

ROGÉRIO DE LIMA ROMEIRO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA PREVALÊNCIA DE *AGGREGATIBACTER*  
*ACTINOMYCETEMCOMITANS*, *CAMPYLOBACTER RECTUS* E  
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS* EM PACIENTES COM DOENÇA  
PERIIMPLANTAR OU PERIODONTAL**

CAMPINAS  
2009

ROGÉRIO DE LIMA ROMEIRO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA PREVALÊNCIA DE *AGGREGATIBACTER*  
*ACTINOMYCETEMCOMITANS*, *CAMPYLOBACTER RECTUS* E  
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS* EM PACIENTES COM DOENÇA  
PERIIMPLANTAR OU PERIODONTAL**

Tese apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Implantodontia

Orientadora: Profa Dra. Vera Cavalcanti Araújo.

CAMPINAS  
2009

**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"**

R763a Romeiro, Rogério de Lima.  
"Análise comparativa da prevalência de *aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *campylobacter rectus* e *porphyromonas gingivalis* em pacientes com doença periimplantar ou periodontal" / Rogério de Lima Romeiro. - Campinas: [s.n.], 2009.  
90f.: il.

Orientador: Vera Cavalcanti de Araújo.  
Tese (Doutorado em Implantodontia) - C.P.O. São Leopoldo Mandic - Centro de Pós-Graduação.

1. *Campylobacter rectus*. 2. *Porphyromonas gingivalis*.  
3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Implante dentário.  
I. Araújo, Vera Cavalcanti de. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS  
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

**Folha de Aprovação**

**PARA:** Rogério de Lima Romeiro

**TESE:** “ANÁLISE COMPARATIVA DA PREVALÊNCIA DE AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS, CAMPYLOBACTER RECTUS E PORPHYROMONAS GINGIVALIS EM PACIENTES COM DOENÇA PERIIMPLANTAR OU PERIODONTAL”

O aluno acima indicado apresentou aquela TESE junto ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Doutor em **Implantodontia**, em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, e após apreciação pela Comissão Examinadora abaixo nominada, foi considerada

Profa. Dra Vera Cavalcanti Araújo – Presidente

Prof. Dr Ney Soares Araújo - 1º Membro

Profa. Dra. Elizabeth Ferreira Martinez - 2º Membro

Prof. Dr José Luiz De Lorenzo - 3º Membro

Profa. Dra Sheila Cavalca Cortelli - 4º Membro

*À Deus por ter me dado o dom da vida.*

*Aos meus pais pelo apoio incondicional,  
pelo amor, incentivo e confiança que me  
fizeram seguir firme nesta difícil jornada.*

*À minha esposa Cláudia Mirtes Fonseca  
Romeiro pela paciência, amizade, amor,  
palavras de carinho e motivação e pelo  
apoio irrestrito que inegavelmente fizeram  
parte desta conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao C. P. O. São Leopoldo Mandic pela oportunidade.

À coordenadora e orientadora Profa. Dra. Vera Cavalcanti Araújo pela amizade, carinho e compreensão.

À UNITAU (Universidade de Taubaté) por me abrir as portas para a realização do trabalho.

À estimada professora Dra. Sheila Cavalca Cortelli, pelo conhecimento e dedicação me passados durante a coorientação desta obra.

Ao meu primo, Prof. Davi Romeiro Aquino pela parceria durante toda a vida e pelo apoio durante a execução deste trabalho.

## RESUMO

A periimplantite é uma doença infecciosa semelhante à periodontite crônica que afeta os tecidos periimplantares. Os microrganismos prevalentes na periodontite crônica se assemelham aos presentes na periimplantite. O objetivo do presente estudo foi comparar, por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* e *P. gingivalis* em pacientes com periimplantite, periodontite, periimplante saudável e periodonto saudável. Foram coletadas, com o auxílio de cones de papel esterilizados, por um examinador calibrado, amostras do sulco gengival de 22 indivíduos com periimplantite, 22 com periodontite crônica, 22 com saúde periodontal e 22 com periimplante saudável. Além disso, parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, índice gengival e índice periodontal, foram realizados para caracterização clínica das amostras. Através da PCR foi detectada uma prevalência de 86,36%, 90,9%, 59,09% e 86,36% de *C. rectus* na periimplantite, periodontite, periimplante saudável e periodonto saudável, respectivamente. *P. gingivalis* foi detectado em 86,36% dos casos de periimplantite, 59,09% na periodontite, 9,09% no periimplante saudável e 22,72% nos pacientes com periodonto saudável. *A. actinomycetemcomitans* apresentou baixa prevalência nos quatro grupos mostrando-se presente em 22,72% dos casos de periimplantite, 9,09% nos de periodontite, 13,63% no periimplante saudável e 4,54% no periodonto saudável. Após análise dos resultados podemos concluir que os microrganismos *C. rectus* e *P. gingivalis* parecem apresentar uma relação direta com a presença de periimplantite. Já *A. actinomycetemcomitans* apresenta pouca prevalência em indivíduos com periimplantite, periodontite crônica e em periodonto e periimplante saudáveis.

