

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Marcello Faria Regueira Alves

**DETECÇÃO DE *Actinobacillus*
actinomycetemcomitans EM SÍTIOS
PERIIMPLANTARES**

Taubaté – SP

2006

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Marcello Faria Regueira Alves

**DETECÇÃO DE *Actinobacillus*
actinomycetemcomitans EM SÍTIOS
PERIIMPLANTARES**

Dissertação apresentada para obtenção do
Título de Mestre pelo Curso de Odontologia
do Departamento de Odontologia da
Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Hernandes
Ricardo

Taubaté – SP

2006

DETECÇÃO DE *Actinobacillus actinomycetemcomitans* EM SÍTIOS PERIIMPLANTARES

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Curso de Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Periodontia

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Dedico esse trabalho aos meus pais, Fábio e Lair, por toda ajuda em minha formação.

À Fernanda pelo amor e companheirismo nas horas difíceis.

À Deus pela luz da minha vida, por me guiar a cada dia na direção correta.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo pela coragem, dedicação e sabedoria ao orientar esse trabalho.

À Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli pelo conhecimento que me transmitiu, pelos contatos necessários para o desenvolvimento dessa dissertação, e pelas muitas idéias, durante minha trajetória no mestrado.

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, coordenador da subárea de Periodontia, por sua amizade nos momentos mais descontraídos e pela experiência nos momentos mais árduos.

Ao Prof. Dr. Jamil Awad Shibli pelas amostras cedidas, que tornou viável a parte experimental desse trabalho.

Ao funcionário Jonas de Carvalho Filho, técnico do laboratório de Biologia Molecular da UNITAU, pela paciência e disponibilidade no processamento das amostras.

Ao Prof. Davi Romeiro Aquino pela constante ajuda nas análises estatísticas e no processamento das amostras.

Aos meus irmãos Maria Luiza, Gabriel, Ana Clara e Fábio pela força, incentivo e compreensão.

Às secretárias Adriana e Alessandra pelas informações sobre datas e documentos, que fizeram com tão boa vontade.

Aos professores pelo conhecimento e convivência durante esses dois anos tão importantes em minha vida.

Ao colega Arnaud Alves Bezerra Júnior pela constante fonte de conhecimento da vida profissional e cotidiana.

À colega Fabiana Cavallini pela amizade e companheirismo no trabalho clínico.

Aos colegas da turma de Periodontia, Leandro, Leonardo, João Batista, Priscilla, Marta e Marli pelas boas lembranças que levarei dessa época.

A todos os colegas de outras subáreas do mestrado pelas diferentes culturas e conhecimentos trocados.

Aos funcionários da UNITAU que vem me acompanhando desde a graduação.

À Universidade de Taubaté por ser minha segunda casa há tanto tempo.

Aos pacientes que possibilitaram a execução deste trabalho.

RESUMO

Actinobacillus actinomycetemcomitans está relacionado com a periodontite agressiva e sua correlação com a periimplantite tem sido investigada em estudos clínicos e microbiológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *A.actinomycetemcomitans* em sítios periimplantares, e avaliar sua relação com profundidade de sondagem (PS), índice gengival (IG), índice de placa (IP) e sangramento à sondagem (SS). Foram incluídos 44 indivíduos adultos divididos em: grupo periimplantite (n=22), com idade $51,3 \pm 10,1$ anos, nos quais o diagnóstico foi estabelecido pela presença de sangramento e/ou supuração à sondagem, perda óssea radiográfica $>3\text{mm}$ a partir do conector protético, e defeito ósseo em forma de cálice (GP). Os indivíduos saudáveis (n=22) com idade $47,7 \pm 12,3$ anos, apresentaram ausência de qualquer um destes sinais (GS). As coletas microbiológicas foram feitas com cones de papel nos sítios periimplantares com $> \text{PS}$, e a presença de *A. actinomycetemcomitans* determinada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os grupos GP e GS foram comparados para IG, IP, SS, PS, pelo teste Qui-quadrado e, a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e os parâmetros clínicos foram comparados pelo Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$). Enquanto GP apresentou PS significativamente maior que GS ($p = 0,000$), os demais parâmetros foram equivalentes entre os grupos ($p > 0,05$). A prevalência de *A. actinomycetemcomitans* foi marginalmente maior (31,8%) em GP que em GS (9,1%), $p = 0,051$. Não foi observada associação entre a presença de *A. actinomycetemcomitans* e os parâmetros clínicos ($p > 0,05$). A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi baixa e embora tenha sido associada com o diagnóstico de periimplantite, não houve associação com os parâmetros clínicos avaliados.

Palavras-chave: Periimplantite. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Implantes.

ABSTRACT

Actinobacillus actinomycetemcomitans is related to aggressive periodontitis, and its correlation with peri-implantitis have been investigated by clinical and microbiological studies. The aim of the present study was to evaluate the presence of *A. actinomycetemcomitans* in peri-implant sites, and also to evaluate the association with probing depth (PD), gingival index (GI), plaque index (PI) and bleeding on probing (BOP). Forty-four subjects were sampled shared in: peri-implantitis group (22), with 51.3 ± 10.1 years, which the diagnosis was established by the presence of bleeding and/or suppuration on probing, radiographic bone loss greater than 3mm from the abutment, and bone defect in disc form (PG). The healthy individuals (22) with 47.7 ± 12.3 years, presented absence of any of those signs (HG). The microbiological samples were collected with paper points on the peri-implant sulci, with the grater PD, and the presence of *A. actinomycetemcomitans* was determined by Polymerase Chain Reaction (PCR). The groups PG and HG were compared for GI, PI, BOP, and PD by chi-square test and, the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* as well as the clinical parameters were compared by Fisher's exact test ($p < 0.05$). Prevalence of *A. actinomycetemcomitans* showed a border-line ($p = 0.051$) difference between groups PG (31.8%) and HG (9.1%). PD was significantly higher in GP than HG ($p = 0.000$), while other parameters were similar between groups ($p > 0.05$). Association with the presence of *A. actinomycetemcomitans* and the clinical parameters was not observed ($p > 0,05$). Although presence of *A. actinomycetemcomitans* was associated with diagnosis of peri-implantitis, in this population it was not associated with the clinical parameters evaluated.

Key-Words: Peri-implantitis. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Implants.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Constituição da mistura utilizada na reação em cadeia da polimerase...27	
Quadro 2 - Seqüência dos pares de primers.....28	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados descritivos dos grupos saudável e periimplantite.....	30
Tabela 2 - Tabela de associação entre <i>A. actinomycetemcomitans</i> e os parâmetros clínicos.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da orientação das fibras colágenas em dente e implantes.....	16
Figura 2 - Aspecto radiográfico da periimplantite.....	17
Figura 3 - Aspecto clínico da periimplantite.....	17
Figura 4 - Gráfico da comparação dos grupos GP e GS com valores médios de idade.....	31
Figura 5 - Gráfico da comparação dos grupos GP e GS com freqüência de homens e mulheres nos grupos.....	31
Figura 6 - Gráfico da comparação dos grupos GP e GS com a presença do <i>A. actinomycetemcomitans</i>	32
Figura 7 - Gráfico de comparação dos grupos GP e GS com valores médios de profundidade de sondagem.....	32
Figura 8 - Gráfico de comparação dos grupos GP e GS com o índice de placa.....	33
Figura 9 - Gráfico de comparação dos grupos GP e GS com o índice gengival.....	33
Figura 10 - Gráfico de comparação dos grupos GP e GS com sangramento à sondagem.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 IMPLANTES DENTÁRIOS.....	14
2.2 PERIIMPLANTITE.....	16
2.3 MICROBIOLOGIA PERIIMPLANTAR.....	17
2.4 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	20
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	21
3 PROPOSIÇÃO	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	24
4.2 EXAME CLÍNICO E RADIOGRÁFICO.....	25
4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	26
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE	47
ANEXO	50

1 INTRODUÇÃO

A introdução dos implantes dentários osseointegrados como uma ferramenta na reabilitação oral e maxilo-facial é uma realidade no cotidiano do odontólogo. Porém, a presença de placa bacteriana ao redor desses implantes pode ser considerada como um dos fatores predisponentes para a perda dos mesmos.

A microbiota periimplantar parece seguir os mesmos padrões da periodontal, mas as características anatômicas e histológicas dos tecidos periimplantares, que os diferenciam do periodonto, podem gerar outros tipos de colonização microbiana e resposta do hospedeiro.

