

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**ROBERTO BOSCHETTI FERRARI**

**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NA REGIÃO INTERNA DE  
IMPLANTES BUCAIS DE HEXÁGONO EXTERNO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA  
DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 2% NO CONTROLE DESSA MICROBIOTA.**

**SÃO PAULO**

**2004**

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**ROBERTO BOSCHETTI FERRARI**

**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NA REGIÃO INTERNA DE  
IMPLANTES BUCAIS DE HEXÁGONO EXTERNO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA  
DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 2% NO CONTROLE DESSA MICROBIOTA.**

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

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos**

**SÃO PAULO**

**2004**

B. B0123765  
Class. U617.69  
Cutter F429i  
Patri nº 3523  
Tipo entrada JOACAS  
Nota Fiscal  
Data rec. 23.1.10.1.08  
Preço  
Origem HOSPITAL S  
112.000,00

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

F429i Ferrari, Roberto Boschetti  
Identificação de patógenos periodontais na região in -  
terna de implantes bucais de hexágono externo e avalia-  
ção da eficácia da solução de clorexidina a 2% no contro-  
le dessa microbiota / Roberto Boschetti Ferrari. Orienta-  
ção do Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo; co-orientação do  
Prof. Dr. Mario Julio Avila Campos . – São Paulo : 2004.  
73p.

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

1. Implantes 2. Anaeróbios 3. Clorexidina J. Título

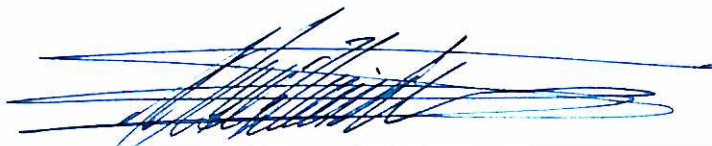
**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NA REGIÃO INTERNA  
DE IMPLANTES BUCAIS DE HEXÁGONO EXTERNO E AVALIAÇÃO DA  
EFICÁCIA DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 2% NO CONTROLE DESSA  
MICROBIOTA**

**Roberto Boschetti Ferrari**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia  
Orientador: Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo

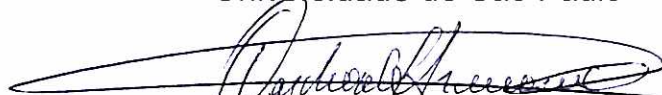
Aprovada em 13/09/2004

**Banca Examinadora**



---

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



---

**Prof. Dr. Paschoal Laércio Armonia**  
Professor Livre Docente e Doutor em Fisiologia pela Universidade de  
São Paulo



---

**Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo**  
Doutor em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade  
de São Paulo

Nota: Dez Observação: Distinção e louvor

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Arnaldo e Alice, que já se foram, mas deixaram comigo o exemplo e me deram a oportunidade da vida.

Aos meus filhos, Daniel e Felipe, orgulho e razão da minha vida.

À minha esposa Isabela, companheira incondicional sem a qual minha vida não teria sentido.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo, além de orientador, um amigo e exemplo de profissionalismo e dedicação.

Aos Professores Dr. Wilson Roberto Sendyk e Dr. Nelson Villa pelo empenho, direção e organização do curso do qual tive a oportunidade de participar.

Aos Professores Dr. Alfredo Gromatzky e Dr. Paschoal Laércio Armonia pelo trabalho de correção e participação na qualificação desta dissertação.

Aos colegas do ICB USP, Dr. Luiz Fernando, Dra. Viviane e Dra. Sheila pelo desenvolvimento do trabalho de laboratório sob a coordenação do Prof. Dr. Mário Julio Ávila Campos.

À amiga e Professora Dra. Fátima Neves Faraco pelo incentivo e colaboração.

À Sabrina e Juliana, pela competência, dedicação e amizade.

À Luciana e Renata, por tornarem o levantamento bibliográfico um trabalho eficiente e agradável.

E à todos da turma de mestrado, por dividirem suas experiências, pela amizade e companheirismo e na certeza que nossa convivência será sempre lembrada com muita alegria.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Aos companheiros Dr. Ulisses Tavares da Silva Neto e Dr. Paulo Yataro Kawakami e aos amigos e colaboradores da ADOCI Guarulhos, pelo que já conquistamos e pelo que ainda há de vir nos caminhos da Implantodontia.

## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

### RESUMO

### ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Colonização bacteriana em sítios perimplantares	14
2.2 Infiltração na interface pilar/implante	22
2.3 Clorexidina: efeito antibacteriano	29
3. PROPOSIÇÃO	32
4. MATERIAIS E MÉTODO	33
4.1 Seleção dos pacientes e coleta da microbiota	33
4.2 Isolamento bacteriano (cultivos)	37
4.3 Identificação das espécies cultivadas	38
4.4 Detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) das bactérias-alvo, diretamente das amostras clínicas	42
4.4.1 Extração do DNA bacteriano	42
4.4.2 Reação de amplificação dos DNA bacterianos	42
4.4.3 Eletroforese em gel de agarose	45
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICE	

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

DNA = ácido desoxirribonucléico

ICBUSP = Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

ml = mililitro

PCR = Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

spp = espécies

ufc = unidade formadora de colônia

VMGA = Viability Maintaining Microbiostatic Medium

$\mu\text{m}$  = micromolar

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Mostra os dados referentes às amostras coletadas do espaço interno dos implantes, à aplicação ou não da clorexidina nesses espaços, aos tempos de coleta das amostras e às bactérias isoladas e identificadas por cultivos ou PCR (p. 46).

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Termociclador utilizado para a amplificação dos DNA bacterianos, para a identificação das espécies por PCR (p.43).

Figura 2 - Desenvolvimento primário, em agar-sangue suplementado incubado em anaerobiose a 37°C durante 15 dias, de material coletado do espaço interno de um implante não tratado com clorexidina, após 30 dias (p. 48).

Figura 3 - Desenvolvimento primário, em agar-sangue suplementado incubado em anaerobiose a 37°C durante 15 dias, de material coletado do espaço interno de um implante 30 dias após a aplicação de clorexidina (p. 48).

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio; resultado observado com o uso de transiluminador ultravioleta (p. 50).

## RESUMO

A infiltração de fluidos orgânicos e de microrganismos pode ocorrer na interface pilar/implante de implantes osseointegrados, causando mau odor e provável inflamação de tecidos perimplantares. Este estudo teve como objetivo a identificação de oito espécies de periodontopatógenos no espaço interno de implantes de hexágono externo e avaliar a eficácia do uso de solução de clorexidina a 2% no controle bacteriano neste espaço. Foram selecionados quatro pacientes com pelo menos duas próteses sobre implante cada um. As próteses foram removidas limpas e desinfetadas com álcool-iodado anteriormente às coletas de amostras de material da interface parafuso/ implante. Após a primeira coleta foram reposicionados os pilares de prótese, sendo que num dos implantes, foi adicionada solução de digluconato de clorexidina a 2% entre o parafuso do pilar protético e o implante e, no outro implante (controle) nada foi adicionado. Os pacientes foram divididos em dois grupos para novas coletas 30 e 90 dias após a primeira. As amostras foram submetidas a exames microbiológicos para identificação das espécies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*, por cultivos e detecção do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados demonstraram as presenças de *F. nucleatum* e *T. denticola* nas amostras coletadas 30 dias após a aplicação de clorexidina e, *T. denticola* e *P. intermedia* nas que não receberam essa aplicação. Aos 90 dias foi detectada a presença de

*C. rectus* nas amostras dos espaços sem clorexidina e de *P. gingivalis* e *P. intermedia* indiferentemente da aplicação ou não do antisséptico.

## ABSTRACT

The infiltration of organic fluids and microorganisms may occur at the abutment/fixture interface for osseointegrated fixtures, causing bad smell and probable inflammation of perimplantar tissues. The objective of this study was to identify eight kinds of periodonto-pathogens in the internal space of external hexagon fixtures, as well as assessing the effectiveness of the use of a Chlorhexidine solution @ 2% to control the presence of bacteria in this space. Four patients have been selected, with at least two prostheses on implant apiece. The prostheses have been removed, cleaned and disinfected with iodated alcohol before the collection of the sample material from the internal space of the fixture. After the first collection, the abutments were repositioned and, for one of the fixtures, a solution of chlorexidine digluconate @ 2% was added between the abutment screw and the fixture and, for the other fixture (control), nothing was added. The patients have been divided into two groups for new collections on 30 and 90 days after the first collection. The samples have been submitted to microbiological examination for identification of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola* species, by means of growing and DNA detection by polymerase chain reaction (PCR). The results showed the presence of *F. nucleatum* and *T. denticola* in the 30-day samples with chlorexidine applied, and *T. denticola* and *P. intermedia* in the samples collected within 30 days

without chlorhexidine applied, and *P. gingivalis*, *P. intermedia* in the samples collected on the 90<sup>th</sup> day, regardless of the application of the antiseptic. *C. rectus* was also identified in the 90-day samples without the application of chlorhexidine.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os implantes endósseos têm se tornado uma alternativa eficaz na reabilitação bucal de pacientes parcial ou totalmente desdentados (ADELL et al,1981; ADELL et al 1990). Mas à diferença de outros implantes utilizados no corpo humano, os dentais não são totalmente cobertos pelos tecidos, sendo expostos ao ambiente bucal e facilmente contaminados pela microbiota indígena, que pode ocasionar, posteriormente, doenças perimplantares (MCKINNEY; STEFLIK e KOTH, 1984).

As bactérias adaptáveis ao ecossistema bucal começam a colonizar a boca humana algumas horas após o nascimento e, com o passar do tempo, suas relações com o hospedeiro e com outras bactérias do mesmo habitat vão se tornando dinâmicas e complexas, muitas vezes resultando em sucessão bacteriana, da qual pode resultar prejuízo para o nicho ecológico (DE LORENZO, 2004; SLOTS, 1977; SOCRANSKY e MANGANIELLO, 1971). Mais de 500 espécies bacterianas já foram identificadas, por cultivos ou métodos moleculares, na microbiota do biofilme subgingival (DE LORENZO, 2004; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002) e espécies que geralmente o colonizam tardiamente cumprem papel decisivo na etiopatogenia das doenças periodontais e perimplantares (DE LORENZO e CAVENAGUE, 2004; DE LORENZO e MAYER, 2004; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002).

A perimplantite é caracterizada pela perda óssea progressiva associada à inflamação do tecido localizado ao redor do implante dental. Suas características clínicas são semelhantes às da periodontite: inflamação, aumento da profundidade

de sondagem, sangramento à sondagem, supuração, dor, mobilidade e evidências radiográficas de perda óssea (LEKHOLM et al., 1986; TANNER e STILMAM, 1993).

Considerando-se a gravidade da infecção perimplantar, estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de conhecer a etiologia microbiana e, assim, possibilitar o diagnóstico precoce e auxiliar o tratamento adequado, local ou sistêmico, em adição às medidas de prevenção como as instruções de higiene bucal (GROMATZKY e SENDYK, 2002). Além do monitoramento da microbiota dos implantes, o dos dentes adjacentes vem sendo sugerido como medida de prevenção da perimplantite (DUCKWORTH et al., 1987; LANG et al., 1997; LEITÃO, 2003).

Bactérias anaeróbias Gram negativas, notadamente as proteolíticas, têm sido isoladas, em altas frequências, de biofilmes associados à periodontite, à perimplantite e a infecções do sistema endodôntico (DE LORENZO e CAVENAGUE, 2004; DE LORENZO e MAYER, 2004; HANISCH, 1997; LILJENBERG et al., 1997).

A infiltração e colonização microbianas também podem ocorrer na interface pilar-implante de implantes osseointegrados, podendo causar mau odor e inflamação dos tecidos perimplantares (GROSS; ABRAMOVICH e WEISS, 1999).

