de todas as composições analisadas, contribuindo em parte para os sinais clínicos de mau odor e perimplantite.

A placa bacteriana se acumula com maior consistência em áreas retentivas. O desenho de alguns implantes apresenta locais favoráveis ao acúmulo de placa bacteriana, geralmente na interface implante/pilar, interface prótese/pilar protético, sobre a superfície do pilar, no implante e na prótese. O tamanho da fenda implante/pilar contribui para o acúmulo de placa e produz um meio ideal para a colonização bacteriana (O'MAHONY; MACNEILL; COBB, 2000).

Piatelli et al. (2001) fizeram um estudo *in vitro* comparativo entre pilares protéticos parafusados (grupo 1) e cimentados (grupo 2), verificando a penetração de fluidos e bactérias na parte interna de 12 implantes. A análise por microscopia eletrônica de varredura comprovou a presença de microfenda entre implante e pilar protético no grupo 1, que variou de 2 a 7 μm . Já no grupo 2, a microfenda foi de 7 μm ; no entanto, ela estava sempre vedada por cimento. Em todos os implantes do grupo 1 houve presença de bactérias em sua porção interna. Em oposição, nenhum dos implantes do grupo 2 apresentaram contaminação bacteriana. Os autores concluíram que os pilares protéticos cimentados oferecem melhores resultados em relação à penetração de fluidos e bactérias na parte interna dos implantes.

A penetração de placa bacteriana na junção implante/pilar protético foi relatada em estudos *in vitro* e *in vivo* (QUIRYNEN et al., 1994; QUIRYNEN; VAN STEENBERGHE, 1993). Essa placa é de difícil remoção pelos recursos convencionais e teria o papel de induzir infecção bacteriana que, por sua vez, induziria a perimplantite (LEME et al., 2002).

3.3 Efeito Antimicrobiano da Clorexidina

O digluconato de clorexidina, um composto biguanídico, é largamente utilizado na odontologia devido à sua atividade antimicrobiana. O efeito antiplaca da clorexidina é resultado da natureza dicatiônica de sua molécula, que permite a esse agente a

propriedade de persistência do efeito antimicrobiano na superfície do dente devido à sua liberação gradativa (substantividade), como função de seus efeitos bactericida e bacteriostático. Apesar de outros agentes antiplaca demonstrarem efeitos puramente imediatos ou persistência limitada, o grau de persistência da clorexidina na superfície dental é a base de sua eficácia clínica. A natureza catiônica da molécula de clorexidina é a razão do manchamento extrínscico do dente, o efeito colateral mais comum associado com o uso desse agente. O manchamento dental parece ser resultado de uma precipitação de reação local entre o limite dental da clorexidina e o do cromógeno encontrados nos restos de comida e bebidas. A natureza catiônica da molécula de clorexidina também significa que a atividade desse agente é rapidamente reduzida na presença de agentes aniônicos, especificamente aqueles encontrados em certas pastas dentais; esse cuidado é necessário quando usada uma pasta contendo clorexidina em sua formulação. Entendendo as propriedades clínicas da molécula de clorexidina, pode-se explicar a grande quantidade de dados clínicos e a eficácia do uso de clorexidina no controle bacteriano (JONES, 1997).

Numa comparação entre duas concentrações de clorexidina em solução para enxágüe bucal feita por Jenkins; Addy e Newcombe (1989), os autores concluíram que a concentração a 0,2% obteve melhores resultados na redução da placa e inflamação gengival e estabilidade dentária que as apresentadas pela concentração a 0,1%.

Quando utilizada em altas concentrações, a clorexidina possui efeito bactericida e, em baixas concentrações, exerce efeito bacteriostático pela inibição de enzimas glicolíticas e proteolíticas, não tendo diferenças em relação a efeitos colaterais, independentes de sua concentração (ERNST et al., 1998).

Keltjens et al. (1992) determinaram que aplicação diária de clorexidina em verniz a 40% ou em gel a 1% faz diminuir significativamente a presença de *Streptococcus mutans* em dentes pilares de *overdentures*. O gel de clorexidina causou redução do acúmulo de placa bacteriana e do sangramento gengival por uma semana, mas não apresentou efeito em longo prazo.

Eaton et al. (1997) compararam os efeitos de um bochecho contendo digluconato de clorexidina a 0,12% e de um placebo sobre a placa bacteriana e a inflamação gengival, num período de três meses. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial para conduzir controle clínico periodontal associado com práticas dentais comuns. A contagem de sangramento gengival da boca inteira caiu de 0,56 para 0,42 no grupo tratado com digluconato de clorexidina, mas permaneceu inalterado (0,54-0,55) no grupo-placebo. Concluiu-se que o antisséptico bucal à base de digluconato de clorexidina a 0,12% reduziu a acumulação de placa para 28% e a inflamação gengival para 25%, num período de 12 semanas.

O uso da clorexidina é seguro pois a ausência de toxicidade resulta em boa tolerância dos tecidos, motivo pelo qual não apresenta efeitos colaterais graves. Apresenta moléculas de grande estabilidade, excretadas pelas vias normais, não havendo evidências de permanência no organismo, penetrando em mínima quantidade nas mucosas bucais. A clorexidina tem sua principal indicação em casos de indivíduos com comprometimento motor, em pós-operatórios, ou em quaisquer situações onde a limpeza mecânica esteja temporariamente suspensa (DOTTORI et al., 2002).

Groenendijk et al. (2004) realizaram um estudo no qual investigaram os efeitos microbiológicos e clínicos da clorexidina a 0,2% incluída nas fixações. Doze pacientes

tiveram 46 fixações implantadas. Na segunda etapa cirúrgica, tomou-se uma amostra da microbiota (amostra do ponto de partida) das partes internas das fixações. Então, foi aplicada uma solução de clorexidina a 0,2% no espaço interno de 23 fixações (grupo de prova) e nas outras 23 instalações foi aplicado soro fisiológico (grupo de controle). Foram instalados os pilares protéticos e, semanalmente, foram controlados, os índices gengivais, o índice de placa e o fluxo de fluido gengival. Depois de seis semanas, tomou-se uma segunda amostra da microbiota da parte interna das fixações. O número de bactérias no grupo de controle foi significativamente mais alto do que no grupo de prova. No início, detectaram-se bactérias viáveis em 46% das fixações. Depois de seis semanas, bactérias viáveis foram encontradas em 87% delas. Os resultados indicaram que a aplicação de uma solução de clorexidina a 0,2%, na segunda fase cirúrgica, inibiu o desenvolvimento ou a aquisição de bactérias nas fixações. Tanto nos grupos de prova como nos de controle, diminuíram o fluxo de fluido gengival assim como o índice gengival durante o período experimental.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Seleção dos Pacientes e Coleta da Microbiota

Foram selecionados quatro pacientes, cor branca, dos Cursos de Especialização em Implantodontia e de Mestrado em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro (UNISA, SP), do gênero feminino, com idade compreendida entre 35 e 66 anos, apresentando no mínimo dois elementos de prótese fixa metalocerâmica instalados sobre implantes¹ (Figura 1) com hexágono externo, parafusados com pilar protético do tipo Multi-unit¹ (Figura 2). Ressalva-se que as próteses em estudo haviam sido instaladas há um período de seis meses a um ano.