Vários fatores como: diferentes tipos de próteses sobre implantes, espaço inadequado para higienização do paciente, características dos implantes com superfícies variadas, desde lisa até rugosas com diferentes tipos de tratamento de superfície, localização inadequada dos implantes, podem levar a um maior risco de colonização microbiana, e desenvolvimento de periimplantite.

Actinobacillus actinomycetemcomitans é um microrganismo periodontopatogênico capaz de colonizar sítios sulculares e extra-sulculares, como mucosa jugal e língua, em cavidades bucais consideradas saudáveis pelo pequeno acúmulo de biofilme supragengival e discreto grau de inflamação tecidual. Geneticamente essa espécie pode ser classificada em cepas de máxima e de mínima leucotoxicidade, de acordo com uma deleção encontrada na região do *operon*, a qual acarreta aumento na produção de leucotoxina. As cepas de máxima leucotoxicidade têm relação direta com o aumento na profundidade de sondagem e reabsorção óssea nos sítios periodontais. Além disso, a identificação de *A.*

actinomycescomitans pode representar dificuldades nos casos em que as amostras são processadas por meios de cultura, porém isso pode ser minimizado valendo-se da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Os tecidos periimplantares guardam semelhanças, como o epitélio juncional, e diferenças com relação ao periodonto, como por exemplo, a ausência de ligamento periodontal. Periimplantite é processo inflamatório que afeta os tecidos circunvizinhos de um implante em função, resultando na perda de osso de sustentação (ALBREKTSSON ; ISIDOR, 1994).

A ocorrência do *A. actinomycescomitans* e sua relação com o desenvolvimento da inflamação em tecidos periimplantares tem sido pouco estudada, e visto que, o aumento pela procura por implantes osseointegrados é fato e ainda vem se tornando mais acessível às camadas menos favorecidas da população, acreditamos ser necessário a procura por dados que nos forneçam subsídios para a preservação destes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPLANTES DENTÁRIOS

A utilização de implantes osseointegrados, não só como suporte para próteses dentárias, mas também em casos de reabilitações em cirurgia e prótese buco-maxilo-facial, é uma realidade na Odontologia. As estimativas apontam para mais de dois milhões de implantes colocados no início do século XXI, com tendência de aumentar ainda mais nos próximos anos. Apenas o selamento gengival estabelece uma frágil relação entre os componentes transmucosos dos implantes e o ambiente altamente contaminado da cavidade bucal. Assim, o conhecimento da microbiota e dos mecanismos imunológicos locais podem oferecer informações úteis à preservação dos implantes osseointegrados (KAROUSSIS et al., 2004).

Existem dois tipos de falhas em implantes, as falhas precoces e as denominadas falhas tardias. O primeiro tipo de falha pode apresentar relação com a técnica cirúrgica, decorrer da contaminação do implante, de falta de estabilidade primária ou ainda de carga prematura. Por outro lado, o outro tipo, que corresponde às falhas tardias, pode levar à perda do implante, e se deve à sobrecarga oclusal ou à infecção microbiana (TONETTI; SCHMID, 1994).

Os implantes dentários submersos no osso comunicam-se com a cavidade bucal através de conectores protéticos (*abutments*). Existe uma interface entre o implante e seu conector, que irá situar-se muito próximo ou até ao lado da crista óssea. A presença de um micro espaço nessa interface, é apontada como um dos

maiores reservatórios de microrganismos que causam a periimplantite e a perda óssea ao redor do implante (CALLAN et al., 2005).

Vários fatores podem ainda contribuir ao acúmulo de placa em próteses sobre implantes. As superfícies dos implantes podem variar bastante, como: implantes rosqueáveis ou sem espiras, lisos ou com superfícies tratadas. O tratamento das superfícies pode, ainda, variar entre jateamento para aumentar a rugosidade superficial até agregação de partículas de substâncias como a hidroxiapatita, para facilitar a osseointegração. O posicionamento dos implantes no ato cirúrgico, deixando as espiras, ou a superfície rugosa em contato com a mucosa, a interface entre o *abutment* e a prótese, o perfil de emergência da prótese, o espaço para a higienização ou o diâmetro muito largo das coroas protéticas podem levar a uma colonização patogênica do sulco ao redor dos implantes o que pode levar a periimplantite (O'MAHONY et al., 2000).

As características histológicas dos tecidos periimplantares se diferenciam do periodonto, inicialmente pela ausência de ligamento periodontal. Além disso, estes tecidos apresentam menor número de fibroblastos e maior número de fibras colágenas. Já o epitélio juncional, encontra-se presente, com mecanismos de aderência semelhantes àqueles observados no dente. A orientação das fibras colágenas do tecido conjuntivo é paralela a superfície do implante, diferente da situação encontrada nos dentes onde há vários grupos de fibras, que se projetam do cimento para o tecido conjuntivo e osso alveolar (Figura 1). Essas variações podem induzir a diferenças na resposta dos tecidos periimplantares, frente a uma agressão, comparativamente aos tecidos periodontais (BERGLUNDH et al., 2004; LINDHE, 2005).

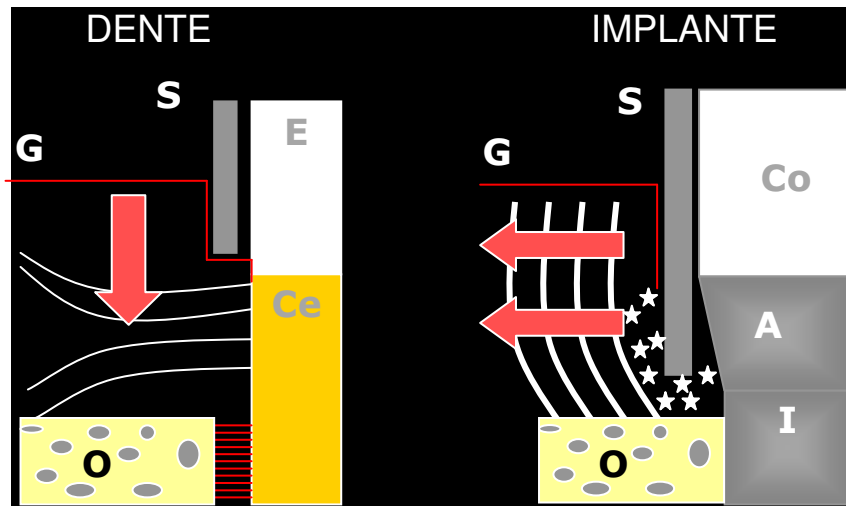


Figura 1 - Desenho esquemático da orientação das fibras colágenas em dente e implantes.

G= gengiva	S= sonda periodontal	E= esmalte	Ce= cimento
O= osso alveolar	Co= coroa protética	A= abutment	I= implante

Fonte: Lindhe (2005).

2.2 PERIIMPLANTITE

O termo periimplantite designa um processo inflamatório que afeta os tecidos circunvizinhos de um implante osseointegrado em função, resultando na perda de osso de sustentação (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994). Segundo Mombelli e Lang (1998), a periimplantite exibe sinais e sintomas específicos que incluem reabsorção óssea em forma de taça ou disco (Figura 2), sangramento a sondagem, ausência de sintomatologia dolorosa, eventualmente supuração, e, hiperplasia tecidual quando os implantes estão localizados em áreas com deficiência de mucosa queratinizada (Figura 3). Ainda de acordo com Mombelli e Lang (1998) a prevalência global de periimplantite parece variar de 5 a 10%. Resultado similar já foi relatado no Brasil (MELO, 2005) embora se deva considerar que a determinação de um número exato é difícil devido à variedade de vieses metodológicos.

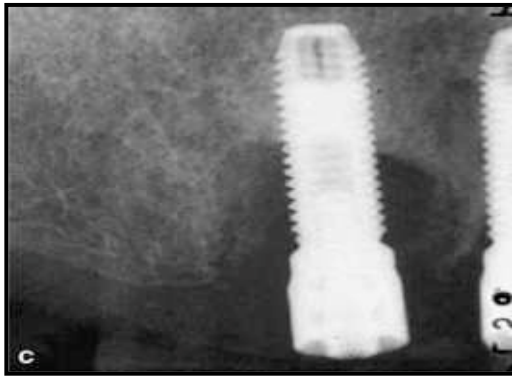


Figura 2 - Aspecto radiográfico da periimplantite
Fonte: Berglundh et al. (2004)



Figura 3 - Aspecto clínico da periimplantite
Fonte: Berglundh et al. (2004)

As lesões periimplantares têm sido associadas com o aumento de espécies bacterianas específicas (MOMBELLI, 1997, 2002; SHIBLI et al., 2003b). O desequilíbrio entre a presença de microrganismos e a resposta do hospedeiro em tecidos periimplantares pode estimular uma resposta inflamatória que além da periimplantite pode também gerar a mucosite periimplantar, uma inflamação reversível, que afeta apenas os tecidos moles periimplantares sem envolver, no entanto, tecido ósseo (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994; JOVANOVIC, 1994; NOCITI JÚNIOR et al., 2001).