Esse conhecimento iniciou-se a partir do trabalho publicado por Traversy e Birek (1992), que constataram *in vitro*, que existe infiltração bidirecional de fluido e de bactérias na interface do conjunto pilar-implante “firmemente fixado”. Quirynen e van Steenberghe (1993) confirmaram a presença de quantidades

significantes de microrganismos na porção apical de 18 parafusos de pilares Branemark-padrão que tinham estado em função por três meses.

Essas pesquisas pioneiras, baseadas em cultivos e em microscopia de contraste de fase, abriram um novo campo de investigação na Microbiologia aplicada à Implantodontia.

Métodos moleculares tornaram-se disponíveis, a partir da década de 1990, para a identificação e a discriminação de espécies bacterianas periodontopatogênicas, representando uma excelente opção para o monitoramento microbiológico na área da Implantodontia. Dentre eles, a reação em cadeia da polimerase (PCR) destacando-se pela rapidez e alta especificidade na detecção de microrganismos envolvidos em diferentes processos infecciosos bucais (SLOTS et al., 1995). Essa técnica, bem como as sondas genéticas, além de detectar o DNA de microrganismos não mais viáveis, é particularmente valiosa para a detecção dos não-cultiváveis ou dificilmente cultiváveis, como os treponemas e *Tannerella forsythensis*, além de permitir a identificação de espécies não distinguíveis pelo perfil bioquímico, como *Prevotella intermedia* e *P. nigrescens* (MAYER e DE LORENZO, 2004).

Na Implantodontia atual, recomenda-se o uso adequado de técnicas de assepsia e a utilização de agentes antimicrobianos como medidas preventivas, visando a diminuição ou eliminação de microrganismos que podem colonizar os implantes dentais, evitando com isto a produção de substâncias bacterianas que agredam os tecidos do hospedeiro (BRANEMARK, 1985).

O digluconato de clorexidina, um composto biguanídico, é largamente utilizado em Medicina e Odontologia devido à sua atividade antimicrobiana, mas existem poucas pesquisas avaliando especificamente sua eficácia em Implantodontia. Em altas concentrações possui efeito bactericida e, em baixas concentrações, exerce efeito bacteriostático pela inibição de enzimas glicolíticas e proteolíticas (ERNST et al., 1998; JENKINS; ADDY e NEWCOMBE, 1989). Devido à baixa toxicidade e à boa tolerância dos tecidos, não apresenta efeitos colaterais graves. Suas moléculas têm grande estabilidade e são excretadas pelas vias normais; penetram em mínimas quantidades na mucosa bucal, não havendo evidências de sua permanência no organismo. A clorexidina está consagrada, após 20 anos de uso, como a melhor substância no controle químico da placa bacteriana e o interesse científico voltado para ela é compreensível pelo vasto potencial de sua utilização, ainda a ser explorado nas diversas formas de uso (DOTTORI et al., 2002).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A Revisão da Literatura está dividida em três itens, para facilidade da leitura e melhor entendimento dos trabalhos apresentados.

### 2.1 COLONIZAÇÃO BACTERIANA EM SÍTIOS PERIMPLANTARES

De acordo com De Lorenzo e Cavenague (2004), um implante mal higienizado vai se comportar como um dente mal higienizado. O processo de infecção/inflamação perimplantar inicialmente causa mucosite, na qual ocorre inflamação dos tecidos moles perimplantares, sem 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. Como os problemas infecciosos são importante causa de insucesso dos implantes dentais (DE LORENZO; SIMIONATO e DE LORENZO, 1997), é grande o número de pesquisas processadas no sentido de estabelecer comparações entre as microbiotas instaladas ao redor de implantes saudáveis e nos comprometidos por inflamação e reabsorção óssea, para determinar os patógenos responsáveis pelo risco de insucessos.

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

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: cocobacilo (bacilo pequeno e curto) medindo cerca de 0,4 x 1 µm, Gram negativo, reto ou encurvado, com extremidades arredondadas. Anaeróbio facultativo. Única espécie bucal deste

gênero, seu nicho primário é a região subgengival; coloniza mucosas e compõe 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 requer 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 tardios da placa subgengival, seu principal habitat bucal é o ambiente subgengival, sendo isolado, em altos números, de sítios com gengivite e periodontite severa.

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

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

O primeiro trabalho a relacionar bactérias com doença perimplantar foi publicado por Rams e Link (1983) 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.

Lekholm et al. (1986) demonstraram, na análise de amostras de placa bacteriana e de biópsias de áreas periodontais e perimplantares em pacientes parcialmente desdentados, que as microbiotas instaladas em torno dos implantes e dos dentes sadios são similares e que existe um infiltrado de células inflamatórias em ambas as regiões.

Mombelli; Buser e Lang (1988) estudaram a colonização bacteriana em implantes de cinco pacientes totalmente desdentados, coletando amostras da microbiota desde um dia antes da colocação dos implantes até 180 dias após a mesma. A análise foi feita por microscopia de campo escuro e cultivo de anaeróbios em meios seletivos e não seletivos. Em quatro pacientes a microbiota foi similar à encontrada em dentes saudáveis (maioria de cocos Gram positivos). Mas no caso em particular que apresentava bolsa perimplantar de 6,0 mm e exsudato purulento, a seqüência de coletas revelou diminuição numérica de cocos Gram positivos e simultaneamente ocorreu aumento gradativo do número de bacilos fusiformes após 21 dias e de espiroquetas após 120 dias, caracterizando uma sucessão bacteriana e início de colonização por bactérias patogênicas.

Apse et al. (1989) sugeriram que em pacientes parcialmente desdentados, os dentes servem como fonte de bactérias patogênicas que podem colonizar sítios perimplantares. O estudo examinou a microbiota perimplantar de 21 pacientes, sendo 15 parcialmente desdentados, incluindo microscopia de campo escuro, cultivo e identificação dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*.

Em 1990 Quirynen e Listgarten confirmaram a conclusão de Apse, com um estudo utilizando microscopia de contraste de fase, no qual compararam amostras bacterianas subgengivais de dentes e de implantes em pacientes parcialmente e totalmente desdentados. Reafirmaram que a microbiota da placa bacteriana dos parcialmente desdentados é composta por 65,8% de cocos, 2,3% de bacilos móveis e 2,1% de espiroquetas, enquanto a dos totalmente desdentados abriga 71,3% de cocos, 0,4% de bacilos móveis, não sendo

encontrados espiroquetas. Ratificaram assim, a idéia de que os dentes servem de fonte de bactérias e influenciam a composição da placa bacteriana no sulco perimplantar.

A infecção bacteriana é uma das principais causas de perda de implantes, principalmente em pacientes que apresentam formação excessiva de placa bacteriana, havendo similaridade da microbiota encontrada na perimplantite e na periodontite, como mostra o trabalho de Becker et al. (1990), no qual avaliaram sulcos perimplantares com profundidade maior que 6,0mm com sondas de DNA e encontraram níveis moderados das espécies periodontopatogênicas *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*.

Em 1990 Mombelli e Mericske-Stern descreveram, após um acompanhamento por cinco anos de nove pacientes com dentaduras sobre implantes, que os totalmente desdentados são capazes de manter uma microbiota estável com uma quantidade mínima de periodontopatógenos. Os cultivos microbiológicos demonstraram que 7,3% da microbiota eram constituídos por bacilos Gram negativos anaeróbios (*Fusobacterium ssp* e *Prevotella intermedia*), não tendo sido detectados nem *Porphyromonas gingivalis* nem espiroquetas.

Koka et al. (1993) mostraram, em dez implantes do sistema Branemark instalados em quatro pacientes parcialmente desdentados, que 14 dias após a colocação dos cicatrizadores, notava-se a presença de periodontopatógenos na placa supragengival e, em 28 dias, também na placa subgengival. Foram pesquisados *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema socranskii*, *Actinomyces viscosus* (na atualidade A.

*naeslundii* genótipo 2) e *Treponema denticola*. Interessante notar que *T. denticola* só foi encontrado, mesmo na placa supragengival, aos 28 dias.

Em estudo multicêntrico realizado em 139 pacientes com 460 implantes, van Steenberghe et al. (1993) observaram que o pequeno número de insucessos (6,1%), em três anos de acompanhamento, havia ocorrido em pacientes com elevado índice de placa bacteriana.

Mombelli (1995) relatou que, em pacientes parcialmente desdentados, ocorrem elevadas proporções de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* em materiais coletados de sítios dentais pós-tratamento periodontal e, nos sítios perimplantares, após três a seis meses de exposição do implante ao meio bucal.

Lee et al. (1999) realizaram um estudo em que examinaram 43 pacientes desdentados parciais que receberam 101 implantes, todos com sucesso clínico, objetivando identificar a microbiota perimplantar de acordo com o tipo de restauração protética, o tipo de implante e o histórico de doença periodontal ou perimplantar. Concluíram que o histórico de doença periodontal ou infecções perimplantares têm grande influência na microbiota, principalmente sobre a colonização de bactérias como *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythensis*). No entanto, apesar da presença destes microrganismos na região, os implantes achavam-se osseointegrados e funcionais.

Leonhardt; Renvert e Dahlén (1999) avaliaram, em 88 pacientes, as diferenças entre a microbiota subgengival ao redor de implantes do sistema Branemark com perimplantite e a microbiota de tecidos perimplantares saudáveis,

por cultivos. De 60% dos sítios com perimplantite foram isolados *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Actinobacillus actinomycescomitans*.

Em trabalho publicado em 2002, Leonhardt et al. estudaram a microbiota instalada nos implantes do tipo Branemark de 15 pacientes que haviam sido tratados periodontalmente dez anos antes, tendo constatado que o índice de sucesso dos implantes foi de 94,7%, sendo a perda óssea na ordem de 1,7mm. A microbiota encontrada durante o tratamento periodontal e dez anos depois foi similar, com a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga ssp*, *Actinobacillus actinomycescomitans* e *Campylobacter rectus*, reconhecidos como patógenos periodontais. Este resultado sugere que a presença desta microbiota pode não estar associada a um tratamento periodontal falho, mas que essas espécies bacterianas podem fazer parte de uma microbiota residente na maioria dos indivíduos, sendo encontradas tanto em sítios perimplantares doentes como em sadios.

Sumida et al. (2002) identificaram, por PCR, periodontopatógenos em sulcos perimplantares provavelmente vindos de bolsas periodontais. As espécies detectadas foram *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*. As colonizações de *A. actinomycescomitans* e *P. gingivalis* foram estatisticamente relacionadas com bolsas periodontais e sulcos perimplantares contaminados.

Shibli et al. (2003) fizeram uma análise radiográfica e microbiológica de perimplantite induzida, usando diferentes superfícies de implantes em cães. As

coletas foram realizadas em zero, 20, 40 e 60 dias após a indução, por ligaduras, da perimplantite. Foram detectados *Prevotella intermedia/nigrescens* em 100% dos implantes a partir da coleta de 20 dias e *Porphyromonas gingivalis* em 33,34% em 20 e 40 dias e 29,03% em 60 dias; espécies de *Fusobacterium* foram detectadas em todos os períodos.

No trabalho de Silva (2003), foi feita análise das microbiotas cultiváveis de sítios perimplantares com e sem perda óssea. O autor conclui 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.

Também em 2003, Leitão, concluiu que o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) mostrou-se eficaz para detectar a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em sulcos perimplantares, mesmo naqueles que se apresentavam com reduzidas profundidades, e que a presença destes microrganismos pode ser interpretada como indicadora de risco à doença perimplantar.

## **2.2 INFILTRAÇÃO NA INTERFACE PILAR/IMPLANTE**

Steflik et al. (1991) realizaram um estudo retrospectivo de perda de implantes de vários tipos e 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.

Em 1992, o estudo publicado por Traversy e Birek 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.

McArthy e Guckes (1993) observaram que pacientes nos quais haviam sido instalados pilares Estheticone angulados, se queixavam de sabor e odor desagradáveis e relataram que este problema pode resultar da presença de resíduos orgânicos e da colonização bacteriana entre o pilar da prótese e o implante.