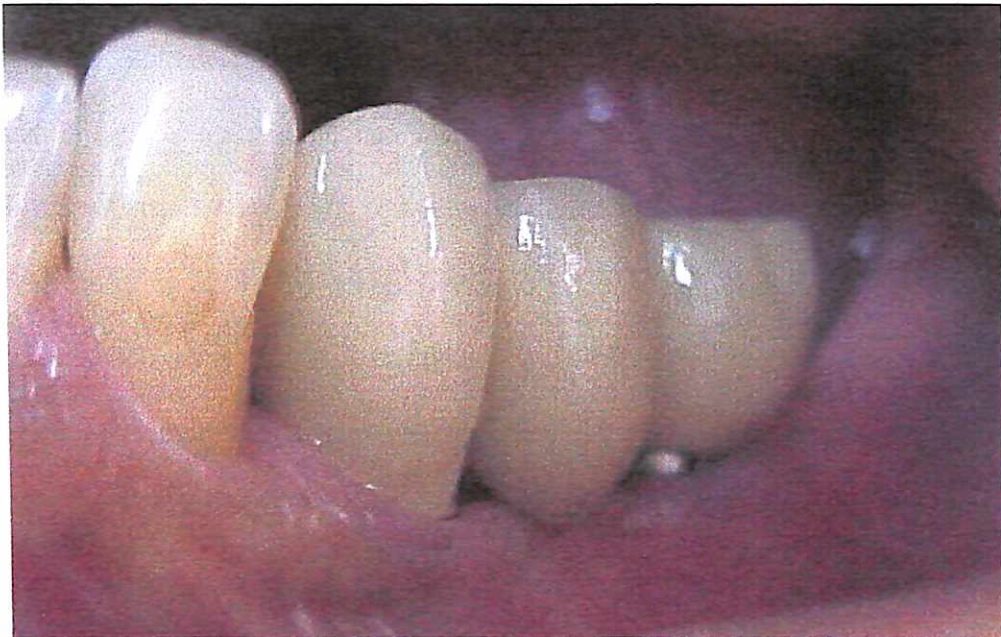


Figura 1. Prótese fixa metalocerâmica instalada sobre implantes

¹ Empresa Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo, SP, Brasil.



Figura 2. Pilar protético do tipo Multi-unit

Os pacientes selecionados não apresentavam doença periodontal em atividade e, para evitar interferência nos resultados bacteriológicos, não estavam utilizando nenhum tipo de medicação antibiótica sistêmica ou local, 30 dias antes, e nem durante todo o tempo do experimento, 90 dias.

Após a aprovação pelo comitê de ética e serem esclarecidos dos objetivos da pesquisa e de terem assinado a carta de consentimento, foram submetidos a exame clínico intrabucal e a radiografias periapicais tomadas na região dos implantes, com posicionador, para se verificar a adaptação do conjunto prótese-implante.

Na primeira consulta, após profilaxia dos dentes e das coroas sobre implantes com taça de borracha e pedra pomes, os pacientes realizaram bochecho por um minuto com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%; então, foram removidos duas coroas e dois pilares de prótese de cada um. Durante o procedimento, foi utilizado isolamento relativo com rolos de algodão e sistema de aspiração de alta potência.

As coroas, os pilares da prótese e os parafusos de fixação foram lavados com escova de náilon, água e detergente. Depois os pilares da prótese e os parafusos de fixação foram colocados em cuba ultrassônica em funcionamento, com detergente enzimático, onde foram deixados por dez minutos. Novamente foram lavados e desinfetados em solução de álcool-iodado a 0,02% e em seguida novamente lavados em água para remover a solução. Na região interna da coroa foi realizada desinfecção esfregando pedaços de algodão embebidos em solução de álcool-iodado a 0,02% (Figura 3) e lavagem com água.

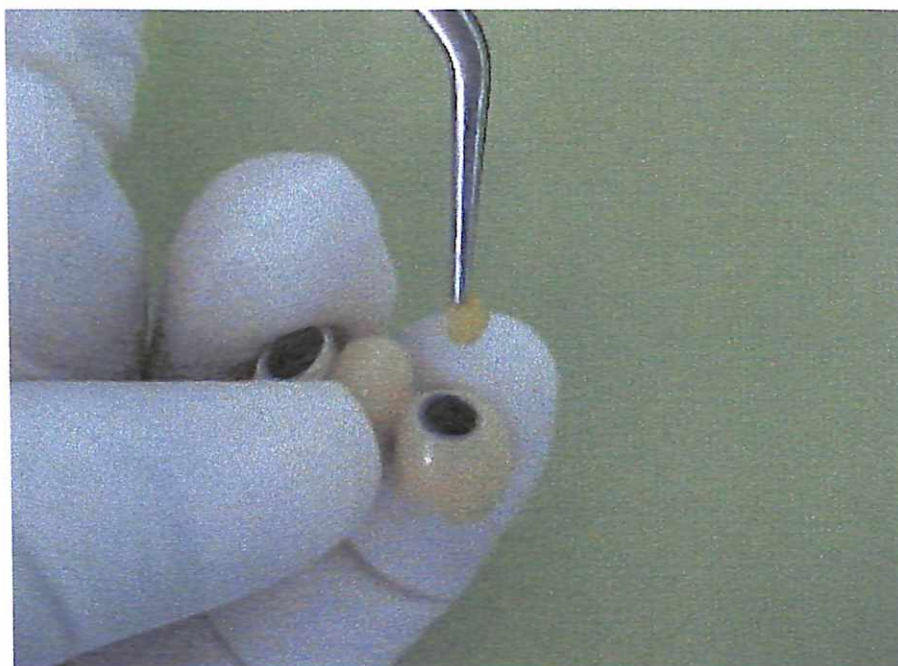


Figura 3. Desinfecção interna da coroa protética com álcool-iodado a 0,02%

Os procedimentos de limpeza e desinfecção das coroas e pilares protéticos visaram à obtenção de uma padronização das condições dessas peças quanto à presença de bactérias a ser avaliada imediatamente nas primeiras amostras coletadas (“tempo zero”).

Depois dos procedimentos de desinfecção e limpeza das coroas, foram colhidas duas amostras da microbiota da região interna de cada coroa (Figura 4), utilizando para este fim cone de papel absorvente esterilizado² utilizado em Endodontia retido por uma pinça, que foi friccionado no local.