2.3 MICROBIOLOGIA PERIIMPLANTAR

Alguns estudos demonstraram associação entre microrganismos e inflamação nos tecidos periimplantares (BERGLUNDH et al., 1992; MOMBELLI, 1993; MOMBELLI; LANG, 1994; PONTORIERO et al., 1994). Foram observadas

similaridades entre a microbiota periimplantar e periodontal, tendo sido comum a observação de patógenos periodontais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Tannerella forsythia* dentre outros (EKE; BRASWELL; FRITZ, 1998; ELLEN, 1998; LISTGARTEN; LAI, 1999; MELO, 2005; NOCITI JÚNIOR, 2001; RUTAR et al., 2001; SUMIDA et al., 2002). Adicionalmente, Mombelli et al. (1988) num estudo em pacientes desdentados, utilizando método de cultura de bactérias, encontraram uma microbiota periimplantar semelhante à periodontal, com exceção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*.

Porém, existem evidências que demonstram diferenças entre a microbiota periimplantar de sítios saudáveis ou com doença (MOMBELLI; LANG, 1998; SHIBLI et al., 2003a, 2003b). Rams e Link (1983) e Rams et al. (1984) utilizando microscopia óptica, foram os primeiros pesquisadores a identificar a microbiota periimplantar.

Rams et al. (1984) colhendo amostras de 17 implantes inseridos há no mínimo seis meses, em 13 pacientes, observaram níveis elevados de espiroquetas e bastonetes móveis em três implantes considerados perdidos. Posteriormente, Becker et al. (1990) avaliaram 36 implantes acometidos com periimplantite, e com o uso de sondas de DNA, encontraram 37,5% de *P. gingivalis*, 35,4% de *P. intermedia* e 27,8% de *A. actinomycetemcomitans*. Já Ong et al. (1992), examinando pacientes que faziam o uso de digluconato de clorexidina 0,2% como enxaguatório bucal, encontraram, em condições de saúde clínica periimplantar, avaliando 37 sítios, um sítio com *A. actinomycetemcomitans*, sete com *P. intermedia* e nenhum sítio com *P. gingivalis*.

Papapannou et al. (1995), correlacionando parâmetros periodontais com a microbiota presente em sítios periimplantares, observaram a presença, em sua maior parte, de cocos na situação de saúde periimplantar. Valendo-se do método de cultura de microrganismos, Augthun e Conrads (1997) avaliaram a presença de espécies da família Bacteroidaceae e *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ssp.* e *Eikenella corrodens* em tecidos moles periimplantares que circundavam defeitos ósseos. Foi observada a presença desses microrganismos em 16 das 18 amostras analisadas, sugerindo a ocorrência de invasão bacteriana nos tecidos periimplantares.

van Winkelhoff e Wolf (2000) relataram um caso no qual um indivíduo foi submetido ao tratamento com implantes após perder os dentes devido a periodontite severa. Após 27 meses da instalação das próteses sobre implante, foi diagnosticado periimplantite em alguns sítios. Realizou-se tratamento com antibióticos (metronidazol e amoxicilina) e bochecho com clorexidina, e então amostras foram coletadas e processadas em meios de cultura, nas quais se observou a presença de *A. actinomycetemcomitans*.

Botero et al. (2005) analisaram a microbiota em lesões da mucosa periimplantar, em dentes vizinhos e dentes distantes dos implantes. Foram coletadas amostras com cones de papel estéreis em 19 indivíduos, sendo um total de 31 implantes e 23 dentes. As amostras foram processadas por método de cultura de bactérias. Os autores concluíram que a microbiota em lesões periimplantares mostram altos níveis de bactérias periodontopatogênicas comparadas com implantes estáveis. Existia ainda uma correlação entre microbiota sub-gengival de lesões periimplantares e dentes para *P. gingivalis* e cocos entéricos, demonstrando assim o potencial de reservatório de bactérias dos dentes remanescentes.

De Boever e De Boever (2006) avaliaram a colonização de sítios periimplantares de 22 indivíduos com história de periodontite agressiva, durante seis meses. Foram analisadas 68 amostras com sondas de DNA, para *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Tannerella Forsythia* e *Treponema denticola*. Eles concluíram que a microbiota periimplantar era semelhante à periodontal dos dentes vizinhos, no período imediatamente após a instalação dos implantes, mantendo-se inalterada pelos seis meses do estudo, não levando nenhum implante à periimplantite.

Os microrganismos presentes em maior quantidade nos sítios periimplantares são os pertencentes ao complexo laranja descrito por Socransky et al. (1998), porém tem como diferença, com relação aos sítios periodontais o aumento nos microrganismos pertencentes ao complexo vermelho, tanto em sítios supra como subgingivais. Desta forma o estudo concluiu que os sítios supragingivais poderiam servir como reservatório de microrganismos por possuírem as mesmas espécies bacterianas. De outro lado houve associação entre os microrganismos do complexo vermelho com a maior profundidade de sondagem (MELO, 2005).

2.4 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans é um cocobacilo, Gram negativo, capnófilico, imóvel que apresenta inúmeros fatores de virulência dentre os quais destaca-se a produção de leucotoxina, a qual apresenta atividade citolítica seletiva. Esta toxina age diretamente na membrana dos leucócitos, abrindo poros que possibilitam o

extravasamento de conteúdo citoplasmático o que por sua vez leva a morte celular (LALLY et al., 1994). As cepas de máxima leucotoxicidade apresentam forte associação com casos mais graves de destruição periodontal, enquanto as cepas de mínima leucotoxicidade parecem colonizar indivíduos saudáveis ou com quadros mais brandos de doença periodontal (HRITZ et al., 1996). Poucos estudos avaliaram a ocorrência destas cepas na população brasileira (CORTELLI et al., 2003, 2005a, 2005b; HARASZTHY et al. 2000). E, existe uma carência na literatura no que se refere a avaliação deste microrganismo nos sítios periimplantares.

Existe a possibilidade de que *P. gingivalis*, *P. intermedia* e quantidades elevadas de leucócitos polimorfonucleares humanos possam inativar a leucotoxina produzida por *A. actinomycetemcomitans*. Porém, quando há predominância deste último patógeno ou ausência de microrganismos competidores, como nos casos de periodontite agressiva, a linha de defesa do hospedeiro parece se tornar ineficaz o que possibilita uma rápida destruição tecidual (JOHANSON; HANSTROM; KALFAS, 2000).

Apesar de alguns estudos detectarem a presença de *A. actinomycetemcomitans* em sítios periimplantares (EKE; BRASWELL; FRITZ, 1998; ELLEN, 1998; LISTGARTEN; LAI, 1999; MELO, 2005; NOCITI JÚNIOR, 2001; RUTAR et al., 2001; SUMIDA et al., 2002; VAN WINKELHOFF; WOLF, 2000), outros estudos avaliando indivíduos desdentados, com ou sem história de periodontite, não encontraram esse microrganismo. (DANSER et al., 1994, 1995; MOMBELLI et al., 1988).

2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A detecção de microrganismos pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), tem se mostrado uma ferramenta bastante sensível, uma vez que a detecção é feita através do DNA bacteriano, e ainda não há a necessidade de microrganismos viáveis, como nos meios de cultura, sendo dessa maneira, possível o armazenamento das amostras em baixas temperaturas, por maior tempo antes do processamento. (RIGGIO et al., 1996; WATANABE; FROMMEL, 1996).

O método de cultura de bactérias, considerado o “*gold standard*”, é capaz de identificar diversos microrganismos presentes na placa bacteriana, além de ser extremamente importante para a busca de novas espécies e para a determinação da susceptibilidade microbiana a diferentes antibióticos. Entretanto, o método de cultura possibilita a avaliação de um número limitado de amostras e espécies bacterianas, por ser extremamente trabalhoso e custoso. Além disso, grande parte de patógenos periodontais é anaeróbia estrita, bactérias difíceis de serem isoladas e cultivadas em diferentes tipos de ágar (MELO, 2005).