No mesmo ano, Quirynen e van Steenberghe mostraram a presença significativa de microrganismos na interface pilar-implante do sistema Branemark, utilizando-se de microscopia de contraste de fase diferencial; a maioria dessa microbiota (86,2%) era constituída por células cocóides, confirmando os achados de Traversi e Birek. A origem desta contaminação seria uma infiltração nessa interface.

Em 1993, Sennerby e Lekholm mostraram que a contaminação dos pilares protéticos pode causar inflamação nos tecidos moles que os circundam, num trabalho realizado em 20 pilares removidos de humanos duas semanas após serem instalados. Os pilares, após passarem por limpeza em ultrassom com butanol e etanol e autoclavados, foram implantados sob a pele de ratos, onde permaneceram por seis semanas. Os autores constataram inflamação e

destruição dos tecidos em torno dos pilares implantados, independentemente do método de limpeza e esterilização utilizado e diferentemente do grupo-controle, no qual os pilares não haviam sido contaminados. Essa mesma situação clínica pode ocorrer com os tecidos perimplantares em humanos.

Quirynen et al. (1994) examinaram *in vitro* 32 conjuntos pilar-implante do sistema Branemark divididos em dois grupos constituídos respectivamente por parcialmente imersos e por totalmente imersos em meio líquido contendo sangue e inoculado com bactérias isoladas de placas dentais de pessoas com doenças periodontais. Após sete dias de incubação anaeróbia, os microrganismos da parte interna dos implantes foram coletados e semeados em placas de agar-sangue, a seguir incubadas em anaerobiose. O estudo mostrou que a infiltração ocorreu nos dois grupos, porém em maior número no grupo dos totalmente imersos. Esta infiltração pode representar um papel importante na perimplantite, influenciando os resultados a longo prazo do tratamento com implantes. As bactérias identificadas neste estudo foram *Streptococcus* spp, *Peptostreptococcus* (atualmente *Micromonas*) *micros*, *Eubacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, *Bifidobacterium* spp, *Veillonella* spp, *Fusobacterium nucleatum* e *Bacteroides* spp (muitas delas atualmente classificadas nos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*). Assim, esta foi a primeira pesquisa a descrever uma ampla gama de bactérias nessa região, com destaque para espécies anaeróbias.

Vidigal Jr et al. (1995) estudaram a interface pilar-implante, por microscopia eletrônica, em cinco sistemas (Branemark, Screw-Vent, IMZ, TF e SR-Press), concluindo que as diferenças no espaço da interface variam de 20µm até 150µm,

dependendo do sistema e que esta má adaptação causa acúmulo de placa bacteriana, podendo desencadear inflamação nos tecidos perimplantares.

Persson et al. (1996) examinaram a microbiota colonizada na superfície interna dos componentes de 28 implantes do sistema Branemark instalados em dez pacientes parcialmente desdentados que haviam sido tratados com próteses parciais fixas que estavam em função no período de um a oito anos. Os pilares de prótese foram removidos e classificados, de acordo com o estado em que se encontravam, como estáveis, facilmente removidos e frouxos, e foram obtidas amostras da superfície interna dos implantes. A estimativa e identificação das espécies mais predominantes foi realizada em colônias desenvolvidas em agar-sangue, baseadas na reação de Gram, na sensibilidade ao oxigênio e em testes bioquímicos. As superfícies internas de diferentes componentes dos implantes Branemark, após períodos variáveis de função na cavidade bucal, apresentaram uma microbiota heterogênea e primariamente anaeróbia. As amostras individuais demonstraram grande variação. Não pôde ser observada relação entre o tipo e o comprimento do pilar protético, a estabilidade do pilar de prótese, a perda óssea e o tipo e número de microrganismos encontrados nas amostras. A microbiota era constituída principalmente de estreptococos anaeróbios e facultativos, bastonetes anaeróbios Gram positivos tais como os gêneros *Propionibacterium*, *Eubacterium* e *Actinomyces* e bastonetes anaeróbios Gram negativos incluindo os dos gêneros *Fusobacterium* e os atuais *Prevotella* e *Porphyromonas*. Há razões para sugerir que esta presença de bactérias é o resultado de uma contaminação dos componentes implante e pilar de prótese durante os estágios de instalação dos

mesmos e/ou uma transmissão de microrganismos do ambiente bucal durante a função subsequente à instalação da prótese.

Para Jansen; Conrads e Richter (1997), os sistemas de implantes em dois estágios resultam em fendas e cavidades na interface pilar/implante que alojam bactérias que podem vir a causar reações inflamatórias nos tecidos moles ao redor dos implantes. Essas fendas são inevitáveis e seu significado clínico tem sido negligenciado tanto pelos fabricantes como pelos clínicos. Os autores realizaram um trabalho *in vitro* para verificar a infiltração bacteriana na interface implante/pilar em dez sistemas de implantes com 13 combinações implante/pilar, e constataram que todos os conjuntos apresentaram a penetração da bactéria *Escherichia coli*, ou seja, todos os sistemas de implantes testados apresentaram infiltração bacteriana.

Abrahamsson; Berglundh e Lindhe (1998) estudaram os efeitos sobre os tecidos perimplantares após repetidos procedimentos de remoção e reconexão de pilares de prótese em cães. Após um período de osseointegração de três meses foram colocados pilares de prótese em dois implantes em cada cão; num dos implantes o pilar era removido, limpo e recolocado em posição a cada mês; após seis meses de controle de placa bacteriana, os cães foram sacrificados e removidos os blocos ósseos contendo os implantes. No implante-controle em que o pilar não foi removido nenhuma vez, foi encontrada uma zona de tecido conjuntivo mais coronal enquanto que, nos implantes que tiveram seus pilares removidos várias vezes, a zona de tecido conjuntivo se localizava mais para

apical, com uma reabsorção ossea marginal favorecendo o aparecimento de bolsa perimplantar.

Keller; Bragger e Mombelli (1998) estudaram as características clínicas e microbiológicas da área perimplantar, na presença de sobreestruturas cimentadas ou retidas por parafusos, utilizando 15 pacientes que possuíam dentes e implantes do sistema ITI. As conclusões do estudo evidenciam que fendas presentes entre os pilares de prótese e as sobreestruturas ajudam a penetração até a região dos parafusos; a composição da microbiota no sulco perimplantar e sob a sobreestrutura é influenciada pela microbiota bucal e foram detectadas as presenças de *Fusobacterium spp* e *Prevotella intermedia*, em números altamente significativos, nas bolsas perimplantares mais profundas.

A microfenda na interface pilar implante possibilita a infiltração de fluidos locais e de microrganismos, podendo causar odor desagradável, além de inflamação dos tecidos perimplantares. Gross; Abramovich e Weiss (1999), comparando cinco sistemas de implantes (Branemark, Sulzer Calcitek, 3i, ITI e Steri Oss), concluíram que fluidos e pequenas moléculas são capazes de penetrar na estrutura interna de todos os conjuntos analisados, contribuindo, em parte, para mau odor e perimplantite.

Orsini (2000) relatou um caso clínico referente a uma paciente que cinco meses após haver recebido dois implantes osseointegrados, veio a falecer. O bloco ósseo que continha os implantes foi retirado e submetido à análise histológica, que constatou infiltrado inflamatório nos tecidos adjacentes à junção pilar-implante; observou-se, ainda, a presença de placa bacteriana e cálculo

salivar na porção interna dos implantes. Segundo o autor, essa microinfiltração ocorre sempre em implantes de dois estágios.

Piatelli et al. (2001) fizeram um estudo *in vitro* comparativo entre pilares de prótese parafusados (grupo 1) e cimentados (grupo 2), verificando a penetração de fluidos e bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*) na parte interna de 12 implantes. A microscopia eletrônica de varredura comprovou a presença de microfenda entre pilar protético e implante nos dois grupos, sendo que no grupo 1 variou de 2 a 7  $\mu\text{m}$  e no grupo 2 de 7  $\mu\text{m}$ , porém vedada com cimento. Todos os implantes do grupo 1 apresentaram presença de bactérias em seu interior e nenhum do grupo 2 apresentou 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.

Uma revisão de literatura publicada por Quiryneen, de Soete e van Steenberghe (2002) enfatizou que o espaço na interface implante-pilar oferece um ambiente ideal para a instalação e permanência da placa bacteriana, principalmente quando a união implante-pilar de prótese é subgingival, porém não existe uma correlação direta com o desencadeamento da perimplantite.

Cravinhos (2003) analisou *in vitro* a contaminação bacteriana na interface implante-conector protético em três sistemas de implantes comercializados no Brasil (Colosso, Conect e Globtek), utilizando cultura de *Streptococcus sanguis* (*S. sanguinis*). Concluiu que todos os sistemas apresentaram evidências de infiltração bacteriana e que a troca de fluidos através desta interface pode comprometer a estabilidade a longo prazo dos implantes. A existência de

microfenda entre implante e conector protético é inevitável, no entanto pode-se criar artifícios para que o significado clínico dessa fenda seja desprezível. A posição supracrestal da interface, o torque de adaptação do parafuso ao implante e o desenho do sistema são os principais achados que podem apresentar significância clínica.

Segundo Dottori; Sendyk e Gromatzky (2003), existe sempre a colonização bacteriana na interface implante– pilar intermediário. A quantidade de passagem de fluidos e da colonização de microrganismos pode variar entre os vários sistemas de implantes. O significado clínico desta colonização é incerto e a correlação entre perimplantite e os componentes dos implantes em sua área subgingival não é totalmente esclarecida.

Groenendijk et al. publicaram um trabalho em 2004, no qual avaliaram a eficácia da solução de clorexidina a 0,2% no controle da proliferação bacteriana no interior de 46 implantes 3I Titamed divididos em dois grupos de 23: um grupo-teste no qual se aplicou clorexidina e um grupo-controle que não recebeu colocação de clorexidina no espaço implante-pilar. Após seis semanas, o exame dos cultivos mostrou menor desenvolvimento bacteriano no grupo-teste, porém não foi encontrada diferença significativa entre os grupos teste e controle quanto aos índices de placa, índice gengival e presença de células inflamatórias no fluido sulcular.

### **2.3 CLOREXIDINA: EFEITO ANTIBACTERIANO**

Após 20 anos de uso profissional, a clorexidina é reconhecida como “padrão-ouro” em comparação a outros agentes antiplaca bacteriana. O efeito antiplaca da clorexidina é resultado da natureza dicatiônica de sua molécula, que permite ao agente a propriedade de persistência do efeito antimicrobiano na superfície do dente (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 dessa eficácia clínica.

Similarmente, a natureza catiônica da molécula de clorexidina é a razão do manchamento extrínscico do dente, o efeito colateral mais comum associado com o uso do agente. Esse manchamento dental parece ser resultado de uma precipitação de reação local entre o limite dental da clorexidina e cromógenos encontrados nos restos de comida e bebidas. A natureza catiônica da molécula de clorexidina também significa que a atividade do 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 de seu uso no controle bacteriano (JONES, 1997).

Friedman e Golomb (1982) fizeram testes para estudar qual seria a melhor concentração de clorexidina em películas de acetato para liberação lenta do produto dentro de bolsas periodontais e mostraram a redução da microbiota subgingival e a redução da profundidade de bolsas. Soluções a 5, 10 e 20% da

droga foram preparadas e exibiram uma liberação sustentada. Este estudo demonstra que com a fixação da clorexidina no filme polimérico é possível obter-se liberação sustentada da droga por vários meses.

Uma comparação entre duas concentrações de clorexidina em solução para enxágue bucal foi 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%. A clorexidina, em altas concentrações, é bactericida e, em baixas concentrações, é bacteriostática.

Em 1992, Keltjens et al. relataram 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 a longo prazo.

Eaton et al. (1997) fizeram um estudo duplo-cego com 121 pacientes, no qual 60 foram orientados a usar clorexidina a 0,12 % em bochechos e 61 usaram placebo durante um período de 12 semanas. Constataram redução de 50,6% no índice de placa no grupo-teste contra apenas 27,6% no grupo-placebo. Concluíram que a clorexidina a 0,12% diminui em 28% o acúmulo de placa bacteriana e em 25% a inflamação gengival, num período de 12 semanas.