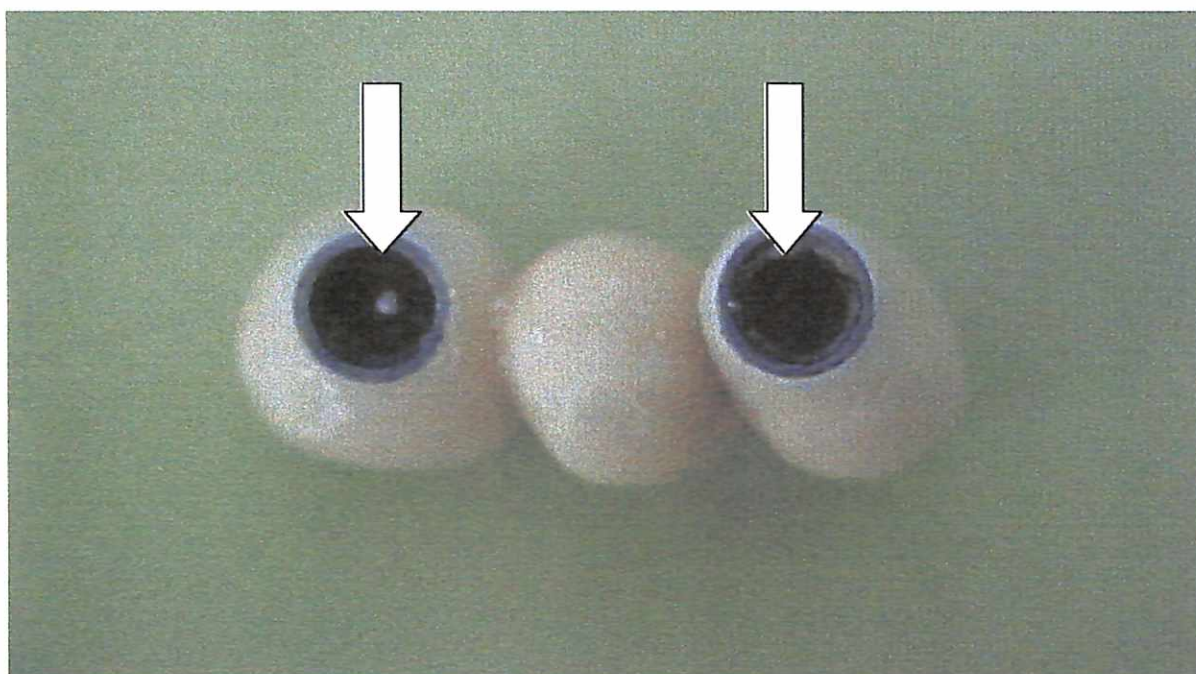


Figura 4. Região da coleta da microbiota das coroas protéticas

Uma amostra coletada de cada coroa foi acondicionada em frasco contendo 3,5 ml do meio de transporte VMGA III adequado para a conservação de anaeróbios e, a outra, em um tubo eppendorf contendo Água Milli-Q esterilizada³, apropriada para a realização de testes genéticos de identificação microbiana. Em seguida, as amostras coletadas foram levadas para o Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICBUSP).

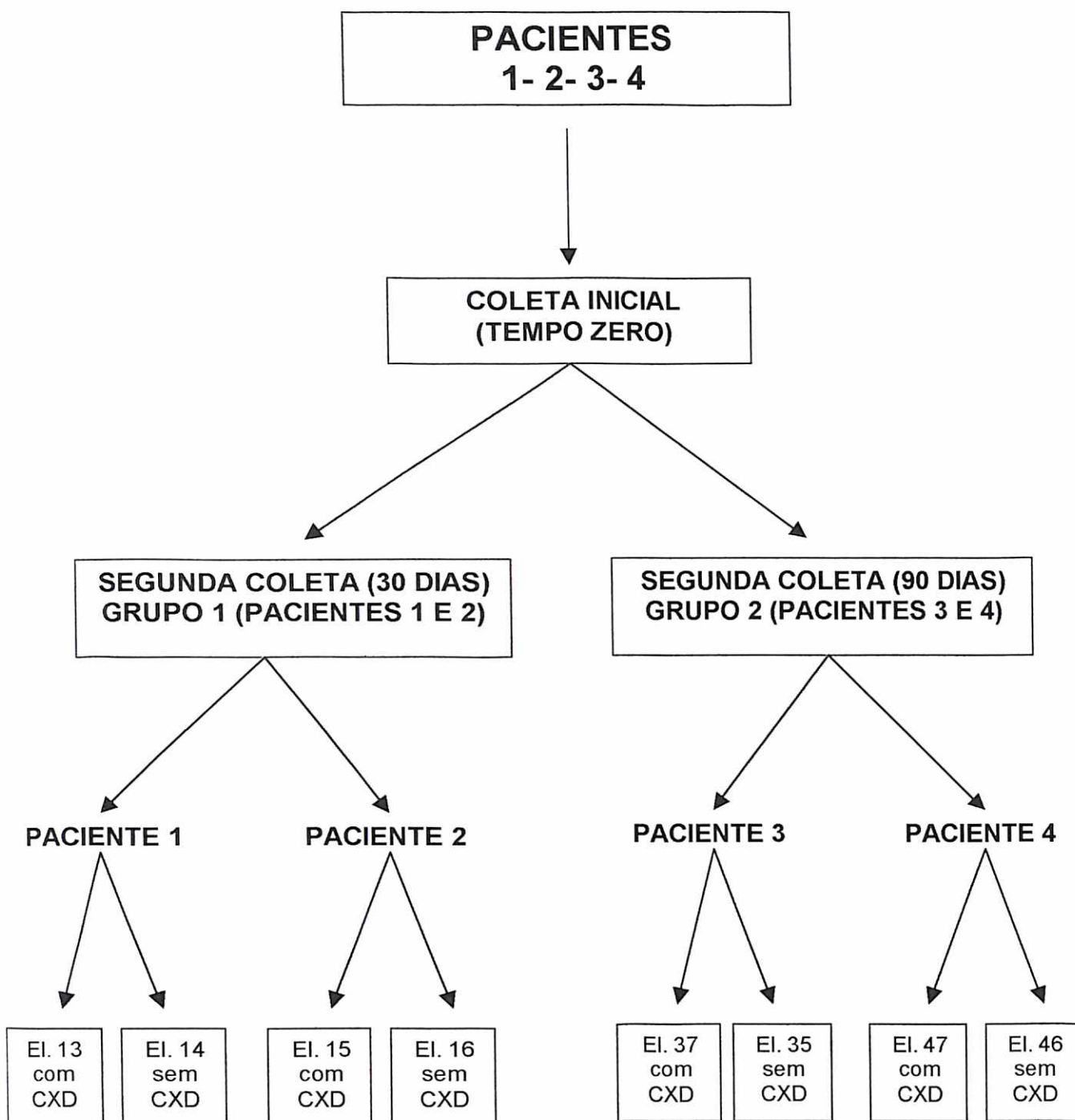
² Dentsply Brasil[®] - tamanho 40

³ Millipore Ltda., S.P.

Após a coleta, os pilares protéticos e as coroas foram reposicionados, sendo que, em uma das coroas, foi adicionada solução de digluconato de clorexidina a 2% entre a coroa e o pilar protético e, na outra (controle), nada foi adicionado às peças protéticas. Em seguida procedeu-se ao torque no parafuso do pilar protético de 20 N/mm² e nos parafusos das coroas de prótese de 10 N/mm². Foram tomadas radiografias periapicais para constatar a adaptação do pilar e da coroa no implante.

A segunda coleta no primeiro grupo foi realizada 30 dias após a primeira e, no segundo grupo, 90 dias após a primeira. Antes destas coletas, os pacientes receberam profilaxia com taça de borracha e pedra pomes e executaram bochecho com solução de digluconato de clorexidina a 0,12% por um minuto. Após a remoção das coroas e dos pilares protéticos, foram colhidas duas amostras da microbiota da região interna de cada coroa de cada grupo (um no qual havia sido aplicado digluconato de clorexidina e, o outro, o grupo-controle), com cone de papel absorvente esterilizado retido por uma pinça e friccionado no local durante 60 segundos. Da mesma forma como realizado na primeira coleta, um cone foi colocado num frasco contendo 3,5 ml do meio de transporte anaeróbico VMGA III e, o outro, num tubo eppendorf contendo Água Milli-Q esterilizada e ambos foram levados ao laboratório do ICBUSP para análise microbiológica.