A detecção de possíveis patógenos periimplantares e seu controle ou eliminação previamente à colocação dos implantes na cavidade bucal pode inibir a contaminação dos tecidos periimplantares (QUIRYNEN, 2001; SUMIDA et al., 2002) e quem sabe reduzir o risco de desenvolvimento das falhas tardias associadas com infecção. Além disso, a identificação de padrões específicos de virulência em amostras clínicas pode ser importante uma vez que alguns genes de virulência são apenas expressos quando os patógenos estão colonizando ou infectando os tecidos hospedeiros (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2005).

3 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente estudo foi detectar *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em sítios periimplantares doentes e saudáveis, e avaliar sua relação com parâmetros clínicos.

4 METODOLOGIA

4.1 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo 44 indivíduos adultos, não fumantes com no mínimo 21 anos de idade. Foram incluídos homens e mulheres, que possuíam ao menos oito dentes na cavidade bucal, e ao menos uma prótese sobre implante osseointegrado, em função há pelo menos um ano.

Foram excluídos do presente estudo indivíduos submetidos a tratamento periodontal nos últimos 12 meses, portadores de doença sistêmica não controlada, como diabéticos ou imunossuprimidos, gestantes, lactantes bem como aqueles submetidos a antibioticoterapia nos seis meses antecedentes à pesquisa. E ainda, usuários de antiinflamatórios, que podem mascarar os sinais da periimplantite, ou contraceptivos hormonais, que poderiam influenciar no diagnóstico, podendo gerar resultado falso positivo para índice de sangramento gengival, por um período igual ou inferior a seis meses antecedentes à pesquisa.

Os 44 indivíduos analisados foram divididos em 22 portadores de periimplantite (grupo periimplantite) e 22 indivíduos saudáveis (grupo saudável), sendo avaliado um implante por indivíduo. Aquele que fosse portador de sítio periimplantar saudável não poderia possuir nenhuma lesão periimplantar. Foi caracterizado como periimplantite aquele sítio periimplantar que apresentasse sangramento e/ou supuração à sondagem, perda óssea radiográfica maior que 3mm a partir da linha do conector (*abutment*) protético, e defeito ósseo em forma de cálice

(MOMBELLI, 1999; SHIBILI et al., 2003a). Por outro lado, a ausência de todos os sinais clínicos e radiográficos anteriormente descritos caracterizou um sítio periimplantar saudável.

O número de indivíduos saudáveis incluído foi igual ao de indivíduos portadores de periimplantite, de modo que a população fosse composta por um caso de periimplantite para um caso saudável.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté, sob o número 431/05 (ANEXO A).

4.2 EXAME CLÍNICO E RADIOGRÁFICO

Os parâmetros clínicos avaliados durante o exame de diagnóstico da periimplantite foram:

1. Presença (1) ou ausência (0) de placa bacteriana visível,
2. Presença (1) ou ausência (0) de sangramento marginal,
3. Profundidade de sondagem (mm)- caracterizada pela distância da margem periimplantar até o fundo da bolsa ou sulco,
4. Presença (1) ou ausência (0) de sangramento à sondagem,

O exame periimplantar foi realizado por um único examinador, previamente treinado e calibrado (ARAÚJO et al., 2003), coletadas no trabalho de Melo (2005). As medidas de profundidade de sondagem foram determinadas utilizando-se uma sonda periodontal manual do tipo Carolina do Norte, em seis faces do implante: méso-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e méso-lingual. Os exames radiográficos foram realizados utilizando-se técnica do paralelismo. As radiografias obtidas foram processadas, com tempos padronizados

para revelador e fixador, e logo após digitalizadas. Em seguida foram realizadas mensurações da distância entre o conector (*abutment*) e a crista óssea alveolar periimplantar, utilizando-se o *software* CDR (*Computed Dental Radiograph*, Schink Technologies Inc., USA). Essas mensurações foram realizadas por um mesmo examinador.

4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A seleção dos sítios para coleta das amostras microbiológicas foi feita tendo como base as maiores profundidades de sondagem nos sítios periimplantares.

Os sítios selecionados foram isolados com rolete de gaze estéril, e após a remoção do biofilme supragengival, um cone de papel absorvente estéril (Tanari®) foi inserido até encontrar resistência, e mantido em posição por 15 segundos. Os cones foram colocados em um microtubo do tipo eppendorf® contendo 1,0 ml de solução de Ringer, e armazenados à -70°C , para posterior análise laboratorial. As amostras coletadas foram submetidas ao processo de extração de DNA e, posteriormente, uma alíquota desta foi utilizada para a amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para identificação de *A. actinomycetemcomitans*. As amostras foram homogeneizadas em agitador (Vortex, Daigger Vortex Genie 2, A. Daigger & Co. Inc.) por 30 s, duplicadas, adicionando 500µl de água purificada à 500µl da amostra. Em seguida foram centrifugadas (Microcentaur MSE, Sanyo®) à 12000 rpm por 3 min, sendo o sobrenadante descartado. Ao material sedimentado foi adicionado 200µl de matriz comercial de purificação de DNA (Instagene®, Biorad®). Logo após, as amostras foram aquecidas em banho-maria (Quimis®) a 56°C por 30 min; e novamente homogeneizadas por 15

s. Por último, as amostras foram submetidas ao banho-maria à 100°C por 8 min, ocorrendo desta maneira a extração do DNA bacteriano.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador *Mastercycler gradient* - Eppendorf ® em condições padronizadas, utilizando-se mistura previamente estabelecida por Haraszthy et al. (2000), descrito no Quadro 1.

Com a finalidade de comprovar o sucesso da extração de DNA, bem como a mistura e os ciclos empregados no PCR, todas as amostras foram amplificadas utilizando um par de *primers* (Invitrogen®) específico para a bactéria *Camphylobacter rectus*, de alta prevalência, e as amostras negativas para esse microrganismo foram processados para o gene da beta-actina humana, confirmando a presença de DNA nas amostras coletadas. Sendo assim as amostras positivas foram submetidas ao processo de amplificação do DNA bacteriano para verificação da presença de *A. actinomycetemcomitans*. As amostras negativas eram reamplificadas para evitar falsos negativos.

Componente	Quantidade	Concentração Final
H ₂ O Deionizada	10,54 µL	
Tampão para PCR menos magnésio - 10x	2,5 µL,	1x
MgCl ₂ - 50 mM	0,8 µL	1,5 mM
Solução de dNTP - 10 mM	0,5 µL	0,2 mM
<i>Primers</i>	0,5 µl	0,3 µM de cada
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,16 µL	0,08 U
DNA genômico	10 µL	
Volume final	25 µL	

Quadro 1 - Constituição da mistura utilizada na reação em cadeia da polimerase

Os produtos foram amplificados por PCR utilizando-se os pares de *primers* descritos no Quadro 2.

	seqüência	nucleotídeo	produto
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5'- AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC -3'	478-501	557 pb
	5'- ATGCCAACTTGACGTTAAAT-3'	1034-1015	
<i>C. rectus</i>	5'- TTTGGGAGCGTAAACTCCTTTTC -3'	415-437	598 pb
	5'- TTTCTGCAAGCAGACACTCTT -3'	1012-992	
Beta Actina	5'- CGTGACATCAAAGAGAAGCTGTGC -3'	701-724	373 pb
	5'- CAGGAGGAGCAATGATCTTGA -3'	1073-1051	

Quadro 2 - Seqüência dos pares de primers
pb= pares de base

Assim, os produtos da reação de PCR (Quadro 1), junto com uma alíquota da amostra, foram colocados em microtubo para PCR e então levados ao termociclador, onde 35 ciclos de amplificação foram empregados. Previamente a repetição dos ciclos, o termociclador foi mantido em 95°C por 5 min. Em todos os ciclos foi aplicada temperatura de 95°C por 30 s, 55°C durante 30 s e 72°C por 50 s. Após a realização de todos os ciclos, aplicou-se por mais 5 min a temperatura de 72°C.

Em seguida as amostras obtidas, após a termociclagem, foram processadas por eletroforese (Horizon11-14, Life Technologies®) em gel de agarose a 1,5%, e solução tamponada por 90 min e analisados em um transiluminador de irradiação de ultravioleta (TFX-20M, Life Technologies®). Um marcador de peso molecular (Ladder 100-Invitrogen ®), foi empregado em todos os géis, para possibilitar o estabelecimento do peso molecular do produto amplificado pelo PCR. Foram empregados um controle positivo para as reações de amplificação, gerado a partir de bactérias liofilizadas cedido gentilmente pelo Laboratório Fio Cruz do Rio de

Janeiro, e um controle negativo para evitar-se resultados falso positivos ou falso negativos.