Segundo Dottori et al. (2002), a clorexidina continua sendo o melhor antimicrobiano tanto para redução de placa bacteriana quanto para redução de gengivite.

### 3. PROPOSIÇÃO

Com base nos comentários apresentados nos capítulos Introdução e Revisão da Literatura, este estudo teve as seguintes propostas:

3.1 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 do espaço interno de implantes do tipo hexágono externo;

3.2 avaliar a eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle da proliferação bacteriana 30 e 90 dias após sua aplicação nessa região.

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES E COLETA DA MICROBIOTA

Foram selecionados quatro pacientes dos Cursos de Especialização em Implantodontia e de Mestrado em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UNISA (SP), do gênero feminino, com idade entre 35 e 66 anos, apresentando no mínimo dois elementos de prótese fixa metalocerâmica sobre implante com hexágono externo<sup>1</sup> parafusados em pilares protéticos do tipo Multi-unit<sup>1</sup> havia um período de seis meses a um ano. Para evitar interferência nos resultados bacteriológicos, foram aceitos apenas pacientes que não estavam utilizando nenhum tipo de medicação antibiótica sistêmica ou local pelo menos um mês antes e este cuidado estendeu-se por todo o tempo de duração do experimento (90 dias).

Após serem esclarecidos dos objetivos da pesquisa e de terem lido e assinado carta de consentimento, todos foram submetidos a exame clínico intrabucal e a radiografias periapicais tomadas na região do implante, com posicionador, para verificar a adaptação do conjunto prótese-implante; esses exames indicaram que nenhum deles apresentava sinais evidentes de doença periodontal ou perimplantar. Em cada paciente foi removida uma prótese fixa de dois elementos e os implantes de cada prótese foram divididos em dois grupos para coletas de amostras da microbiota das suas regiões internas: um no qual a

---

<sup>1</sup> Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, Brasil

coleta foi feita num grupo de dois pacientes após 30 dias e, no outro grupo de dois pacientes, 90 dias após a primeira.

Na primeira consulta, após profilaxia com taça de borracha com pedra pomes e bochecho por um minuto com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%, foram removidas duas próteses fixas com dois pilares de prótese do tipo Multi-unit de cada paciente, nos dois grupos, utilizando isolamento relativo com rolos de algodão e sistema de aspiração de alta potência.

Os pilares de prótese e os parafusos foram lavados com escova de náilon, água e detergente, depois deixados em cuba ultrassônica com detergente enzimático por dez minutos, novamente lavados e desinfetados esfregando-os com algodão embebido em solução de álcool-iodado a 0,02% e lavados novamente para remover a solução. A região interna do implante foi desinfetada com algodão embebido em solução de álcool-iodado a 0,02% e depois lavada com água. Os procedimentos de limpeza e desinfecção dos implantes e pilares visaram a obtenção de uma padronização das condições dessas peças quanto à presença de bactérias a ser avaliada imediatamente nos primeiros materiais coletados ("tempo zero"). Após os procedimentos de desinfecção e limpeza dos implantes, foram colhidas duas amostras da microbiota da região interna de cada implante, com cone de papel absorvente estéril número 40<sup>2</sup> utilizado em Endodontia. Uma amostra coletada de cada implante foi conservada em 3,5 ml de meio de

---

<sup>2</sup> Endopoints ® Ind. Com. Ltda Rio de Janeiro, RJ

transporte VMGA III adequado para a manutenção da viabilidade de microrganismos anaeróbios e, a outra, em tubo eppendorf com Água Milli-Q<sup>3</sup> esterilizada, apropriada para a conservação de espécies a serem submetidas à reação em cadeia da polimerase. Em seguida, foram levadas imediatamente para o Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos.

Após a coleta foram reposicionados os pilares de prótese, sendo que antes, em um dos implantes, foi adicionada solução de digluconato de clorexidina a 2% entre o parafuso do pilar protético e o implante e, no outro implante (controle), nada foi adicionado. Foram tomadas radiografias periapicais para constatar a adaptação do pilar no implante, foi dado o torque no parafuso do pilar protético (20 N/mm<sup>2</sup>) e recolocada a coroa de prótese em posição, com o devido torque no parafuso da coroa (10 N/mm<sup>2</sup>).

A segunda coleta no primeiro grupo foi realizada 30 dias após a primeira coleta e, no segundo grupo, 90 dias após a primeira.

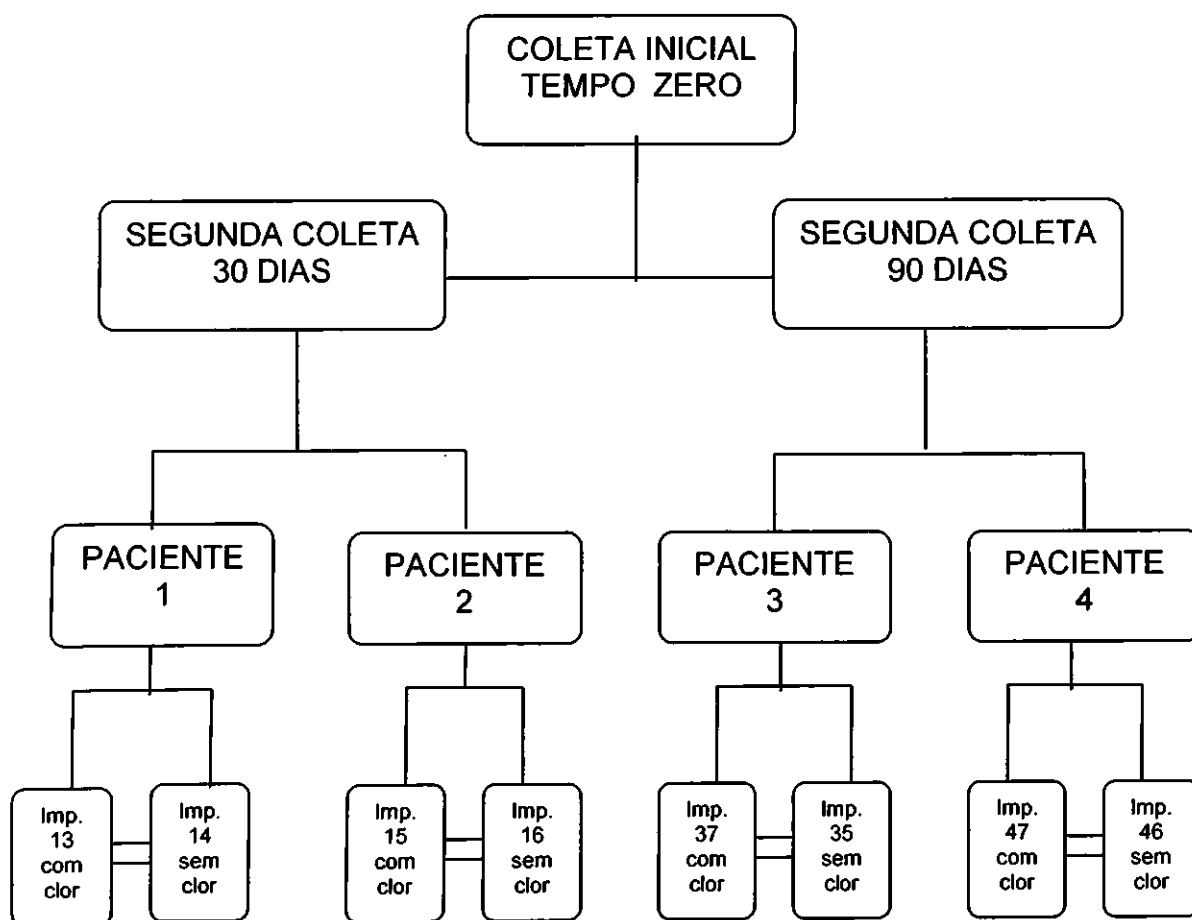
Antes da segunda coleta os pacientes fizeram bochecho com digluconato de clorexidina a 0,12% por um minuto e receberam profilaxia local com taça de borracha e pedra-pomes. Após a remoção das coroas e dos pilares protéticos, foram colhidas duas amostras da microbiota da região interna de cada implante (um fechado com digluconato de clorexidina e o outro controle), com cone de papel absorvente e, como na primeira coleta, um cone foi colocado em 3,5ml de

---

<sup>3</sup> Milipore Ltda., São Paulo SP

meio de transporte anaeróbico VMGA III e, o outro, em tubo eppendorf contendo Água Milli-Q esterilizada. Ambos os meios de transporte foram levados imediatamente ao laboratório.

Organograma que demonstra a seqüência das coletas da microbiota e a distribuição dos pacientes e dos implantes nos grupos que receberam e não receberam aplicação de clorexidina.



13, 14, 15, 16, 37, 35, 47, 46 = posição do dente correspondente ao implante na arcada.

Clor = solução de clorexidina a 2%.

#### 4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO (CULTIVOS)

Os espécimes coletados 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 contendo:

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

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

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

Em seguida, as placas contendo agar-sangue suplementado e Agar Omata e Disraeli foram incubadas em condição de anaerobiose (90% N<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub>) a 37°C, por dez a 15 dias. As placas contendo material semeado em Agar TSBV foram incubadas em condição de microaerofilia (5 a 10% de CO<sub>2</sub>).

Após o tempo de incubação, as colônias desenvolvidas que apresentavam características presuntivas das espécies-alvo desta pesquisa foram imediatamente subcultivadas, para melhor obtenção de culturas puras e aumentar o número de células representativas de cada espécie, requisito necessário para a realização das provas de identificação.

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

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES CULTIVADAS

A identificação das espécies cultivadas foi realizada presuntiva e definitivamente, de acordo com os parâmetros clássicos de Summanen et al. (1993).

Na identificação presuntiva realizada a partir do desenvolvimento anaeróbico em agar-sangue suplementado, as colônias de *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* apresentaram-se como pequenas (diâmetro variando entre 1 e 3 mm), lisas e convexas, apresentando a típica pigmentação negra ou marrom-escuro. Um caráter distintivo importante é evidenciado pela exposição das colônias negras a uma fonte de luz ultravioleta: as do gênero *Prevotella* formadoras de pigmento (*P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* e *P. loescheii*) fluorescem, diferentemente de *Porphyromonas gingivalis*. As colônias de *Fusobacterium nucleatum* são lisas, brancas ou cinzentas, com diâmetro de 0,5 a 2 mm e com aparência de “miolo de pão”.

A coloração de Gram confirmou serem todas Gram negativas.

Também foram determinadas a produção de catalase e indol e a hidrólise da esculina e do amido e a fluorescência das colônias sob luz ultravioleta. A identificação definitiva das espécies-alvo isoladas (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*) foi realizada:

a) pelos testes de fermentação de carboidratos (SOCRANSKY *et al.*, 1979) em meios peptona-extrato de levedura (PY) adicionados de soluções de sacarose, maltose, lactose, glicose e xilose, na concentração final de 1%, e de inóculos das bactérias testadas. Como controles foram utilizados tubos contendo somente PY e as amostras bacterianas. Todos os tubos foram incubados em condições de anaerobiose, a 37°C por cinco dias. O índice de acidificação (Ia) foi determinado pela diferença do pH do tubo-controle e do tubo-teste, sendo que Ia maior ou igual a 0,7U indicou fermentação forte, Ia entre 0,3U e 0,7U fraca fermentação e Ia menor ou igual a 0,3U, ausência de fermentação;

b) com a utilização do sistema comercial Rapid API 32-A<sup>4</sup>, constituído por 29 testes bioquímicos para a identificação de bactérias anaeróbias. As cepas-referência *P. intermedia* ATCC 33563, *P. gingivalis* ATCC 33277 e *F. nucleatum* ATCC 10953 foram utilizadas como controle em todos os testes.