A distribuição dos implantes e pacientes em diferentes grupos, bem como a localização desses implantes na arcada óssea, estão configurados no seguinte esquema:



CXD = clorexidina

4.2 Isolamento Bacteriano

Os espécimes coletados e conservados no meio de transporte VMGA III foram inicialmente homogeneizados em vortex por 60 segundos e diluídos em solução de diluição VMG-I. Em seguida, alíquotas de 0,1 ml de diluições pré-estabelecidas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram transferidas e semeadas em duplicatas, com auxílio de alças de Drigalsky, para placas (Figura 5) contendo os seguintes meios adequados às espécies-alvo cultiváveis:



Figura 5. Material transferido para placa de Petri contendo agar-sangue suplementado

a) Agar-sangue suplementado com 10g/ml de menadiona, 50g/ml de hemina e 400g/ml de canamicina, adequado para o desenvolvimento das espécies produtoras de pigmento escuro (*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*) e de *Tannerella forsythensis*, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter rectus*;

b) Agar Omata e Disraeli, seletivo para *Fusobacterium nucleatum*;

c) Agar TSBV (soja-triptona + soro + bacitracina + vancomicina), seletivo para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

A espécie *Treponema denticola* foi identificada somente por PCR, em função da dificuldade de seu cultivo.

Em seguida, as placas contendo agar-sangue suplementado e agar Omata e Disraeli foram incubadas (Figura 6) em condições de anaerobiose (90% N₂ +10% CO₂) a 37°C, por 15 dias. As placas contendo material semeado em Agar TSBV foram incubadas em condição de microaerofilia (5 a 10% de CO₂).



Figura 6. Placas incubadas em condição de anaerobiose

Terminado o tempo de incubação, as colônias desenvolvidas que apresentavam características presuntivas das espécies-alvo desta pesquisa foram imediatamente subcultivadas em meios não seletivos como o agar-sangue (SUMMANEN et al., 1993a; SUTTER et al., 1980) ou TSA (agar-soja-triptona), para melhor obtenção de culturas puras e para aumentar as populações de cada espécie, condição necessária para a realização dos testes de identificação.

4.3 Identificação Bacteriana

A identificação bacteriana a partir dos cultivos foi realizada de forma presuntiva e definitiva, de acordo com os parâmetros de Sutter; Citron e Finegold (1980) e Summanen et al. (1993b).

Nos cultivos em agar-sangue incubados em anaerobiose, as espécies-alvo dos gêneros *Prevotella* e *Pophyromonas* apresentaram-se como colônias pequenas (com diâmetros variando entre um e três milímetros), lisas, convexas, com pigmento negro ou marrom-escuro; as de *Fusobacterium nucleatum* são lisas, brancas ou cinzentas, com diâmetro de 0,5 a 2 mm e com aparência de “migalhas de pão”. A coloração de Gram evidenciou ser formada por bacilos Gram negativos. Também foram determinados a produção de catalase e indol, hidrólise da esculina e do amido, o tipo respiratório e a fluorescência das colônias sob luz ultravioleta.

A identificação definitiva foi realizada pelo teste da fermentação de carboidratos (SOCRANSKY et al., 1979) em meios de peptona-extrato de levedura (PY) adicionados

de soluções de sacarose, maltose, lactose, glicose e xilose, na concentração final de 1%. Em seguida, os tubos com PY + carboidratos e inoculados com as amostras bacterianas, juntamente com os tubos-controle (PY sem açúcares e inoculados) foram incubados em condições de anaerobiose, a 37°C, por cinco dias. Posteriormente, foi determinado o índice de acidificação (Ia) pela diferença do pH do tubo-controle e do tubo-teste (açúcares e bactérias), sendo que $Ia \geq 0,7U$ indicou fermentação forte, $0,3 < Ia < 0,7U$ fraca fermentação e $Ia \leq 0,3U$, ausência de fermentação.

Paralelamente foram utilizados *kits* comerciais de identificação RAPID API 32-A⁴ para a identificação das espécies anaeróbicas isoladas (*P. intermedia*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*) e amostras destas foram estocadas em *skim milk* (10%), a -70°C e liofilizadas. As cepas-referência de *P. nigrescens*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* foram utilizadas como controles em todos os testes.

4.4 Detecção pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos DNA dos Espécimes-Alvo, Diretamente das Amostras Clínicas

4.4.1 Extração dos DNA Bacterianos

A detecção dos DNA de *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* e *T. forsythensis* foi executada pela

reação em cadeia da polimerase (PCR) diretamente das amostras clínicas conservadas em Água Milli-Q esterilizada. O conteúdo do tubo eppendorf contendo cada amostra clínica coletada foi disperso em vortex por 60 segundos, fervido por dez minutos para extrair o DNA bacteriano (AVILA-CAMPOS; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2002), centrifugado a 14.000 x g por dez minutos e o sobrenadante (DNA) foi estocado a -20°C até o momento de seu uso.

4.4.2 Reação de Amplificação dos DNA Bacterianos

A reação de amplificação dos DNA bacterianos foi realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão PCR (10X), 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl da mistura de dNTP (0,2 mM), 1,0 µl de cada iniciador específico (0,4 µM), 0,25 µl de *Taq*DNA polimerase (0,5U), 8,0 µl de Água Milli-Q esterilizada e 10 µl do DNA isolado. Os iniciadores específicos utilizados, segundo Slots et al. (1995), foram os seguintes, sendo que A = adenina, C = citosina, G= guanina, T = tirosina:

a) para *P. intermedia*: (1) AAC GGC ATT ATG TGC TTG CAC, (2) CTC AAG TCC GCC AGT TCG CG.

b) para *P. gingivalis*: (1) AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG, (2) ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT.

⁴ bioMérieux sa

c) para *T. denticola*: (1) TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T, (2) TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA.

d) para *E. corrodens*: (1) CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G, (2) CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C.

e) para *C. rectus*: (1) TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC, (2) TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT C.

f) para *B. forsythus*: (1) GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA, (2) TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T

g) para *A. actinomycetemcomitans*: (1) GCT AAT ACC GCG TAG AGT CGG, (2) ATT TCA CAC CTC ACT TAA AGG T.

h) para *F. nucleatum*: 5' GAG TAG GAT TTT.

A amplificação foi realizada em termociclador⁵, programado para um ciclo de 94°C por cinco minutos; trinta ciclos de 94°C, por 30 segundos; 55°C ou 60°C segundo cada par de iniciadores específicos, por 30 segundos; 72°C, por 30 segundos e um ciclo de 72°C, por cinco minutos.

4.4.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%), em fonte de corrente⁶ a 70 V, por duas horas e 30 minutos. Após o tempo de corrida, o

⁵ Perkin Elmer, Gene Ampli PCR System 9700

⁶ Biorad®

gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$), observado em transiluminador UV e fotografado (Figura 7) com o sistema Kodak Digital Science System-DC120. Como controle de peso molecular foi usado 1Kb DNA ladder⁷.

Em todas as análises foi utilizada Água Milli-Q como controle negativo e a fita do DNA da bactéria pesquisada como controle positivo.