Quando exposta à luz ultravioleta, o responsável pela fluorescência do DNA será o corante brometo de etídio. Esses géis obtidos foram fotografados (Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak®) e analisados quanto à presença do microrganismo em questão.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a variável profundidade de sondagem (PS), por ser de distribuição contínua, foi testada a normalidade da amostra segundo o teste de Anderson–Darling, e conseqüentemente comparada através do teste t. A comparação intergrupos nas variáveis: sangramento à sondagem (SS), índice de placa (IP) e índice gengival (IG) foi utilizado o teste qui-quadrado. Já para as variáveis: gênero e presença de *A. actinomycetemcomitans* os grupos foram comparados utilizando-se o teste de proporções. A investigação de associação entre as variáveis foi conduzida por meio do Teste Exato de Fisher. Para todas as análises foi adotado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Foram avaliados 44 indivíduos, distribuídos 22 no grupo periimplantite e 22 no grupo saudável. Os resultados clínicos estão expostos na Tabela 1. Para todos os valores foi adotado $p < 0,05$.

Tabela 1 - Dados descritivos dos grupos saudável e periimplantite

	Saudável	Periimplantite	p^*
N	22	22	
Idade	47,7 ± 12,3 anos	51,3 ± 10,1 anos	0,302
Gênero	Masculino	8 (36%)	5 (23%)
	Feminino	14 (64%)	17 (77%)
			0,316
Índice de Placa	38%	33%	0,531
Índice Gengival	25%	47%	0,066
Profundidade de Sondagem	1,83 (±0,69)	4,79 (±1,60)	0,000* ¹
Sangramento à Sondagem	49%	75%	0,012* ²
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2 (9,1%)	7 (31,8%)	0,051†

*¹ = teste t ($p < 0,05$), *² = qui-quadrado ($p < 0,05$), † = diferença marginalmente significativa

Os dados descritos no Tabela 1 estão ilustrados em gráficos (Figuras 4 a 10). Os parâmetros que apresentaram diferença estatística significativa foram: profundidade de sondagem e sangramento à sondagem (Figuras 7 e 10).

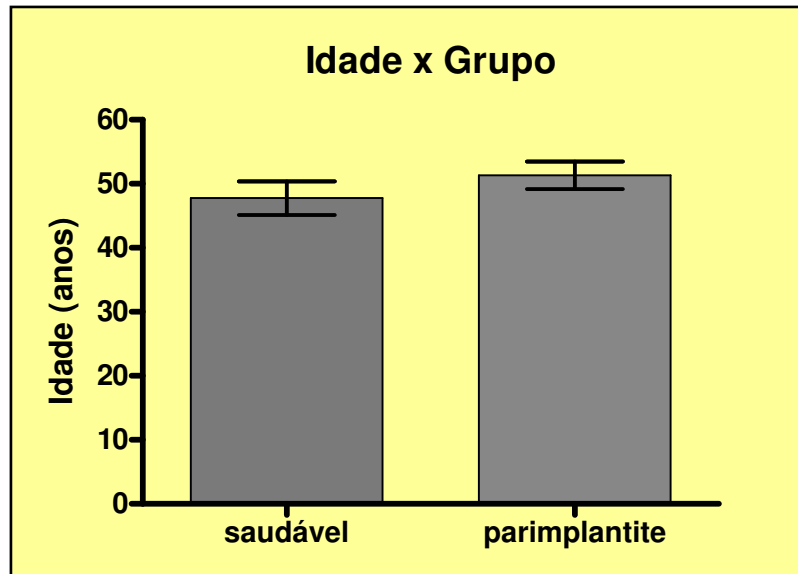


Figura 4 - Gráfico da comparação dos grupos GP e GS com valores médios de idade

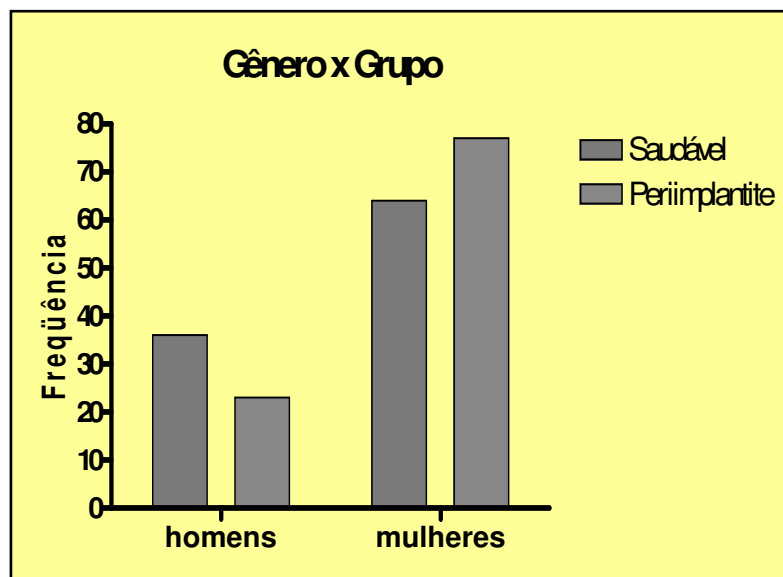


Figura 5 - Gráfico da comparação dos grupos GP e GS com frequência de homens e mulheres nos grupos

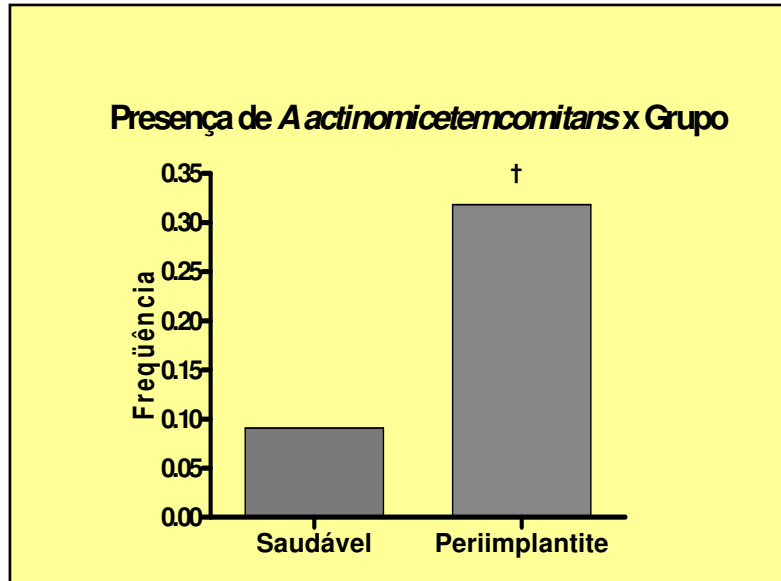


Figura 6 - Gráfico da comparação dos grupos GP e GS com a presença do *A. actinomycetemcomitans*
 († = diferença marginalmente significativa)

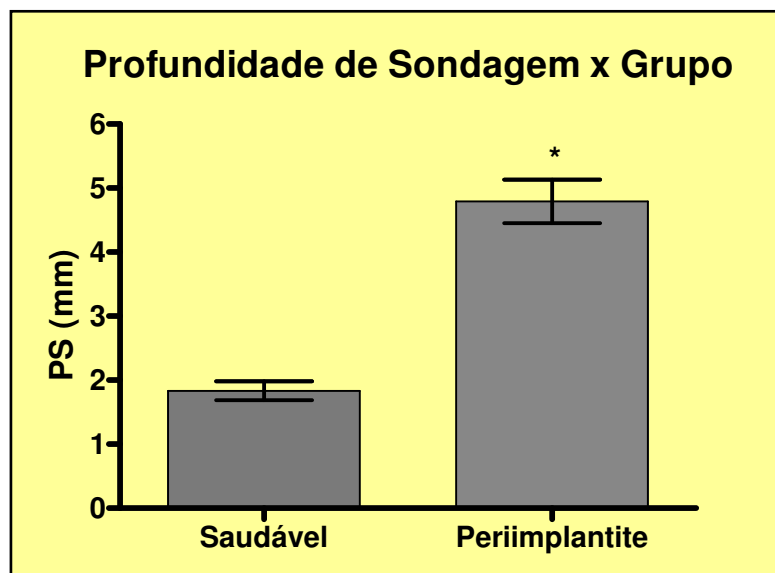


Figura 7 - Gráfico da comparação dos grupos GP e GS com valores médios de profundidade de sondagem
 (* = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) teste t)