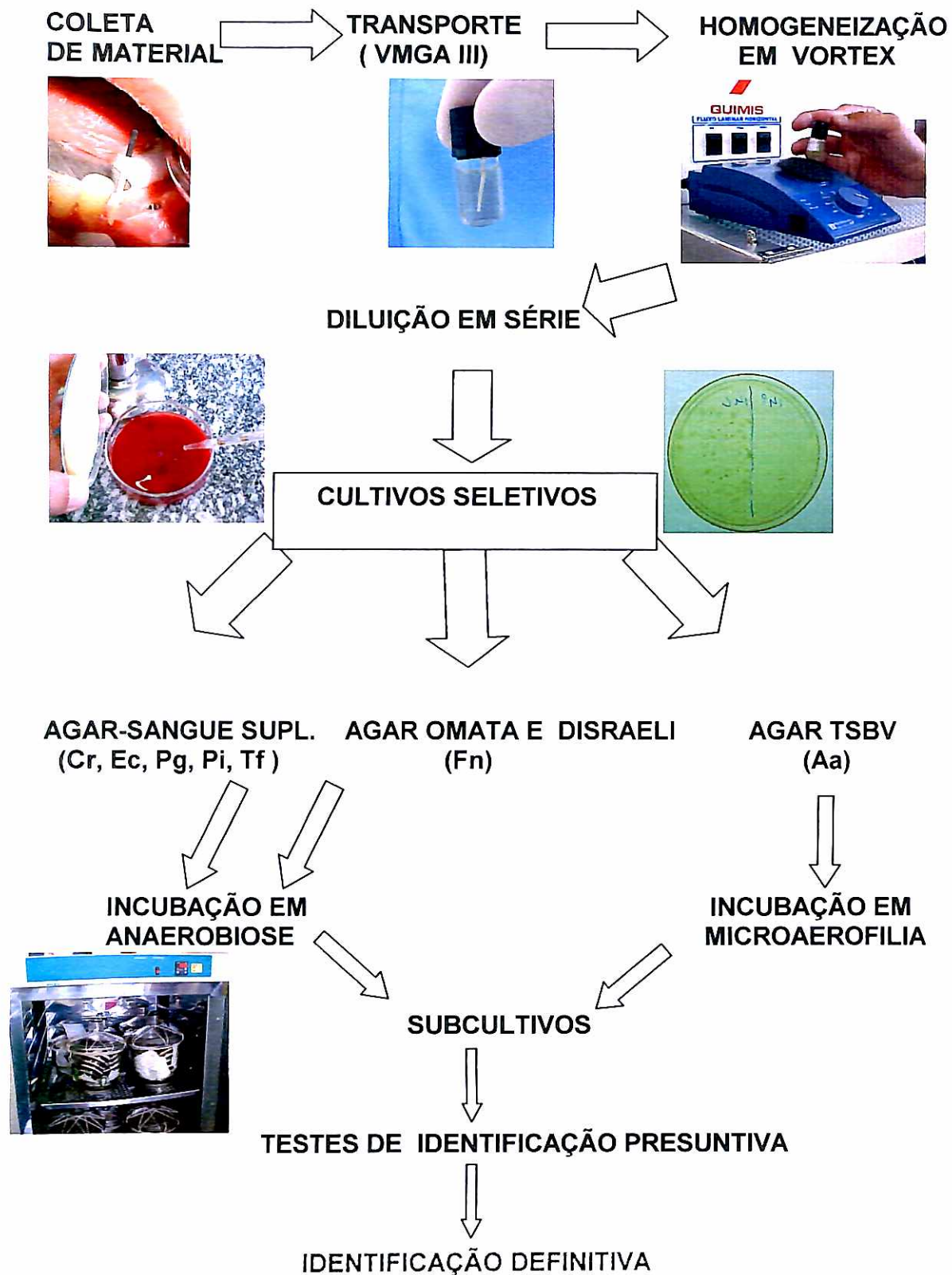
Amostras das três espécies isoladas foram estocadas em *skim milk* (10%), a – 70°C e liofilizadas.

O Fluxograma 1 ilustra a seqüência desses procedimentos.

---

<sup>4</sup> bioMérieux® Lyon França

## FLUXOGRAMA 1 – SEQÜÊNCIA DA IDENTIFICAÇÃO POR CULTIVO



#### 4.4 DETECÇÃO, PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), DOS DNA DAS ESPÉCIES-ALVO, DIRETAMENTE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

##### 4.4.1 EXTRAÇÃO DOS DNA BACTERIANOS

A detecção dos DNA de *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* e *Tannerella forsythensis* foi executada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) diretamente das amostras clínicas. Cada amostra clínica conservada no interior dos tubos eppendorf foi dispersa em vortex por 60 segundos, fervida por dez minutos para extrair o DNA bacteriano (AVILA-CAMPOS e VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2002), centrifugada a 14.000 x g por dez minutos e o sobrenadante (DNA) foi usado imediatamente ou estocado a -20°C até o momento de seu uso.

##### 4.4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS DNA BACTERIANOS

A amplificação dos DNA bacterianos foi realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão PCR <sup>5</sup> (10X), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> <sup>5</sup> (50 mM), 1,0 µl da mistura de dNTP <sup>5</sup> (0,2 mM), 1,0 µl de cada iniciador específico <sup>5</sup> (0,4 (M), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase <sup>5</sup> (0,5U), 8,0 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q esterilizada <sup>5</sup> e 10 µl do DNA isolado. Os iniciadores específicos (G= guanina; C= citosina; A= adenina; T= timina) utilizados segundo Ashimoto et al. (1996) foram:

---

<sup>5</sup> Gibco BRL, São Paulo, SP

- para *A. actinomycetemcomitans*:

5'- GCT AAT ACC GCG TAG AGT CGG - 3'e

5'- ATT TCA CAC CTC ACT TAA AGG T - 3'.

- para *C. rectus*:

5'- TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC -3' e

5' - TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT C - 3'

- para *E. corrodens*:

5'- CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G - 3' e

5'- CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C - 3'

- para *P. intermedia*:

5' - TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG - 3' e

5' - TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T - 3'.

- para *P.gingivalis*:

5' - AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG - 3' e

5' - ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT - 3'.

- para *T. forsythensis*:

5'- GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA - 3' e

5'- TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T - 3'

- para *T. denticola*:

5'- TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T - 3'

5'- TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA - 3'

A amplificação foi realizada em termociclador<sup>6</sup> (Fig. 1) programado para um ciclo de 94°C por cinco minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, em temperaturas diferentes para cada espécie estudada (40°C para *F. nucleatum*, 45°C para *E. corrodens*, 50°C para *P. intermedia*, *C. rectus*, *T. denticola* e *T. fothyensis*, 55°C para *A. atinomycescomitans* e 60°C para *P. gingivalis*), segundo cada par de iniciadores específicos por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo de 72°C por cinco minutos.



Figura 1 - Termociclador utilizado para a amplificação dos DNA bacterianos, para a identificação das espécies por PCR.

---

<sup>6</sup> Perkin Elmer, Gene Ampl PCR System 9700

#### 4.4.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%), em fonte de corrente <sup>7</sup>, a 70 V por 2,5 horas. Após o tempo de corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), observado através de transiluminador UV e fotografado com o sistema Kodak Digital Science System-DC120. Como controle de peso molecular foi usado 1Kb DNA ladder <sup>8</sup>.

Em todos os testes foram utilizadas Água Milli-Q como controle negativo e a fita da bactéria-teste como controle positivo.

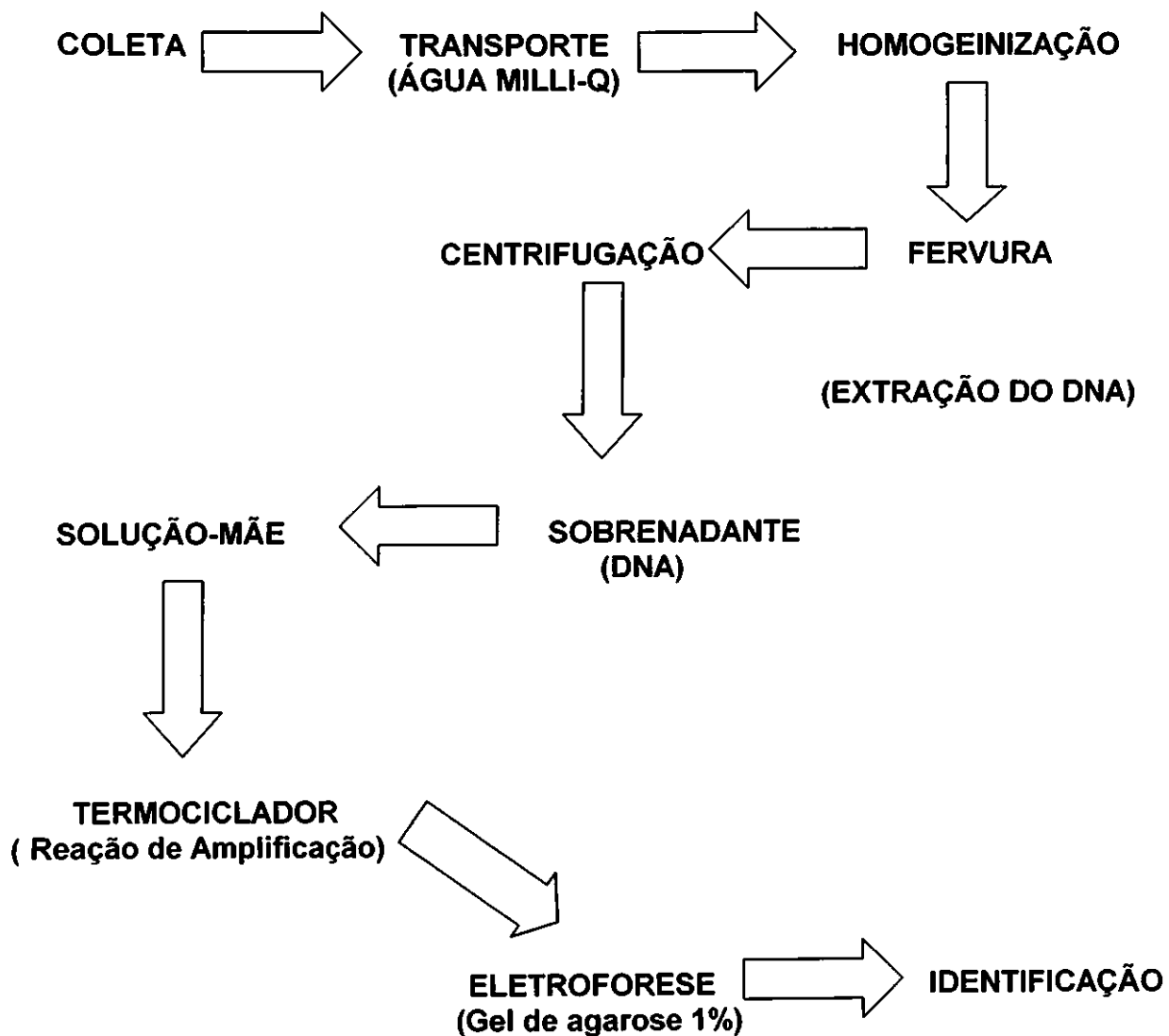
O Fluxograma 2 ilustra a seqüência da identificação dos genomas bacterianos pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

---

<sup>7</sup>BioRad®, São Paulo, SP

<sup>8</sup> Gibco BRL, Life Technologies Laboratories, São Paulo, SP

**FLUXOGRAMA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENOMAS BACTERIANOS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**



## 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 - Dados referentes às amostras coletadas do espaço interno dos implantes, à aplicação ou não da clorexidina nesses espaços, aos tempos de coleta das amostras e às bactérias isoladas e identificadas por cultivos ou PCR.