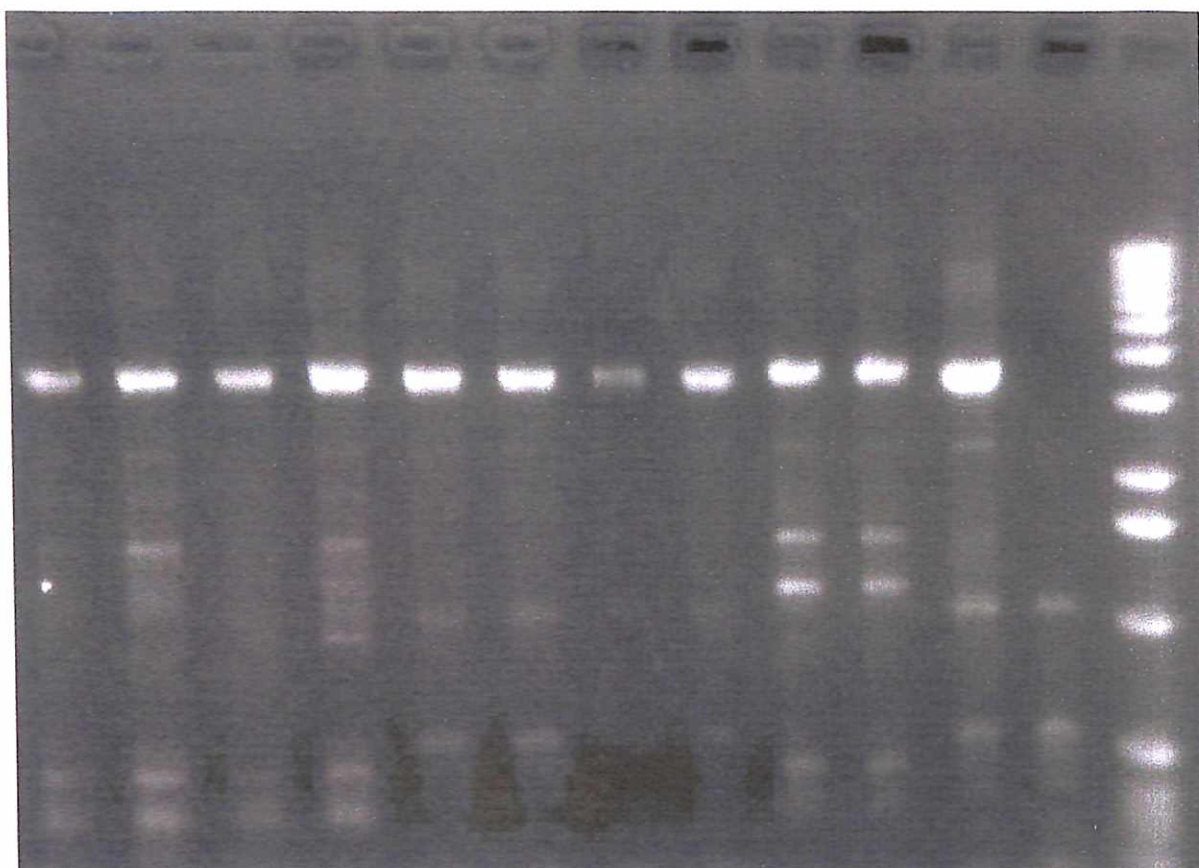


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose

⁷Gibco BRL[®], Life Technologies Laboratories, São Paulo, SP.

5 RESULTADOS

Os resultados dos exames microbiológicos processados nas amostras coletadas, no tempo zero e aos 30 e 90 dias, estão expressos na Tabela 1.

TABELA 1 - Identificação das espécies bacterianas encontradas, em 30 e 90 dias, na região interna da coroa de implantes de hexágono externo que receberam ou não aplicação de clorexidina em solução a 2,0%

Paciente	Elemento Examinado	Tempo (dias)	Morfotipos encontrados e espécies identificadas em cultivos	Espécies identificadas por PCR
1	13 (com clorexidina)	0 30	- <i>F. nucleatum</i> Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos	-
	14 (sem clorexidina)	0 30	- Pequenos bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos	- <i>T. denticola</i>
2	15 (com clorexidina)	0 30	- Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos	- -
	16 (sem clorexidina)	0 30	- Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos	- <i>T. denticola</i>
3	37 (com clorexidina)	0 90	- Bacilos Gram negativos	- <i>P. gingivalis</i>
	35 (sem clorexidina)	0 90	- <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> Bacilos Gram negativos	- <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>
4	47 (com clorexidina)	0 90	- <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> Bacilos Gram negativos	- <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>
	46 (sem clorexidina)	0 90	- <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> Bacilos Gram negativos	- <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>

Nas amostras da primeira coleta (tempo zero), os resultados dos cultivos microbiológicos e do PCR foram negativos. Esta constatação sugere que a desinfecção, com o álcool-iodado, das coroas e dos pilares protéticos eliminou a contaminação que existia previamente à pesquisa, devido ao fato destas coroas estarem em função de seis a doze meses. Este acontecimento nos deu a certeza de que as bactérias se infiltraram e se implantaram posteriormente ao “tempo zero”, pois foram encontradas nas coletas de 30 e 90 dias.

Os resultados evidenciados nas amostras coletadas, aos 30 e 90 dias, demonstram que ocorreu infiltração bacteriana na interface coroa/pilar protético dos quatro pacientes portadores de implantes de hexágono externo. Das oito espécies-alvo, apenas quatro foram identificadas nessas amostras clínicas: *Fusobacterium nucleatum* (somente por cultivo), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* (ambas tanto por cultivo como por PCR) e *Treponema denticola* (somente por PCR).

A análise das Figuras 8 e 9 mostra claramente que o número de unidades formadoras de colônias (ufc) desenvolvidas anaerobicamente em agar-sangue suplementado aumentou expressivamente nas amostras coletadas aos 90 dias, quando comparado com o constatado aos 30 dias, mesmo nas amostras dos sítios que haviam recebido tratamento com a solução de clorexidina. Mas a constatação mais digna de realce diz respeito ao expressivo predomínio de ufc produtoras de pigmento negro (correspondentes a *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* e *P. loescheii*), constatado no cultivo das amostras coletadas no 90º dia de experimentação. A ocorrência de *P. gingivalis* e *P. intermedia* nessas amostras foi confirmada por PCR, tanto nas tratadas como nas não tratadas com clorexidina.



Figura 8. Desenvolvimento primário em agar-sangue suplementado, em anaerobiose, a 37°C durante 15 dias, de amostra coletada da região interna da coroa (elemento 46) 30 dias após a aplicação de clorexidina.

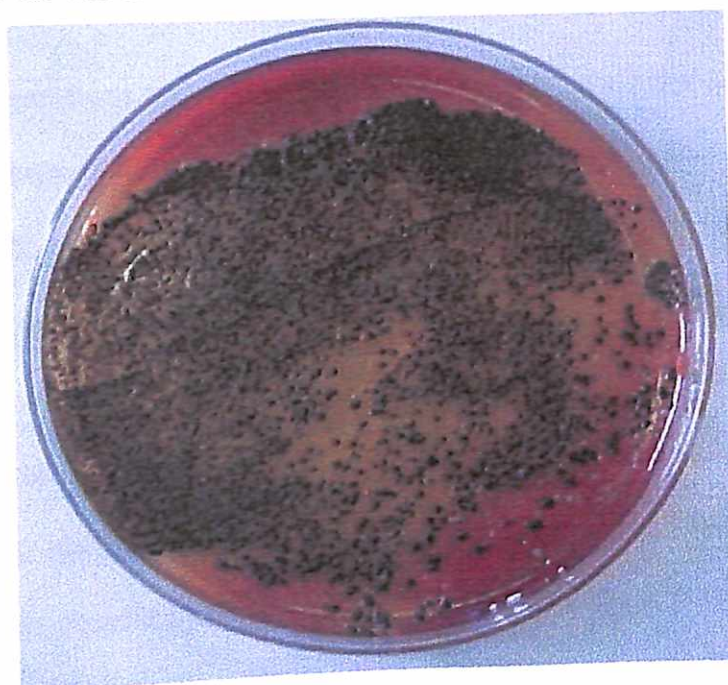


Figura 9. Desenvolvimento primário em agar-sangue suplementado, em anaerobiose a 37°C durante 15 dias, de amostra de biofilme interno de coroa (elemento 35) 90 dias após a aplicação de clorexidina. Predomínio de colônias pigmentadas em negro e hemolíticas.