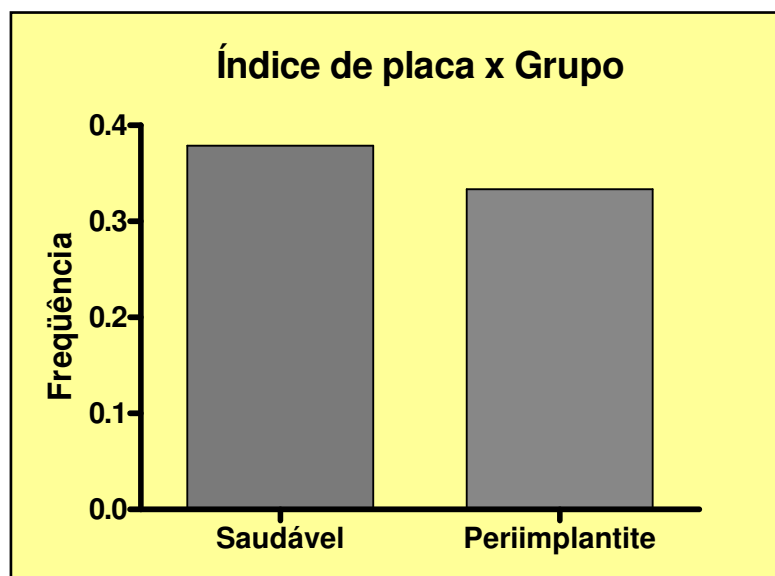


Figura 8 - Gráfico de comparação dos grupos GP e GS com o índice de placa

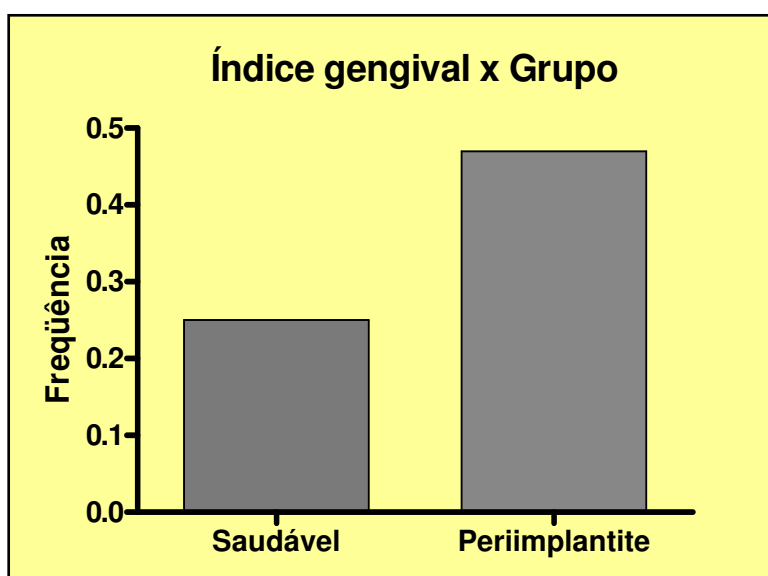


Figura 9 - Gráfico de comparação dos grupos GP e GS com o índice gengival

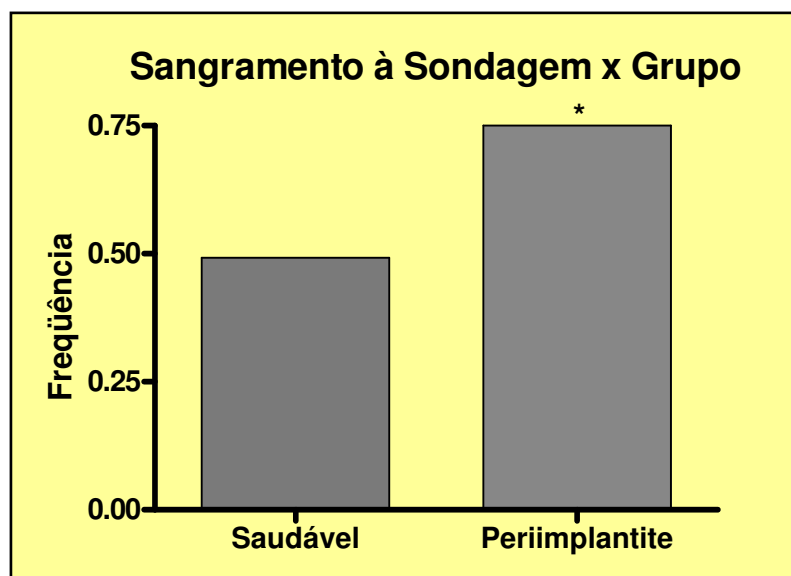


Figura 10 - Gráfico de comparação dos grupos GP e GS com sangramento à sondagem (* = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) qui-quadrado)

Tabela 2 - Associação entre *A. actinomycetemcomitans* e os parâmetros clínicos

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	p^*	
	Saudável	Periimplantite
Profundidade de Sondagem	0,238	0,571
Sangramento à Sondagem	0,714	0,377
Índice Gengival	0,519	0,268
Índice de Placa	0,662	0,107

* = significância estatística onde $p < 0,05$, teste exato de Fisher

Como o nível de significância adotado foi de 5%, não houve diferença estatística significativa para nenhuma das variáveis em relação à presença de *A. actinomycetemcomitans* (Tabela 2), ou seja, não se pode rejeitar a hipótese nula de independência (ausência de associação) entre as variáveis estudadas.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo detectou *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em sítios periimplantares e sua relação com parâmetros clínicos.

Baseado nos relatos de Mombelli e Lang (1998) a prevalência global de periimplantite parece variar de 5 a 10%. Por outro lado alguns estudos encontrados na literatura avaliaram entre 53 e 89 indivíduos, quando avaliados implantes de indivíduos diferentes, e entre nove e 15 quando avaliados em diferentes implantes de um mesmo indivíduo (AUGTHUN; CONRADS, 1997; GOUVOUSSIS; SINDHUSAKE; YEUNG, 1997; KAROUSSIS et al., 2004; RUTAR et al., 2001; SANZ et al., 1990).

Foram avaliados 44 indivíduos, divididos em dois grupos com 22 indivíduos: grupo saudável (GS), com idade média de $47,7 \pm 12,3$ anos, sendo oito (32%) homens e 14 (64%) mulheres; e grupo periimplantite (GP), com média de idade de $51,3 \pm 10,1$ anos, sendo cinco (23%) homens e 17 (77%) mulheres. Devido ao pequeno número de estudos epidemiológicos sobre a natureza da doença periimplantar, especialmente na população brasileira, a relação entre fatores demográficos e a patologia periimplantar ainda precisa ser elucidada. No presente estudo não houve diferença entre a média de idade nem entre os gêneros quando se comparou os indivíduos saudáveis e doentes (Tabela 1 e Figuras 4 e 5). Sumida et al. (2002) também não relataram diferenças com relação ao gênero. Enquanto vários outros estudos também não demonstraram associação entre idade e prevalência de periimplantite (AUGTHUN; CONRADS, 1997; BOTERO et al., 2005; CALLAN et al., 2005; EKE; BRASWELL; FRITZ, 1998; JOVANOVIC, 1994;

MOMBELLI; LANG, 1998; RUTAR et al., 2001; SANZ et al., 1990; SHIBLI et al., 2002; SUMIDA et al, 2002).

Os resultados desse estudo demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa para profundidade de sondagem e sangramento à sondagem entre os dois grupos (GP e GS), estando, esses dados, de acordo com os resultados descritos por Botero et al. (2005), Karoussis et al. (2004), Mombelli (1997) e Sanz et al. (1990). Os valores médios de PS nos grupos mostram que em casos diagnosticados como periimplantite a profundidade de sondagem tende a ser maior que em casos saudáveis. Isso pode ter ocorrido devido à desorganização das fibras colágenas ao redor dos implantes, possibilitando que a sonda periodontal alcance uma posição mais apical em relação à margem gengival. Esta ocorrência já havia sido comentada por Botero et al. (2005), que relataram aumento da profundidade de sondagem nos casos acometidos pela periimplantite. Outro aspecto comentado por Schou et al. (2002) foi que a sondagem ao redor dos implantes permitiu uma maior penetração da sonda em comparação à sondagem periodontal. Essa diferença pode estar relacionada à própria configuração do tecido periimplantar tanto em relação às fibras do tecido conjuntivo quanto à ausência do cemento com fibras colágenas inseridas perpendicularmente.