PACIENTE	ELEMENTO	CLOREXIDINA	TEMPO (DIAS)	Morfotipos encontrados e espécies identificadas em cultivos	Espécies identificadas por PCR
1	13	SIM	Zero	—	—
			30	<i>F. nucleatum</i> Cocos Gram positivos	<i>T. denticola</i>
	14	NÃO	Zero	—	—
			30	Pequenos bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos	<i>T. denticola</i> <i>P. intermedia</i>
2	15	SIM	Zero	—	—
			30	Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos	—
	16	NÃO	Zero	—	—
			30	Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos	—
3	37	SIM	Zero	—	—
			90	Bacilos Gram negativos	<i>P. gingivalis</i>
	35	NÃO	Zero	—	—
			90	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>
4	47	SIM	Zero	—	—
			90	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>
	46	NÃO	Zero	—	—
			90	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>C. rectus</i>

Os resultados microbiológicos obtidos por cultivos ou por PCR nas amostras da primeira coleta (tempo zero) foram negativos, demonstrando que a desinfecção obtida com o uso de álcool-iodado no interior dos implantes (interface pilar-implante) foi suficiente para eliminar a contaminação ocorrida anteriormente, com o tempo de função desses implantes (seis a doze meses). Esta constatação permitiu-nos partir da consideração de que as espécies bacterianas constatadas nas coletas subseqüentes (após 30 e 90 dias) haviam se infiltrado e se implantado posteriormente ao "tempo zero". Mesmo que a ocorrência inicial de descontaminação não tivesse sido constatada, a desinfecção prévia teria nos proporcionado uma condição bacteriológica-padrão em todas as interfaces examinadas.

Com relação às amostras que haviam sido coletadas após 30 dias, tanto naquelas provenientes das interfaces pilar-implante tratadas com clorexidina quanto nas que não foram tratadas, os primo-cultivos revelaram desenvolvimento de grande número de unidades formadoras de colônias (ufc), mas nas amostras das "não tratadas" o número de ufc era muito superior ao das "tratadas", sendo considerado como "incontável" (Fig. 2 e 3).

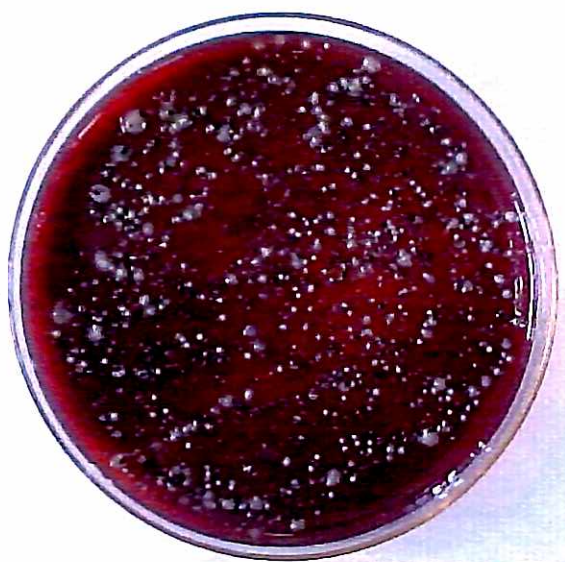


FIGURA 2 – Desenvolvimento primário, em agar-sangue suplementado incubado em anaerobiose a 37°C durante 15 dias, de material coletado do espaço interno de um implante não tratado com clorexidina, após 30 dias.

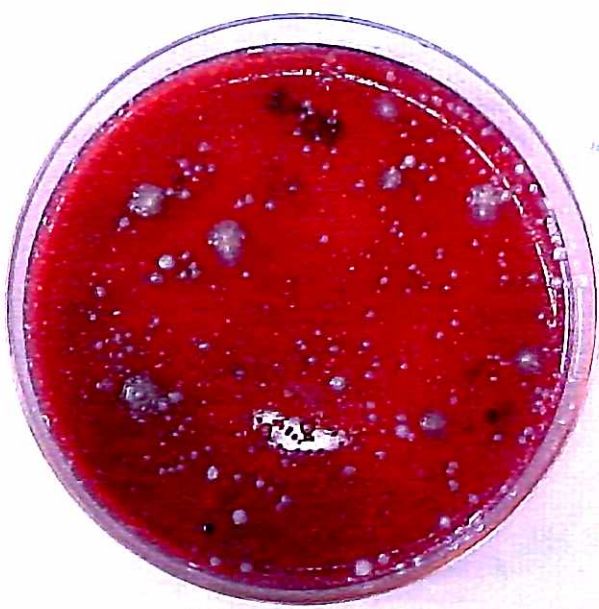


FIGURA 3 – Desenvolvimento primário, em agar-sangue suplementado incubado em anaerobiose a 37°C durante 15 dias, de material coletado do espaço interno de um implante, 30 dias após a aplicação de clorexidina.

Nos cultivos dos materiais coletados aos 90 dias, foi possível constatar que em ambas as amostras o número de ufc havia aumentado em comparação com os observados aos 30 dias e que o grau de desenvolvimento passara a ser equivalente nos dois grupos examinados, portanto aumentando mais nas amostras que haviam sido tratadas com clorexidina. Um fato digno de menção foi o predomínio de colônias pigmentadas em negro, correspondentes ao gênero *Porphyromonas* e a várias espécies de *Prevotella*, incluindo *P. intermedia*.

#### DETECÇÃO, POR CULTIVO E PCR, DAS BACTÉRIAS-ALVO NOS ESPAÇOS INTERNOS DOS IMPLANTES TRATADOS COM CLOREXIDINA

Os resultados evidenciados nas amostras coletadas aos 30 dias demonstram a identificação da presença de *Fusobacterium nucleatum* (somente por cultivo) e de *Treponema denticola* (somente por PCR) entre as peças do implante do paciente 1. Com relação às amostras obtidas do implante do paciente 2, não foi possível identificar nenhuma das espécies-alvo, embora no cultivo tenha se observado o desenvolvimento de bacilos Gram negativos anaeróbios estritos.

Por outro lado, em amostras coletadas aos 90 dias, foram identificados *Porphyromonas gingivalis* (somente por PCR) no implante do paciente 3 e *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* (por cultivo e PCR) no do paciente 4.

#### DETECÇÃO, POR CULTIVO E PCR, DAS BACTÉRIAS-ALVO NOS ESPAÇOS INTERNOS DOS IMPLANTES NÃO TRATADOS COM CLOREXIDINA

Nas amostras coletadas aos 30 dias do implante do paciente 1, o PCR identificou a presença dos DNA de *Treponema denticola* e *Prevotella intermedia*,

mas no implante do paciente 2 não foi identificado o DNA de nenhuma das espécies-alvo, apesar do encontro de bacilos Gram negativos anaeróbios no exame do cultivo.

Nas amostras colhidas aos 90 dias, foram detectados *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* tanto por cultivo como por PCR nos pacientes 3 e 4 e ainda *Campylobacter rectus* (somente por PCR) no paciente 4.

A Figura 4 ilustra os resultados obtidos após a corrida eletroforética em gel de agarose, coloração com brometo de etídio e aplicação de luz ultravioleta.

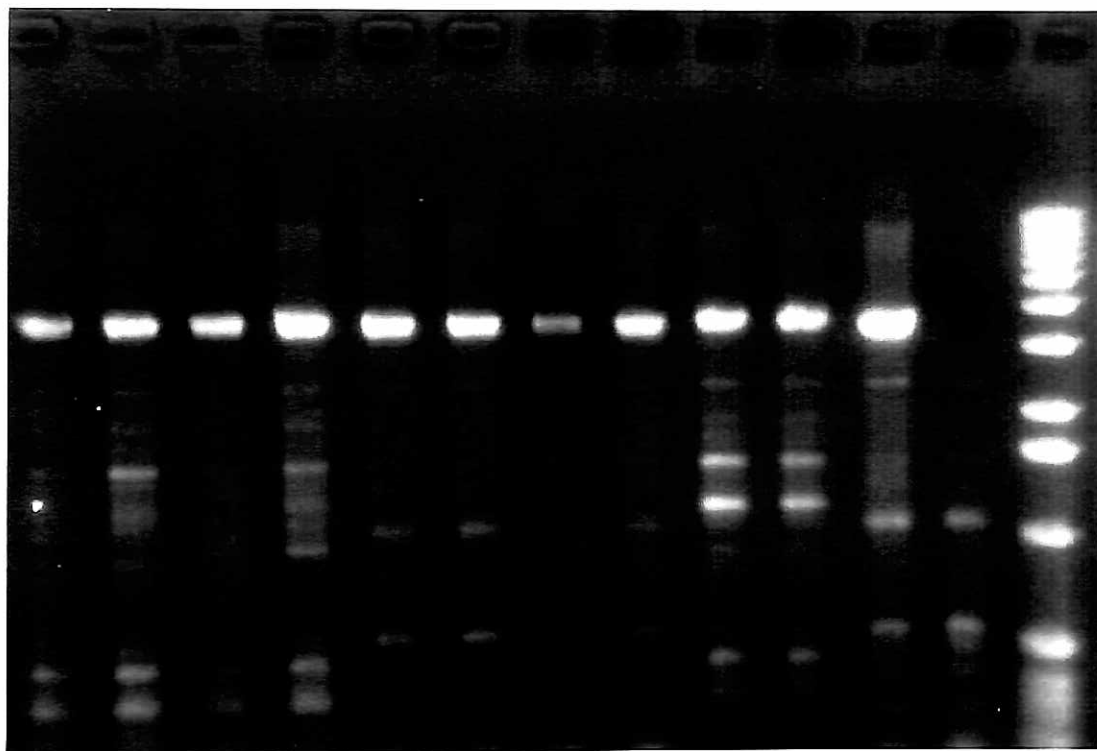


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio; resultado observado com o uso de transiluminador ultravioleta; a imagem vista à direita corresponde ao controle positivo.

## 6. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho foi constatada a infiltração de bactérias na interface pilar/implante com a presença destas bactérias no espaço interno do implante do tipo hexágono externo, incluindo cinco espécies peridontopatogênicas. Essa observação está de acordo com as de Cravinhos (2003), Jansen; Conrads e Richter (1997), Piatelli et al. (2001), Quirynen e van Steenberghe (1993), Quirynen et al. (1994), Rimondini et al. (2001), Sennerby e Lekholm (1993) e Traversy e Birek (1992).

Esta ocorrência praticamente inevitável é uma das possíveis causas de insucesso do tratamento com implantes ósseointegrados, mas essa relação ainda se encontra em estudo. Está demonstrado, pelo menos, que a proliferação de bactérias na interface pilar/implante e no interior do implante onde a prótese é parafusada causa odor fétido e mau gosto (GROSS; ABRAMOVICH e WEISS, 1999; MCCARTHY e GUCKES, 1993), portanto um grande fator de insatisfação do paciente.

O grau de infiltração depende de fatores como a forma do sistema antirotacional, o torque aplicado e a estabilidade do parafuso de fixação da prótese (BURGUETE et al., 1994; GROSS; ABRAMOVICH e WEISS, 1999; JANSEN; CONRADS e RICHTER, 1997; O'MAHONY; MACNEILL e COBB, 2000; VIDIGAL JR et al., 1995). Outro fator que pode interferir na infiltração é a posição da união pilar/implante supra ou sub gengivalmente (QUIRYNEN et al., 1994),

assim como os implantes de estágio único (BROGGINI et al., 2003). Para evitar esta infiltração são colocados, em alguns implantes, sistemas de selamento que parecem diminuir o problema mas não o evita totalmente (DOTTORI et al., 2003; GARG, 2002; JANSEN; CONRADS e RICHTER, 1997; RIMONDINI et al., 2001), ou até o uso de cimento temporário no orifício do parafuso de pilares angulados, como mostra o trabalho de Mc Carthy e Guckes (1993).

Segundo Steflik et al. (1991) a perfeita adaptação entre o componente protético e o implante, bem como a localização da interface, são fatores importantes para o sucesso a longo prazo do tratamento.

A penetração microbiana tem uma limitada relevância clínica frente aos bons resultados, a longo prazo, dos implantes do tipo Branemark (QUIRYNEN e VAN STEENBERGHE, 1993) pelo fato de a instalação da doença não estar relacionada somente com a presença de microrganismos e sim com a prevalência quantitativa dos periodontopatógenos e também com uma interação com o hospedeiro; no entanto, pode estar relacionada com a perda óssea de cerca de 1,0 mm, considerada normal no primeiro ano do implante em função.