De acordo com os dados da tabela 1, os cultivos das amostras coletadas no 30º dia evidenciaram o desenvolvimento de *F. nucleatum*, outros bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos. O PCR identificou somente o DNA de *T. denticola* nas duas amostras sem clorexidina.

Nas amostras colhidas no 90º dia, tanto nas tratadas como nas não tratadas, foram identificados, por PCR e cultivo, *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

Os resultados globais confirmam a ocorrência de infiltração de bactérias, incluindo algumas patogênicas, na interface pilar/coroa protética parafusada instalada sobre implantes do tipo hexágono externo.

Os resultados também evidenciam que a aplicação da solução de clorexidina a 2% não impediu o desenvolvimento de bactérias em 30 dias, em particular do patógeno *F. nucleatum*, mas não foram detectados *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola*. O desenvolvimento de bactérias (biofilme) aumentou em 90 dias, tendo sido constatada a presença dos patógenos *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Assim, a clorexidina inibiu a proliferação da maioria dos periodontopatógenos aos 30 dias, mas não se mostrou adequadamente eficaz na prevenção da colonização de *P. gingivalis* e *P. intermedia* na interface pilares/coroas protéticas dos implantes odontológicos aos 90 dias.

6 DISCUSSÃO

Verificamos, em nossa Revisão da Literatura, que, segundo Adell et al. (1981), a perda óssea considerada como normal no primeiro ano após a colocação da coroa protética sobre implantes odontológicos é de 1,5 mm e parece não ter origem bacteriana; a partir do segundo ano, ocorre perda de 0,1 mm por ano. Por outro lado, Gross; Abramovich e Weiss (1999) relataram que, em parte, os efeitos da infiltração bacteriana podem ser a causa da perda óssea inicial de 1 a 1,5 mm na região da crista óssea, apicalmente à interface de união prótese/implante em fixações de titânio liso parafusado.

Observamos que é comum a opinião de diversos autores (DE LORENZO, 1996; DE LORENZO; CAVENAGUE, 2004; LEKHOLM et al., 1986; LISTGARTEN; LAI, 1999; QUIRYNEN; LISTGARTEN, 1990; RAMS; LINK, 1983) sobre a etiologia da perimplantite, confirmando que várias espécies de bactérias patogênicas formadoras de periodontite também são formadoras de perimplantite.

Assim sendo, é quase unânime a opinião de que vários fatores colaboram para a falha do implante, mas a placa bacteriana (biofilme) parece ser o principal deles (BAUMAN et al., 1992; DE LORENZO; SIMIONATO; DE LORENZO, 1997; GROMATZKY; SENDYK, 2002; ROSENBERG; TOROSIAN; SLOTS, 1991; VAN STEENBERGHE, 1993).

Segundo De Lorenzo e Mayer (2004), com base no conhecimento acumulado até então, em 1996, o *World Workshop of Periodontology* reconheceu as seguintes associações entre microrganismos e doença periodontal:

- muito forte: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (considerados exógenos por alguns autores);
- forte: *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythensis*), *Prevotella intermedia*, *Eubacterium nodatum*, *Treponema denticola* e, na GUN, outros espiroquetas;
- moderada: *Streptococcus intermedius*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* (*Micromonas*) *micros* e *Campylobacter rectus*;
- com evidências iniciais: bacilos entéricos, *Pseudomonas* spp (exógenos), *Staphylococcus* spp, *Selenomonas* spp, *Eikenella corrodens* e leveduras como *Candida albicans*.

Verificamos, assim, que as oito espécies bacterianas analisadas no presente trabalho pertencem ao grupo das periodontopatógenas e têm sido também relacionadas com a ocorrência de perimplantites, segundo Becker et al. (1990), De Lorenzo e Cavenague (2004) e Mombelli et al. (1995), dentre muitos autores citados no capítulo Revisão da Literatura.

Neste nosso trabalho, a utilização conjunta de cultivos bacterianos e a reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilitaram a constatação da presença de *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola*, isoladamente ou associados, na interface coroa/pilar protético de implantes, em pacientes que não apresentavam sinais clínicos de doença perimplantar. A identificação de patógenos em implantes bem-sucedidos confirma os resultados obtidos por Leitão (2003) em sítios perimplantares, que permitem considerar que a simples presença qualitativa de periodontopatógenos

não implica necessariamente em processo de doença estabelecido. No entanto, essa constatação pode admitir a presunção de risco de doença perimplantar, que pode vir a ocorrer em função do aumento numérico dessas espécies, em função de alterações ambientais severas e de desequilíbrio significativa na relação microbiota-hospedeiro. Leitão (2003) e Mombelli; Mericske-Stern (1990) relataram que pacientes com histórico de doença periodontal, quando submetidos à terapia periodontal de suporte, conseguem manter sítios perimplantares clinicamente saudáveis, ainda que se apresentem positivos para a presença de algumas bactérias patogênicas. Um detalhe importante a ser realçado é que bactérias patogênicas apresentam clones geneticamente condicionados a produzir diferentes teores de fatores de virulência ou até mesmo a não produzi-los, tanto que este recente conhecimento consegue explicar, pelo menos parcialmente, a ocorrência de patógenos em sítios saudáveis ou com baixa intensidade de doença (DE LORENZO; MAYER, 2004).

Os resultados constatados em nossa pesquisa só podem ser cotejados com os obtidos pelo pequeno número de autores que também estudaram a presença de bactérias nas superfícies internas dos implantes bucais.

O presente trabalho evidenciou que os resultados microbiológicos obtidos por cultivos e por PCR, nas amostras da primeira coleta (tempo zero), foram negativos, demonstrando que as espécies bacterianas-alvo e os morfotipos presentes nas amostras subseqüentes (30° e 90° dias) haviam se infiltrado e se implantado posteriormente à reinserção da peça protética. A ausência de células bacterianas nas amostras iniciais também foi relatada nas pesquisas de Quirynen et al. (1994) e de Quirynen; van Steenberghe (1993) que verificaram a posterior penetração de fluidos e

bactérias na parte interna entre implante e pilar protético em todos os implantes parafusados. No entanto, Groenendijk et al. (2004), os únicos pesquisadores que haviam testado a ação da clorexidina na área-alvo deste trabalho, descreveram que 46% das interfaces estavam contaminadas por bactérias já no “tempo zero”, mas não haviam procedido à desinfecção dessas regiões antes da coleta do material a ser examinado.

Nosso trabalho confirmou, por cultivos microbianos, que ocorre infiltração e colonização de uma microbiota anaeróbia heterogênea na interface coroa/pilar protético de implantes bucais com sistema anti-rotacional do tipo hexágono externo, evento somente relatado por Persson et al. (1996) e por Quirynen et al. (1994).