O mesmo pode ter ocorrido quando o parâmetro avaliado foi sangramento à sondagem. Semelhante aos resultados do presente estudo, Botero et al. (2005) também observaram aumento do sangramento à sondagem em casos com periimplantite. Provavelmente isso pode ocorrer já que o epitélio inflamado da bolsa periimplantar pode estar atrófico e/ou ulcerado, expondo o tecido conjuntivo subjacente levando ao sangramento quando do ato da sondagem (BERGLUNDH et al., 2004). Porém, Jepsen et al. (1996) comentam que com relação ao sangramento

à sondagem, como indicador de risco para a periimplantite, sua ausência é um indicador de saúde periimplantar, uma vez que demonstra a ausência de inflamação, já sua presença não assegura necessariamente a progressão da doença.

Os valores de índice de placa e índice gengival não foram estatisticamente diferentes entre os grupos avaliados. De qualquer maneira, a presença de placa bacteriana, isoladamente, não revela a especificidade dos microrganismos nela presentes, pois segundo a teoria da placa específica descrita por Loesche (1979), mesmo na presença de placa pode não se desenvolver inflamação tecidual, ou em pequenas quantidades dela podemos observar doença, como é o caso da periodontite agressiva, que está intimamente relacionada com *A. actinomycetemcomitans*. Assim uma análise quantitativa isolada do índice de placa pode não apresentar associação com a doença. Todavia, o aumento no acúmulo de placa supragengival por vezes é acompanhado de aumento nos níveis inflamatórios observados na gengiva marginal (CORTELLI et al., 2003).

O índice gengival, por sua vez, tem uma diferença importante com relação ao sangramento à sondagem. Em IG o exame é realizado na margem gengival, enquanto em SS, a sonda penetra até o fundo da bolsa. Berglundh et al. (2004) observaram que o epitélio é mais espesso na região marginal da bolsa periimplantar, e nas regiões mais profundas, o epitélio é extremamente fino, o que pode levar a uma diferença nos resultados.

A. actinomycetemcomitans foi encontrado em 9,1% dos sítios saudáveis e 31,8% dos sítios com periimplantite. Os valores para o grupo periimplantite estão de acordo com os estudos anteriores, que revelam uma prevalência que varia de 17% a 41%, obtidos com diferentes métodos de detecção microbiana (BECKER et al., 1990; CALLAN et al., 2005; MOMBELLI, 1997; SUMIDA et al., 2002). A análise entre

os grupos mostrou diferença estatística marginalmente significativa ($p= 0,051$). Na instalação de implantes osseointegrados, deve-se observar a relação entre os microrganismos presentes na cavidade bucal, e sua relação com as doenças que podem acometer os tecidos periimplantares, inclusive a transmissão de bactérias provenientes de sítios periodontais (QUIRYNEN et al., 2006). Com os resultados obtidos podemos observar que *A. actinomycetemcomitans* está presente em sítios acometidos pela periimplantite, e a progressão dessa patologia pode seguir os mesmo moldes observados na periodontite agressiva, ou seja, com pequena quantidade de placa bacteriana, pouca inflamação, e grande destruição tecidual, como foi descrito por Cortelli et al. (2003).

De acordo com o estudo de Melo (2005), outros microrganismos são mais freqüentes em sítios acometidos pela periimplantite, como *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Sendo assim a baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* pode estar relacionada com a presença desses microrganismos.

A diferença entre os grupos (GS e GP) para a presença de *A. actinomycetemcomitans* mostrou diferença marginalmente significativa, e a correlação entre a presença de *A. actinomycetemcomitans* e os parâmetros clínicos, não mostraram significância estatística, tanto no grupo sem periimplantite, como no grupo com periimplantite. Deve-se levar em consideração que o presente estudo avaliou a presença de *A. actinomycetemcomitans* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que é um método extremamente sensível, e tem a capacidade de detectar os microrganismos mesmo que inviáveis, ou seja, consegue detectá-los mesmo por um fragmento da célula, podendo até detectar aquele que não teria a capacidade de causar danos teciduais (RIGGIO et al., 1996; WATANABE;

FROMMEL, 1996). Por outro lado, Sumida et al. (2002) detectaram através do PCR, 46,7% de *A. actinomycetemcomitans* nos sítios saudáveis, enquanto Nociti Júnior et al. (2001), não observaram esse microrganismo, pela mesma técnica, em sítios acometidos pela periimplantite em cães, o que, por sua vez pode demonstrar semelhanças e diferenças com a microbiota analisada em seres humanos.

Foi observada ausência de associação significativa entre a presença de *A. actinomycetemcomitans* e os parâmetros clínicos. Baseados em dados prevalentes de periimplantite, citados em diferentes estudos, que adotaram diversas metodologias (BOTERO et al., 2005; DE BOEVER; DE BOEVER, 2006; EKE; BRASWELL; FRITZ, 1998; NOCITI JÚNIOR et al., 2001; VAN WINKELHOFF; WOLF, 2000), podemos sugerir que o protocolo adotado no presente estudo, se aplicado à outras populações e a um maior número de indivíduos portadores de implantes, poderia expressar de forma mais evidente a ocorrência ou não de associação entre as variáveis adotadas. Desta forma, futuros estudos devem ser conduzidos para a procura de cepas de *A. actinomycetemcomitans* que possam causar periimplantite.

7 CONCLUSÃO

Nesta população, a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foi baixa tanto no grupo saudável como no grupo periimplantite, e sua ocorrência não esteve associada aos parâmetros clínicos.

REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON, T.; ISIDOR, F. Consensus report of session IV. **Quintessence Int.** Berlim, v. 26, n. 1, p. 365-369, Jan. 1994.

ARAÚJO, M. W. et al. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter and inter-examiner variability. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 74, n. 12, p. 1736-1740, Dec. 2003.

AUGTHUN, M.; CONRADS, G. Microbial findings of deep peri-implant bone defects. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Chicago, v. 12, n. 1, p. 106-112, Jan./Feb. 1997.

BECKER, W. et al. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Chicago, v. 5, n. 1, p. 31-33, Spring 1990.

BERGLUNDH, T. et al. Histopathological observations of human periimplantitis lesions. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, n. 5, p.341-347, May 2004.

BERGLUNDH, T. et al. Soft tissue reaction to *de novo* plaque formation at implants and teeth. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 3, n. 1, p. 1-8, Mar. 1992.

BOTERO, J. E. et al. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. **J. Periodontol.**, Birmingham, v.76, n. 9, p. 1490-1495, Sep. 2005.

CALLAN, D. P. et al. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. **J. Periodontol.**, Birmingham, v.76, n. 1, p. 115-120, Jan. 2005.

CORTELLI, S. C. et al. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 76, n. 2, p. 204-209, Feb. 2005.

CORTELLI, S. C. et al. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 183-188, Apr./Jun. 2003.

CORTELLI, S. C. et al. Presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on the Community Periodontal Index (CPI) teeth in periodontally healthy individuals. **J. Contemp. Dent. Pract.**, Cincinnati, v.15, n. 6, p. 85-93, Feb. 2005.

DANSER, M. M. et al. Putative pathogens colonizing mucous membranes in denture wearing subjects with history of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n. 11, p. 854-860, Nov. 1995.

DANSER, M. M. et al. Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 21, n. 7, p. 484-490, Aug. 1994.

DE BOEVER, A. L.; DE BOEVER, J. A. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 17, n. 1, p. 8-17, Feb. 2006.

EKE, P. I.; BRASWELL, L. D.; FRITZ, M. E. Microbiota associated with experimental peri-implantitis and periodontitis in adult *Macaca mulatta* monkeys. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 69, n. 2, p.190-194, Feb. 1998.

ELLEN, R. P. Microbial colonization of the peri-implant environment and its relevance to long-term success of osseointegrated implants. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 11, n. 5, p.433-441, Sep./Oct. 1998.

GOUVOUSSIS, J.; SINDHUSAKE, D.; YEUNG, S. Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Chicago, v. 12, n. 5, p.666-673, Sep./Oct. 1997.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbiology of periodontal diseases: introduction. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 9-12, Jun. 2005.

HARASZTHY, V. I. et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 71, n. 6, p. 912-922, Jun. 2000.

HRITZ, M. et al. Differential regulation of the leukotoxin operon in highly leukotoxic and minimally leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2724-2729, Jul. 1996.

JEPSEN S. et al. Progressive peri-implantitis. Incidence and prediction of peri-implant attachment loss. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 133-142, Jun. 1996.

JOHANSSON, A; HÄNSTRÖM, L.; KALFAS, S. Inhibition of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* leukotoxicity by bacteria from the subgingival flora. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n. 4, p. 218-225, Aug. 2000.

JOVANOVIC, S. A. Diagnosis and treatment of peri-implant disease. **Curr. Opin. Periodontol.**, Philadelphia, v. 2, n. 1, p. 194-204, Jan./Dec. 1994.