A microbiota presente em torno dos implantes instalados na boca, após a instalação do elemento cicatrizador (segunda fase cirúrgica) é semelhante à encontrada em torno dos dentes naturais, tanto nos casos de saúde quanto nos casos de doença (APSE et al., 1989; AUGTHUN, 1997; BAUMAN et al., 1992; HANISCH et al., 1997; KLINGE, 1991; LEE et al., 1999; RAMS e LINK, 1983; SORDYL; SIMIONS e MOLINARI, 1995). No caso de pacientes parcialmente desdentados, o sulco periodontal pode servir de reservatório de bactérias e,

assim, a presença de bolsas periodontais pode favorecer a colonização de periodontopatógenos ao redor dos implantes (GOUVOUSSIS; SINDHUSAKE e YEUNG, 1997; KELLER; BRAGGER e MOMBELLI, 1998; LEKHOLM et al., 1986; LEONHARDT; RENVERT e DAHLÉN, 1999; LISTGARTEN e LAI, 1999; MOMBELLI, 1993; MOMBELLI et al., 1987; MOMBELLI, BUSER e LANG, 1988; MOMBELLI e MERICSKE-STERN, 1990; QUIRYNEN e LISTGARTEN, 1990; QUIRYNEN; DE SOETE e VAN STEENBERGHE, 2002; RAMS et al., 1984; SUMIDA et al., 2002; VAN WINKELHOFF et al., 2000).

De acordo com Slots (1995), os principais microrganismos associados com doença periodontal são *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythensis*) e *Treponema denticola*. De Lorenzo e Mayer (2004), baseados no reconhecimento do *World Workshop of Periodontology* (1996), citam as seguintes associações dos microrganismos estudados neste trabalho com a doença periodontal:

- muito forte: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*;
- forte: *Prevotella intermedia*, *Tanerella forsythensis* e *Treponema denticola*;
- moderada: *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter rectus*;
- evidências iniciais: *Eikenella corrodens*.

Além desses autores, muitos outros relacionam as espécies-alvo do presente estudo com a doença periodontal (ASHIMOTO et al., 1995; AVILA-

CAMPOS e VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2002; LEONHARDT et al., 2002; MOMBELLI e LANG, 1998; NOCITI JR. et al., 2001; SAITO et al., 1997; SHIBLI et al., 2003; TANNER e STILLMAN, 1993) e como possíveis causas de falha dos implantes osseointegrados (BOLLEN et al., 1996; ELLEN, 1998; ESPOSITO et al., 1998; DE LORENZO e CAVENAGUE, 2004; PAPAIOANNOU et al., 1995; ROSENBERG; TOROSIAN e SLOTS, 1991; SALCETTI et al., 1997; SILVA, 2003; STEFLIK et al., 1991).

Frente aos trabalhos científicos analisados na Revisão da Literatura podemos concluir que é muito importante a identificação da presença dos microrganismos diretamente envolvidos com doença periodontal e perimplantar no microespaço entre o implante e o parafuso do pilar de prótese. Esta importância deriva do fato de que esse espaço é um ambiente de anaerobiose propício para a colonização e proliferação de microrganismos que podem, por difusão de fluidos, alcançar os tecidos perimplantares e comprometer o sucesso a longo prazo do implante. É também importante que se consiga uma maneira de evitar essa proliferação, uma vez que é muito difícil evitar a penetração de fluidos e bactérias no espaço entre o implante e o parafuso da prótese; esse recurso pode ser a aplicação de um medicamento antibacteriano como a clorexidina que foi testada neste trabalho.

Das oito espécies bacterianas-alvo deste trabalho foram identificadas, por cultivo e/ou PCR, apenas cinco, das quais quatro são anaeróbias estritas (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola*) e uma é microaerófila (*Campylobacter rectus*), o que

demonstra o baixo teor de  $O_2$  que existe nos microvalamentos formados entre os componentes do implante.

Os resultados obtidos na análise dos materiais coletados aos 30 dias demonstram ausência de colonização de *Porphyromonas gingivalis* e *Campylobacter rectus* nos dois grupos. No entanto, nas amostras derivadas dos implantes do paciente 1, foram detectados *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*. O exame da quantidade total de ufc desenvolvidas revelou menor número nos implantes que haviam sido tratados com clorexidina.

A ocorrência de contaminação por *Porphyromonas gingivalis* e *Campylobacter rectus* só foi possível ser verificada nas amostras coletadas, em ambos os grupos, no 90º dia. Por outro lado, foi constatado considerável aumento na quantidade de ufc nos dois grupos, sendo praticamente equivalentes.

Como pode ser constatado na Revisão da Literatura, é muito pequeno o número de pesquisas, notadamente *in vivo*, destinadas a esclarecer o problema da contaminação dos componentes internos dos implantes bucais. Nossos resultados confirmam os de Persson et al. (1996) quanto às espécies identificadas no interior do implante (bastonetes anaeróbios Gram negativos incluindo os dos gêneros *Fusobacterium* e os atuais *Prevotella* e *Porphyromonas*) e ainda demonstram que a colonização ocorre não só nos momentos cirúrgicos mas também devido à infiltração após a colocação do pilar, pois neste trabalho fizemos a desinfecção do interior do implante e do pilar de prótese, constatando

pelos métodos de cultivo e PCR que este local estava livre dos patógenos na primeira coleta (tempo zero).

As detecções de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* entre os componentes internos de implantes bucais também estão possivelmente concordes com os resultados relatados por Quirynen et al. (1994) que isolaram *F. nucleatum* e, na terminologia sistemática da época, espécies de *Bacteroides*, no qual se enquadravam os atuais *Porphyromonas* e *Prevotella*.

É importante ressaltar que, em nosso trabalho, a identificação dessas espécies foi feita por dois métodos (cultivos e PCR), a partir de duas amostras clínicas diferentes, o que tornou possível na mostra coletada do paciente 1 (elemento 13 com aplicação prévia de clorexidina) a identificação de *Fusobacterium nucleatum* somente por cultivo e não por PCR. O encontro de uma espécie no teste PCR e não no cultivo pode ser explicado pela capacidade deste método de Biologia Molecular ser capaz de detectar o DNA de muito poucas células (em média uma a dez) presentes no material, não sendo necessária nem a viabilidade microbiana, como nos cultivos. Além disso, as espécies coletadas em uma amostragem nem sempre o são em outra.

Todas as espécies bacterianas analisadas em nossa pesquisa apresentam metabolismo exclusivamente proteolítico, com exceção de *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que também utilizam carboidratos (DE LORENZO e MAYER, 2004). Assim sendo, as demais conseguem obter energia utilizando exclusivamente enzimas proteolíticas (proteases ou proteinases) para

degradar substratos orgânicos como aminoácidos. Essa complexa seqüência de reações tem como produtos finais várias substâncias que se caracterizam por odor fétido, como indol, escatol, gás sulfídrico, ácidos cetônicos, aminas fétidas, putrecinas e cadaverinas, o que poderia explicar o mau gosto e o odor característico do interior dos implantes de hexágono externo.

O digluconato de clorexidina, na atualidade, tem sido largamente utilizado como antisséptico devido à sua elevada atividade antimicrobiana (EATON et al., 1997). Após 20 anos de uso a clorexidina é avaliada como um dos melhores agentes anti-placa bacteriana. A natureza dicatiônica de sua molécula permite-lhe a propriedade de persistência do efeito antimicrobiano (substantividade); assim, o grau de persistência da clorexidina na superfície dental é a base de sua eficácia clínica. Seu uso é seguro, pois é bem tolerada pelos tecidos, não apresentando efeitos colaterais graves. Apresenta moléculas de grande estabilidade, excretadas pelas vias normais, não havendo evidências de sua permanência no organismo; penetra em mínimas quantidades na mucosa bucal. Quando utilizada em altas concentrações possui efeito bactericida e, em baixas concentrações, exerce efeito bacteriostático pela inibição de enzimas glicolíticas e proteolíticas (ERNST et al., 1998; JENKINS; ADDY e NEWCOMBE, 1989; MOSHREFI, 2002).

Essas características fizeram com que a clorexidina tenha sido escolhida para a execução deste trabalho, desenvolvido com o objetivo de testar se esse agente antibacteriano consegue, 30 e 90 dias após seu uso, inibir ou pelo menos controlar a colonização bacteriana no microespaço existente entre o implante e o parafuso do pilar de prótese. Em função do grande número de bactérias

encontradas nessa região por alguns autores (QUIRYNEN e VAN STEENBERGHE, 1993; QUIRYNEN et al., 1994; PERSSON et al., 1996) e do longo tempo de observação adotado neste trabalho, optamos por testar a ação da maior concentração de clorexidina encontrada pronta no mercado, ou seja, a 2%. Mesmo assim, é provável que tenha sido exagerada a expectativa de que seu efeito residual ou substantividade se estendesse por 30 e principalmente por 90 dias. Além disso, a constante penetração de fluidos pela interface implante/pilar pode fazer com que a clorexidina seja liberada para fora dos espaços entre os componentes do implante ou perca gradativamente sua atuação antimicrobiana, tal como observado neste trabalho. Porém, de qualquer forma, seu efeito antimicrobiano residual nos primeiros dias após a colocação do pilar protético deve ser importante para favorecer a estabilização do selamento biológico que ocorre entre o epitélio do sulco perimplantar e a superfície do pilar protético.

Os resultados constados em nossa pesquisa só podem ser plenamente cotejados com o único trabalho congênere que nos foi possível localizar na literatura específica. Groenendijk e colaboradores (2004) obtiveram alguns resultados semelhantes aos por nós verificados no 30º dia de observação. Os autores utilizaram uma solução de clorexidina bem menos concentrada (0,12%) que a por nós utilizada e seis semanas (42 dias) após, constataram desenvolvimento bacteriano nas amostras coletadas das uniões parafuso/implante tratadas com clorexidina, embora menor do que nas não tratadas. Nossos resultados confirmam os dessa pesquisa, demonstrando também que o agente antibacteriano em questão foi incapaz de inibir a colonização bacteriana nesse

microvalamento. No entanto, os pesquisadores mencionados não estenderam o prazo de observação e não se preocuparam em identificar as espécies encontradas no cultivo para que pudéssemos comparar os resultados com os obtidos em nosso trabalho.

A apresentação e a análise dos resultados verificados em nosso estudo representam uma contribuição para a valorização do conhecimento da ocorrência de infiltração na interface pilar/implante de hexágono externo e de formação de biofilme no espaço interno do implante, notadamente no sentido de reforçar que, com a evolução dessa biomassa, são criadas condições ambientais para a implantação de espécies patogênicas que poderão fazer aumentar o risco de doença perimplantar e, conseqüentemente, até de perda do implante. Outro aspecto que ficou patente é a necessidade de novos estudos com a finalidade de se encontrarem melhores recursos para minimizar a infiltração e/ou a colonização principalmente de patógenos nessa região.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

7.1. Ocorre infiltração de vários tipos de bactérias próprias do ecossistema periodontal, incluindo espécies reconhecidamente periodontopatógenas, no microespaço formado entre o parafuso do pilar da prótese e a face interna do implante de hexágono externo.

7.2. O grau de contaminação bacteriana foi menos intenso nas amostras examinadas 30 dias após a aplicação de solução de clorexidina a 2% quando comparado com as não tratadas, mas em uma das tratadas foi constatada a presença dos patógenos *Fusobacterium nucleatum* (por cultivo) e de *Treponema denticola* (por PCR). Nas amostras examinadas no 90º dia, verificou-se nítido aumento da população bacteriana nos dois grupos, com a evidenciação das presenças de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, tanto por cultivo como por PCR; por outro lado, este método de identificação molecular detectou o DNA de *Campylobacter rectus* na amostra não tratada com clorexidina.