Por outro lado, uma das propostas de nossa pesquisa foi identificar, tanto por cultivos como por PCR, a presença de oito espécies bacterianas periodontopatógenas em amostras coletadas da região interna das coroas. Assim, nossos resultados só podem ser comparados com os dos dois trabalhos acima citados, que igualmente detectaram uma microbiota extensa incluindo cocos Gram positivos, bastonetes Gram negativos e os patógenos *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, cabendo-nos ressaltar que, no trabalho da equipe de Quirynen, estas duas últimas espécies certamente estão incluídas dentre as que constituíam a antiga denominação de *Bacteroides* spp.

Durante o período de observação adotado em nossa pesquisa (máximo de 90 dias), não identificamos, assim como Persson et al. (1996) e Quirynen et al. (1994), a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens* e *T. forsythensis* nas

amostras clínicas analisadas, embora, em relação a esta espécie, o cotejamento com os resultados de Quirynen e colaboradores fique novamente prejudicado pela alteração na sistemática dos antigos *Bacteroides*, que incluíam *B. forsythus*.

Devemos considerar, também, que nem a equipe de Quirynen nem a de Persson utilizaram testes genéticos para a identificação de bactérias. A aplicação do método PCR permitiu-nos detectar a presença do patógeno *T. denticola* em duas amostras examinadas no 30º dia, ambas não tratadas com clorexidina. Esta constatação somente por PCR faz-nos concordar com as observações de Slots et al. (1995) e de Leitão (2003), segundo os quais, a possibilidade de identificação e discriminação de espécies bacterianas aumenta quando é feita por esse método que é capaz de detectar bactérias viáveis e não viáveis mesmo em muito pequeno número (média de apenas uma a dez células), notadamente de espécies dificilmente cultiváveis como *T. denticola* ou até mesmo não cultiváveis. Por isso, o método PCR representa excelente opção para o monitoramento microbiológico na área da Implantodontia, além de se destacar pela sua rapidez e especificidade na detecção de microrganismos envolvidos em diferentes processos infecciosos bucais e sistêmicos.

Em nosso estudo, foi constatado que a solução de clorexidina a 2% inibiu a proliferação de periodontopatógenos, com exceção de *F. nucleatum* aos 30 dias, todavia, não se mostrou eficaz na prevenção da colonização de *P. gingivalis* e *P. intermedia* na interface pilares/coroas protéticas dos implantes odontológicos aos 90 dias.

O único trabalho encontrado por nós que coincide integralmente com os propósitos de nossa pesquisa, ou seja, analisar a presença de bactérias nos

microvalamentos existentes entre os componentes dos implantes e também avaliar a ação inibidora da clorexidina sobre elas foi publicado ainda neste ano por Groenendijk et al. (2004). Os autores relatam que a aplicação de uma solução de clorexidina a 0,2%, na segunda fase cirúrgica, inibiu o desenvolvimento ou a aquisição de bactérias nas fixações. O número de bactérias cultivadas, a partir do grupo-controle, foi significativamente mais alto do que no grupo de prova, após seis semanas de observação (cerca de 42 dias). No entanto, cabe salientar grandes diferenças de metodologia de análise, principalmente as relativas ao estado inicial de descontaminação por nós obtido, à concentração do agente antimicrobiano utilizado, que no nosso caso foi dez vezes maior, e ao tempo de observação, que no nosso trabalho estendeu-se até 90 dias.

Por outro lado, diferentemente de Groenendijk et al. (2004), em nossa pesquisa preocupamo-nos em identificar as espécies bacterianas presentes nas amostras coletadas das interfaces, tanto pelo clássico método de cultivos, quanto pelo moderno método de PCR, que analisa o genoma bacteriano (Biologia Molecular), permitindo maior confiança na identificação. Essa assertiva pode ser confirmada pelo fato de o PCR ter confirmado o encontro, em cultivos, de *P. gingivalis* e *P. intermedia*, e principalmente por ter permitido a identificação de *T. denticola*, dificilmente executada pelo uso de técnicas de cultivo bacteriano e, por isso, não referida nos poucos trabalhos que precederam a este.

7 CONCLUSÕES

1. O sistema analisado de prótese sobre implante não impede a infiltração microbiana e a colonização da interface coroa/pilar protético de prótese parafusada sobre implante do tipo hexágono externo. Há necessidade de modificações nesse sistema para vedar melhor a interface de contato da coroa com o pilar protético.

2. A solução de clorexidina a 2% não se mostrou eficaz na prevenção da colonização do periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum* em uma amostra analisada 30 dias após sua aplicação. No entanto, a presença de *Treponema denticola* foi constatada, somente por PCR, nas duas amostras que não haviam sido tratadas com o antisséptico em análise. Nas amostras examinadas 90 dias após sua aplicação, bem como nas que não receberam esse tratamento, constatou-se a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* tanto por cultivo como por PCR.

3. Em todas as amostras examinadas não foi possível detectar, por cultivos ou PCR, as outras espécies patogênicas visadas na nossa proposta de pesquisa (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *Tannerella forsythensis*).

REFERÊNCIAS⁸

ADELL, R. et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v. 10, n. 6, p. 387-416, Dec. 1981.

ADELL, R. et al. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 5, n. 4, p. 347-59, Winter 1990.

AVILA-CAMPOS, M. J.; VELASQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 1-5, Jan.-Feb. 2002.

BAUMAN, G. R. et al. Plaque-induced inflammation around implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 7, n. 3, p. 330-337, Fall 1992.

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

DE LORENZO, J. L. Os pacientes com periodontite devem ser considerados de alto risco para receber implantes? **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 188, mar.-abr. 1996.

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

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: Editora Atheneu, 2004. cap. 2, p. 11-31.

⁸ De acordo com a NBR 14724 e NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002. Abreviaturas dos Periódicos segundo "Index to Dental Literature" e SECS (Seriados em Ciências da Saúde).

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: Editora Atheneu, 2004. cap. 9, p. 127-150.

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

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, n. 5, p. 321-324, out.-nov. 1997.

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

DOTTORI, R. H. G. et al. Controle químico da placa bacteriana em Periodontia. **Rev. Odontol. Univ. St. Amaro**, São Paulo, v. 17, n. 1-2, p. 4-6, jan.-dez. 2002.

EATON, K. A. et al. The effects of a 0.12% chlorhexidine-digluconate-containing mouthrinse versus a placebo on plaque and gingival inflammation over a 3-month period. A multicentre study carried out in general dental practices. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n. 3, p. 189-197, Mar. 1997.

ERNST, C. P.; PROCKL, K.; WILLERSHAUSEN, B. The effectiveness and side effects of 0.1% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 29, n. 7, p. 443-448, July 1998.

FERRARI, M. et al. Marginal adaptation of crowns: a scanning electron microscopic investigation. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 14, n. 3, p. 272-279, June 1994.

GROENENDIJK, E. et al. Microbiological and clinical effects of chlorhexidine enclosed in fixtures of 3I-Titamed implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 174-179, Apr. 2004.

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

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

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. **Anaerobe Laboratory Manual**: Virginia Polytechnic Institute. 4. ed. Blacksburg: Southern Printing Co., 1997. p.152.

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

JEMT, T.; BOOK, K. Prosthesis misfit and marginal bone loss in edentulous implant patients. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 11, n. 5, p. 620-625, Sept.-Oct. 1996.

JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. Comparison of two commercially available chlorhexidine mouthrinses: II. Effects on plaque reformation, gingivitis, and tooth staining. **Clin. Prev. Dent.**, Philadelphia, v. 11, n. 6, p. 12-6, Nov.-Dec. 1989.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 15, p. 55-62, Oct. 1997.