KARO USSIS, I. K. et al. Association between periodontal and peri-implant conditions: a 10-year prospective study. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p.1-7, Feb. 2004.

LALLY, E. T. et al. Identification and immunological characterization of the domain of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* leukotoxin that determines its specificity for human target cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 49, p. 31289-31295, Dec. 1994.

LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

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

LOESCHE, W. J. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 58, n. 12, p. 2404-2412, Dec. 1979.

MELO, L. **Avaliação microbiológica, clínica e da matriz metaloproteinase-8 (MMP-8) na peri-implantite**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)-Universidade Guarulhos, Guarulhos, 2005.

MOMBELLI, A. Etiology, diagnosis and treatment considerations in peri-implantitis. **Curr. Opin. Periodontol.**, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 127-136, Jan./Dec. 1997.

MOMBELLI, A. In vitro models of biological responses to implant microbiological models. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 13, n. 1, p. 67-72. Jun. 1999.

MOMBELLI, A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. **Periodontol.** **2000**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p.177-189, Feb. 2002.

MOMBELLI, A. Microbiology of the dental implant. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 7, n. 2, p.202-206, Aug. 1993.

MOMBELLI, A. et al. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 3, n. 3, p. 113-120, Sep. 1988.

MOMBELLI, A.; LANG, N. P. Microbial aspects of implant dentistry. **Periodontol.** **2000**, Copenhagen, v. 4, n. 1, p. 74-80, Feb. 1994.

MOMBELLI, A.; LANG, N. P. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. **Periodontol.** **2000**, Copenhagen, v. 17, n. 2, p. 63-76, Jun. 1998.

NOCITI JÚNIOR, F. H. et al. Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 12, n. 4, p. 295-300, Aug. 2001.

O'MAHONY, A. et al. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. **Quintessence Int.**, Berlim, v. 31, n. 4, p.249-256, Apr. 2000.

ONG, E. S. et al., The occurrence of periodontitis-related microorganisms in relation to titanium implants. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 63, n. 3, p. 200-205, Mar. 1992.

PAPAIIOANNOU, W. et al. The effect of periodontal parameters on the subgingival microbiota around implants. **Clin. Oral. Implants Res.**, Copenhagen, v. 6, n. 4, p. 197-204, Dec. 1995.

PONTORIERO, R. et al. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. **Clin. Oral. Impl. Res.**, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 254-259, Dec. 1994.

QUIRYNEN, M. et al. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 17, n. 1, p. 25-37, Feb. 2006.

QUIRYNEN, M. Peri-implant health around screw-shaped c.p. titanium machined implants in partially edentulous patients with or without ongoing periodontitis. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 12, n. 6, p. 589-594, Dec. 2001.

RAMS, T. E. et al. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. **J. Prosthetic Dent.**, St. Louis, n. 51, n. 4, p. 529-534, Apr. 1984.

RAMS, T. E.; LINK, C. C. Microbiology of failing dental implants: electron microscopy observations. **J. Oral Implantol.**, Abington, v. 11, n. 1, p. 93-100, Jan./Feb. 1983.

RIGGIO, M. P. et al. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 31, n. 7, p.496-501, Oct. 1996.

RUTAR, A. et al. Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 189-195, Jun. 2001.

SANZ, M. et al. Characterization of the subgingival microbial flora around endosteal sapphire dental implants in partially edentulous patients. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Chicago, v. 5, n. 3, p. 247-253, Fall 1990.

SCHOU S. et al. Probing around Implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingival. A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Clin. Oral Impl. Res.**, Copenhagen, v. 13, n. 2, p. 113-126, Apr. 2002.

SHIBLI, J. A. et al. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Chicago, v. 18, n. 3, p. 383-390, May/Jun. 2003.

SHIBLI, J. A. et al. Microbiota relacionada à periimplantite. **Rev. Cromg.**, Belo Horizonte, v. 8, n. 1, p. 60-64, jan./mar. 2002.

SHIBLI, J. A. et al. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 74, n. 3, p. 338-345, Mar. 2003.

SOCRANSKY, S. S et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 134-144, Feb. 1998.

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

TONETTI, M. S.; SCHIMID, J Pathogenesis of implant failures. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 4, n. 1, p.127-138, Feb. 1994.

VAN WINKELHOFF, A. J.; WOLF, J. W. A. *Actinobacillus actinoyicetemcomitans* associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 7, p. 531-535, Jul. 2000.

WATANABE, K.; FROMMEL, T. O. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polimerase chain reaction. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, n. 3, p. 212-219, Mar. 1996.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título: Cepas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* de máxima e mínima leucotoxicidade em sítios periimplantares.

Responsáveis: Marcello Faria Regueira Alves, Profa. Dra. Lucilene Hernandez Ricardo.

Justificativa: A gengivite, ou inflamação da gengiva é provocada pelo acúmulo de resíduos alimentares que ficam retidos nos dentes, fazendo com que a gengiva fique inchada, vermelha e com tendência a sangramento, isso também pode acontecer em implantes.

Este estudo tem por objetivo avaliar qual a bactéria que faz com que a gengiva ao redor dos implantes fique inflamada. Para a sua realização será feito um exame clínico, onde colocaremos um pedaço de papel na sua gengiva ao redor do implantes e será removida logo em seguida.

Tempo envolvido e benefício: Nenhum tempo adicional será exigido pela sua participação voluntária.

Custo e pagamentos: Não haverá nenhum custo para participar deste trabalho. Todo o material necessário será fornecido pelo grupo de pesquisa

Sigilo: Estou ciente de que qualquer informação a meu respeito obtida na pesquisa será confidencial. Foi me explicado que minha identidade não será revelada em qualquer descrição ou publicação desta pesquisa.

Direito de se retirar da pesquisa: Estou ciente de que posso me recusar a participar neste estudo e que a minha decisão não afetará negativamente o

atendimento a ser recebido por esta instituição ou causar perda de benefícios aos quais, de outra forma, teria direito. Também estou ciente de que os pesquisadores podem pedir que eu me retire do estudo.

Indenização e danos: O exame realizado não dói e não causa nenhum dano para a sua pessoa, assim, não haverá qualquer tipo de pagamento pelo exame.

Consentimento voluntário: Eu certifico que li o acima exposto ou que o mesmo tenha sido lido para mim e compreendo o seu conteúdo. Quaisquer dúvidas que eu tenha pertinentes à pesquisa serão respondidas por um dos pesquisadores mencionados acima. Uma cópia deste documento me será entregue. Minha assinatura abaixo significa que eu concordei em participar nesse estudo experimental.

Eu, _____

nascido em ____/____/____, na cidade de _____ portador (a) do
RG de número _____ residente na _____

estado civil _____, declaro ter sido devidamente esclarecido
sobre o estudo e ter lido e entendido o termo que estou assinando abaixo.

_____ de _____ de _____ de 200__.

Assinatura


Eu declaro que expliquei ao acima mencionado a natureza e finalidade deste estudo.

Eu respondi a todas as perguntas que me foram feitas e testemunhei a assinatura
acima.

Assinatura do Pesquisador

ANEXO

ANEXO A – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa

	Universidade de Taubaté Autarquia Municipal de Regime Especial Reconhecida pelo Dec. Fed. Nº 78.924/78 Recredenciada pela portaria CEE/GP nº 30/03 CNPJ 45.176.153/0001-22	Reitoria Rua 4 de Março, 432 Centro Taubaté-GP 12020-270 tel.: (12) 225.4100 fax: (12) 232.7690 www.unitau.br reitoria@unitau.br PRPPG - Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação Comitê de Ética em Pesquisa Rua Visconde do Rio Branco, 210 Centro Taubaté-SP 12020-040 tel.: (12)225.4217 225.4143 fax: (12)232.2947 edwiges@unitau.br
---	---	--

DECLARAÇÃO

Protocolo CEP/UNITAU nº 431/05 (Esse número de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto)


Projeto de Pesquisa: *Cepas de Actinobacillus actinomycetemcomitans de máxima e mínima leucotoxicidade em sítios periimplantares*

Pesquisador(a) Responsável: Marcello Faria Regueira Alves

Apresentar relatório final ao término da pesquisa: 30/06/2006

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de **11/11/2005** e no uso das competências definidas na Resolução CNS/MS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

Taubaté, 11 de novembro de 2005


Prof. Dra. Maria Júlia Ferreira Xavier Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté

CEP/UNITAU
11/11/05

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor.

Marcello Faria Regueira Alves

Taubaté, 26 de Maio de 2006.