7.3. Existe a necessidade de outros estudos utilizando não só produtos antimicrobianos, mas também métodos mecânicos, para evitar ou pelo menos reduzir a infiltração microbiana na interface pilar/implante em implantes de hexágono externo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>9</sup>

ABRAHANSSON, I.; BERGLUMDH, T.; LINDHE, J. The mucosal barrier following abutment dis/reconnection. An experimental study in dogs. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 568-572, 1998.

ADELL, R. et al. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 5, p. 347-359, 1990.

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

APSE, P. et al. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. **J. Periodont. Res.**, v. 24, p. 96-105, 1989.

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

AUGTHUN, M.; CONRADS, G., Microbial findings of deep peri-implant bone defects. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 12, p. 106-112, 1997.

AVILA-CAMPOS, M.J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, p. 1-5, 2002.

---

<sup>9</sup> De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023 : informação e documentação: referências : elaboração. Rio de Janeiro, 2002

AVILA-CAMPOS, M.J.; PADILLA, G. Phenotypic stability and plasmid detection in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Braz. Dent. J.**, v. 12, p. 105-108, 2001.

AVILA-CAMPOS, M.J. et al. Arbitrary primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. **J. Periodontol.**, v. 70, p. 1202-1208, 1999.

BAUMAN, G.R. et al. The peri-implant sulcus. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 8, p. 273-280, 1993.

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

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

BINON, P.P. The effect of implant/abutment hexagonal misfit on screw joint stability. **Int. J. Prosthodont.** v. 9, 2, p. 149-160, 1996.

BOLLEN, C.M.L. et al. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 7, p. 201-211, 1996.

BRANEMARK, P.I. Introduction to osseointegration. In: \_\_\_\_\_ **Tissue-integrated prostheses**. Quintessence, Chicago, Publishing, 1985. p.11-76.

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

BURGUETE, R.L.; JOHNS, R.B.; KING, T.; PATTERSON, E.A. Tightening characteristics for screwed joints in osseointegrated dental implants. **J. Prosthet. Dent.**, v. 71, p. 592-599, 1994.

CRAVINHOS, J.C.P. **Análise *in vitro* da contaminação bacteriana na interface implante/conector protético em três sistemas de implantes endósseos.** São Paulo, 2003 (Dissertação de Mestrado - Fac. de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas).

DE LORENZO, J.L. Os pacientes com periodontite devem ser considerados de alto risco para receber implantes? **Rev. Assoc. Paul. Cirurg. Dent.**, v. 50, p. 188, 1996.

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

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

DE LORENZO, J.L.; CAVENAGUE, M. Microbiologia Perimplantar. In: DE LORENZO, J.L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. 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.**, v. 5, p. 321-324, 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. Santo Amaro**, v. 8, p. 40 – 47, 2003.

**DOTTORI, R.H.G. et al. Controle químico da placa bacteriana em Periodontia. Rev. Odontol. Univ. Santo Amaro, v. 7, p. 4-6, 2002.**

**DUCKWORTHY, J. et al. Therapeutic implications of the bacterial pathogens associated with dental implants. J. Dent. Res., v. 66, p. 114, 1987.**

**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 multicenter study carried out in general dental practices. J. Clin. Periodontol., v. 24, p. 189-97, 1997.**

**ELLEN, R.P. Microbial colonization of the peri-implant environment and its relevance to long-term success of osseointegrated implants. Int. J. Prosthodont., v. 11, p. 433 – 441, 1998.**

**ERNST, C.P.; PROCKL, L.; WILLERSHAUSEN, B. The effectiveness and side effects of 0,1% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. Quintessence Int., v. 29, p. 443-448, 1998.**

**ESPOSITO, M. et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. Eur. J. Oral. Sci., v. 106, p. 527-551, 1998.**

**FRIEDMAN, M.; COLOMB, G. New sustained-release dosage form of chlorhexidine for dental use. J. Periodont. Res., v. 17, p. 323-328, 1982.**

**GARG, A. Eliminating microgaps: the PerioSeal implant system. Dental Implant Update, v. 13, p. 81-86, 2002.**

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

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

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

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

HANISCH, O. et al. Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite coated implants. **J. Periodontol.**, v. 68, p. 59-66, 1997.

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

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.**, v. 11, p. 12-6, 1989.

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

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

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

KLINGE, B. Implants in relation to natural teeth. *J. Clin. Periodontol.*, v. 18, p. 482-487, 1991.

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

LANG, N.P. et al. Clinical trials on therapies for peri-implant infections. *Ann. Periodontol.*, v. 2, p. 343-356, 1997.

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

LEITÃO, J.A.O. **Análise da reação em cadeia da polimerase (PCR), da presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em sítios perimplantares.** São Paulo 2003, (Dissertação de Mestrado- Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro – UNISA - SP).

LEKHOLM, U. et al. The condition of soft tissues and fixture abutments supporting fixed bridges. *J. Clin. Periodontol.*, v. 13, p. 558-562, 1986.

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

LEME, M.L.S.F. et al. Perimplantite: mito ou realidade? **Rev. Odontol. Univ. Santo Amaro**, v. 7, p. 70-74, 2002.

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

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

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

LILJENBERG, B. et al. Composition of plaque-associated lesions in the gingiva and the perimplant mucosa in partially edentulous subjects. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 119-123, 1997.

LISTGARTEN, M. A. Microorganisms and dental implants. **J. Periodontol.**, v. 70, p. 220 – 222, 1999.

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

MAYER, M.P.A.; DE LORENZO, J.L. Métodos de Estudo em Microbiologia Oral. In: DE LORENZO, J.L. **Microbiologia para o Estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 49 – 53.

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

MCKINNEY, R.; STEFLIK, D.E; KOTH, D.L. Per, peri or trans? A concept for improved dental terminology. **J. Prosthet. Dent.**, v. 52, p. 267, 1984.

MOMBELLI, A. Microbiology of the dental implant. **Adv. Dent. Res.**, v. 7, p. 202-206, 1993.

MOMBELLI, A.; LANG, N.P. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. **Periodontol.** 2000, v. 7, p. 63-76, 1998.

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

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

MOMBELLI, A.; BUSER, D.; LANG, N.P. Colonization of osseointegrated titaniumimplants in edentulous patients. Early results. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 3, p. 113-120, 1988.

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

MOSHREFI, A. Chorexidine. **Periodontal Abstracts**, v. 50, p. 5-9, 2002.

MULLER, E.; GONZALEZ, Y.M.; ANDREANA, S. Treatment of peri-implantitis: longitudinal clinical and microbiological findings – a case report. **Implant. Dent.**, v. 8, p. 247-254, 1999.

NOCITI JR, F.H. et al. Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 12, p. 295-300, 2001.

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.**, v. 31, p. 249-256, 2000.

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

PAPAIOANNOU, W. et al. The effect of periodontal parameters on the subgingival microbiota around implants. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 6, p. 197-204, 1995.

PASTER, B.J. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 3770 – 3783, 2001.

PERSSON, L.G. et al. Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark system<sup>1</sup> implant components **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 7, p. 90-95, 1996.

PFAU, E.A. **Incidência de espécies do gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas* em pacientes submetidos a implantes dentais.** São Paulo, 2002, (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

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

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

QUIRYNEN, M. et al. Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 5 p. 239-244, 1994.

QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 4, p. 158-161, 1993.

QUIRYNEN, M.; LISTGARTEN, M.A. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 1, p. 8-12, 1990.

RAMS, T.E.; ROBERTS, W.T.; KEYES, P.H. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. **J. Prosthet. Dent.**, v. 51, p. 529-534, 1984.

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

RASPERINI, G. et al. *In vivo* early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments : a comparative microbiological and SEM analysis. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 9, p 357-364, 1998.

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

ROSENBERG, E.S.; TOROSIAN, J.P.; SLOTS, J. Microbiological differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 2, p.135-144, 1991.

SAITO, A. et al. Response of peri-implant tissues to undisturbed plaque formation in dogs : clinical, radiographic, and microbiological findings. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, v. 38, p. 13-20, 1997.

SALCETTI, J.M. et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant **Int. J. Oral Maxillofac. Impl.**, v. 12, p. 32-42, 1997.

SAVITT, E.D. et al. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. **J. Periodontol.**, v. 59, p. 431-438, 1988.

SENNERBY, L.; LEKHOLM, U. The soft tissue response to titanium abutments retrieved from humans and reimplanted in rats. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 4, p. 23-27, 1993.

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

SHIBLI, J.A. et al. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces . **Int. J. Oral Maxillofac. Impl.**, v. 18, p. 383-390, 2003.

SLOTS, J. Microflora in the healthy gengival sulcus in man. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 85, p. 247-254, 1977.

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.**, v. 20, p. 304-307, 1995.

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

SOCRANSKY, S.S. et al. *Capnocytophaga*: new genus of Gram-negative gliding bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 122, p. 29-33, 1979.

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

SORDYL, C.M.; SIMIONS, A.M.; MOLINARI, J.A. The microbial flora associated with stable endosseous implants. **J. Oral Implantol.**, v. 21, p. 19-22, 1995.

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**, v. 6, p. 147-153, 1991.

SUMMANEN, P.H. et al. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 5<sup>a</sup> ed. Singapore: Star Publishing, 1993, p. 20 - 38

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

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

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

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

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

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

## **APÉNDICE**



**PARECER N.º 135/2004**

**PROTOCOLO N.º 095/04** – Apresentado em 17/02/2004

**Projeto de Pesquisa:** "Avaliação da eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle bacteriano na interface Pilar-Implante".

**Pesquisadores Responsáveis:** Mestrando: Roberto Boschetti Ferrari  
Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo

**Área Temática Especial:** Odontologia / Implantodontia

Prezado Pesquisador:

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

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

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto em referencia, a ser desenvolvido na disciplina de Implantodontia do Curso de Mestrado em Implantodontia da Universidade de Santo Amaro – SP, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo.

**Situação: Aprovado em 17/02/2004**

São Paulo, 18 de Fevereiro de 2004

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

## **CARTA DE INFORMAÇÃO**

### **IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NA REGIÃO INTERNA DE IMPLANTES BUCAIS DE HEXÁGONO EXTERNO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 2% NO CONTROLE DESSA MICROBIOTA.**

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que visa avaliar se a solução de clorexidina 2% consegue impedir ou controlar a proliferação de bactérias dentro do implante. Para isso teremos que remover as próteses que estão parafusadas sobre dois implantes, limpar muito bem dentro dos implantes e colher uma amostra de material de dentro de cada implante com um cone (rolinho) de papel. Depois vamos colocar num dos implantes a solução de clorexidina a 2% e no outro não vamos colocar nada, e vamos recolocar as próteses em posição do mesmo modo que estavam no início. Essas amostras vão para o laboratório para ver se os implantes ficaram bem limpos sem nenhuma bactéria.

Após 30 ou 90 dias, dependendo do seu grupo, vamos remover novamente as próteses e colher amostras de dentro dos implantes para ver se houve diferença entre o implante com clorexidina e o outro sem a clorexidina. Após colher as amostras vamos recolocar as próteses em posição do mesmo modo que estavam no início.

Os riscos que podem ocorrer são em relação aos parafusos de fixação das próteses e adaptação das próteses e serão controlados com radiografias durante as sessões de coleta das amostras.

Terá como benefício a realização de profilaxia dental nas duas sessões de coleta de amostras e a limpeza interna dos implantes envolvidos.

É garantida sua liberdade de retirar o consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem o prejuízo da continuidade de seu tratamento nesta instituição.

Não haverá nenhum custo ou despesa sua com os procedimentos realizados, bem como não haverá nenhuma compensação financeira relacionada com a sua participação neste estudo.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes e não será divulgada a identificação de nenhum paciente, e estas informações serão utilizadas somente neste estudo.

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

O trabalho será realizado pelo C. Dentista Roberto Boschetti Ferrari que pode ser encontrado na Rua José de Andrade 326 Centro Guarulhos SP ou pelos telefones (11) 6440-0397 ou (11) 9501-3943. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP UNISA) R. Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías São Paulo – tel. (11) 5929-5477 fax (11) 5920-9160.

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho condicionada à citação de autoria onde for utilizado.

Roberto Boschetti Ferrari