KELTJENS, H. M. et al. Effects of chlorhexidine-containing gel and varnish on abutment teeth in patients with overdentures. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 71, n. 9, p.1582-1586, Sept. 1992.

LEE, K. H.; MAIDEN, M. F. J.; TANNER, A. C. R.; WEBER, H. P. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 70, n. 2, p. 131-138, Feb. 1999.

LEITÃO, J. A. O. **Análise, por reação em cadeia da polimerase (PCR), da presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em sítios perimplantares.** 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia). Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2003.

LEKHOLM, U. et al. The condition of the soft tissues at tooth and fixture abutments supporting fixed bridges. A microbiological and histological study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 13, n. 6, p. 558-562, July 1986.

LEME, M.L.S.F. et al. Perimplantite: mito ou realidade? **Rev. Odontol. Univ. St. Amaro**, São Paulo, v. 7, n. 1-2, p. 70-74, jan.-dez. 2002.

LISTGARTEN, M. A.; LAI, C. H. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 70, n. 4, p. 431-437, Apr. 1999.

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

MOMBELLI, A.; LANG, N. P. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 17, p. 63-76, June 1998.

MOMBELLI, A. et al. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, n. 2, p. 124-130, Feb. 1995.

MOMBELLI, A.; MERICSKE-STERN, R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 1, n. 1, p. 1-7, Dec. 1990.

MOMBELLI, A. et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 2, n. 4, p. 145-151, Dec. 1987.

O'MAHONY, A.; MACNEILL, S. R.; COBB, C. M. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 31, n. 4, p. 249-256, Apr. 2000.

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

PIATTELLI, A. et al. Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 72, n. 9, p. 1146-1450, Sept. 2001.

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

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

QUIRYNEN, M.; LISTGARTEN, M. A. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 1, n. 1, p.8-12, Dec. 1990.

RAMS, T. E.; LINK JR, C. C. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. **J. Oral Implantol.**, Abington, v. 11, n. 1, p. 93-100, 1983.

ROSENBERG, E. S.; TOROSIAN, J. P.; SLOTS, J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 2, n. 3, p. 135-144, July-Sept. 1991.

SILVA M. R. P. B. **Análise das microbiotas cultiváveis de sítios perimplantares com e sem perda óssea.** 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia)-Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2003.

SLOTS, J. et al. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 20, n.2, p. S304-307, June 1995. Suplemento.

SOCRANSKY, S. S. et al. Capnocytophaga: new genus of gram-negative gliding bacteria. III. Physiological characterization. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v. 122, n. 1, p. 29-33, July 1979.

SOCRANSKY, S. S.; MANGANIELLO, S. D. The oral microbiota of man from birth to senility. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 42, n. 8, p. 485-496, Aug. 1971.

STEFLIK, D. E. et al. Dental implants retrieved from humans: a diagnostic light microscopic review of the findings in seven cases of failure. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v. 6, n. 2, p. 147-153, Summer 1991.

SUMIDA, S. et al. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v. 17, n. 5, p. 696-702, Sept.-Oct. 2002.

SUMMANEN, P. H. et al. Processing clinical specimens and isolation procedures. In: _____. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 5. ed. Singapore: Star Publishing, 1993. cap.3, p. 39-48.

SUMMANEN, P. H. et al. Preliminary identification methods (Level I and II). In: _____. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 5. ed. Singapore: Star Publishing, 1993. cap. 4, p. 49-64.

SUTTER, V. L.; CITRON, D. M.; FINEGOLD, S. M. Processing and examination of clinical specimens. In: _____. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1980. p. 20-38.

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

VAN STEENBERGHE, D. Periodontal indices around natural and titanium abutments: a longitudinal multicenter study. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 64, n. 6, p. 538-541, June 1993.

VAN WINKELHOFF, A. J. et al. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 11, n. 6, p. 511-520, Dec. 2000.

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

APÊNDICE A- Carta de Esclarecimento

O estudo que está sendo realizado recebe o nome de Avaliação da eficácia da clorexidina 2% no controle bacteriano no espaço entre a coroa e o pilar protético em prótese parafusada sobre implante.

O objetivo do estudo é diminuir a proliferação de bactérias no espaço entre o pilar protético e a coroa sobre o implante. A proliferação de bactérias nesta região faz com que haja odor forte quando da remoção das coroas podendo ainda levar a inflamações da gengiva ao redor do implante.

Na consulta será realizado exame clínico da região do implante para verificar a adaptação do conjunto prótese-implante e em seguida profilaxia com taça de borracha e pedra pomes e bochecho por um minuto com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%. Em seguida será removido duas coroas e dois pilares de prótese do tipo Multi-unit, utilizando isolamento relativo com rolos de algodão e aspiração.

Após a coleta serão reposicionadas as coroas protéticas, sendo que numa das coroas, será adicionada clorexidina a 2% entre o pilar protético e a parte interna da coroa e, no outro nada será adicionado. Serão feitas tomadas radiográficas periapicais para constatar a adaptação da coroa ao pilar.

Haverá o desconforto da remoção das próteses para a finalidade do procedimento da coleta das amostras e ao terminar a coleta o desconforto da reinstalação das mesmas.

Não há benefício direto para o participante da pesquisa pois se trata de estudo experimental testando a hipótese de que haverá inibição da proliferação

bacteriana entre o pilar protético e a coroa sobre o implante. Somente no final do estudo é que poderemos concluir se houve a presença de algum benefício como por exemplo a redução do odor indesejável nestes componentes protéticos pesquisados.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Dagoberto Oliani que pode ser encontrado à rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP telefone (0XX11) 55458812. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISA) - rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, nº 340, Jardim das Imbuías, SP – telefone: (0XX11) 5929-5477.

É garantida a liberdade da retirada do consentimento, e a qualquer momento é permitido deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Você tem o direito de ser mantido(a) atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. 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 ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem

direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os dados e o material coletado somente serão utilizados para esta pesquisa.

(assinatura do responsável)

Eu, _____, portador do R.G. nº _____, após ter lido a carta de esclarecimento a respeito do projeto de pesquisa Avaliação da eficácia da clorexidina 2% no controle bacteriano no espaço entre a coroa e o pilar protético em prótese parafusada sobre implante, declaro estar ciente do objetivo desta pesquisa e da forma como serei avaliado (a).

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, portador (a) do RG nº _____, após ter sido lido pelos autores do trabalho a carta de esclarecimento a respeito do projeto de pesquisa Avaliação da eficácia da clorexidina 2% no controle bacteriano no espaço entre a coroa e o pilar protético em prótese parafusada sobre implante, concordo em participar deste estudo e autorizo a realização das coletas de amostras bacterianas necessárias.

Estou ciente que não serei identificado em nenhum momento e que não corro riscos em me submeter a esta avaliação. Ficou claro também, que minha participação é voluntária e isenta de despesas.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer tipo de penalidade ou prejuízo à minha pessoa.

Santo Amaro, _____ de _____ de _____.

paciente

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente para participação neste estudo.

Santo Amaro, _____ de _____ de _____.

pesquisador

No caso de eventuais dúvidas, entrar em contato com:

Dagoberto Oliani (pesquisador) - telefone (0XX11) 55458812.

Comitê de Ética em pesquisa - telefone: (0XX11) 5929-5477.

ANEXO A - OUTRAS ENTIDADES ENVOLVIDAS

Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).