Palavras-chave: Implantes dentários. *Campylobacter rectus*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Porphyromonas gingivalis*. Reação em cadeia da polimerase.

## ABSTRACT

Peri-implantitis is an infectious disease similar to chronic periodontitis that affects the peri-implant tissues belonging to osteo-integrated implants. The average prevalent microorganisms in chronic periodontitis resemble those usually present at peri-implantitis. The aim of the current study was to compare, through the polymerase chain reaction (PCR) technique, the prevalence of *C. rectus*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in patients with peri-implantitis, periodontitis, healthy peri-implant and healthy periodontium. With the help of sterilized paper cones, through a calibrated examiner, specimens were collected of the gingival sulcus of 22 individuals with peri-implantitis, 22 with chronic periodontitis, 22 periodontically healthy and 22 with healthy peri-implants. Moreover, clinical parameters of probing depth, gingival index and periodontal index were done in order to clinically characterize the samples. Through PCR, 86,36%, 90,9%, 59,09% and 86,36% prevalences of *C. rectus* were detected in peri-implantitis, periodontitis, healthy peri-implant and healthy periodontium, respectively. *P. gingivalis* was detected in 86,36% of peri-implantitis cases, 59,09% in periodontitis, 9,09% in healthy peri-implant, and 22,72% in patients with healthy periodontium. *A. actinomycetemcomitans* showed low prevalence in the four groups, being present in 22,72% of peri-implantitis cases, 9,09% of periodontitis ones, 13,63% in healthy peri-implant and 4,54% of healthy periodontium. Upon analysis of the results, we can conclude that *C. rectus* presents wide prevalence among patients healthy or sick, within all groups. *P. gingivalis* seems to be an important microorganism related to peri-implantitis pathogeny.

Keywords: Dental implants. *Campylobacter rectus*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Porphyromonas gingivalis*. Polymerase chain reaction.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Distribuição da população estudada. MI - Média de idade; DP - Desvio padrão.....	54
Quadro 2 - Distribuição média dos parâmetros clínicos profundidade de sondagem (PS), índice de placa (IP) e índice gengival (ISG) em função dos grupos incluídos no presente estudo. DP - Desvio padrão.....	54
Figura 1 - Distribuição percentual da prevalência bacteriana isoladamente em cada grupo (intra-grupo) do presente estudo.....	56
Quadro 3 - Distribuição da presença, ausência e freqüência dos patógenos periodontais estudados para os indivíduos portadores de periimplantite e periodontite.....	57
Quadro 4 - Distribuição da presença, ausência e freqüência dos patógenos periodontais estudados para os indivíduos portadores de periodonto e periimplante saudáveis. ....	57
Figura 2 - Distribuição percentual da prevalência bacteriana entre os grupos (inter-grupo) do presente estudo. ....	58
Figura 3 - Gel de agarose com primer específico para <i>C. rectus</i> . ....	59
Figura 4 - Gel de agarose com primer específico para <i>A. actinomycetemcomitans</i> . ....	60
Figura 5 - Gel de agarose com <i>primer</i> específico para <i>P. gingivalis</i> . ....	61

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 PROPOSIÇÃO .....	12
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	13
3.1 Doença periodontal.....	13
3.2 Colonização microbiana da cavidade oral sem implantes .....	15
3.3 Participação de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> na doença periodontal.....	17
3.4 Participação de <i>Porphyromonas gingivalis</i> na doença periodontal.....	23
3.5 Participação de <i>Campylobacter rectus</i> na doença periodontal .....	25
3.6 Prevalência de <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> e <i>C. rectus</i> na doença periodontal .....	27
3.7 Classificação das doenças periimplantares .....	33
3.7.1 <i>Mucosite Periimplantar</i> .....	33
3.7.2 <i>Periimplantite</i> .....	34
3.8 Microbiota ao redor de implantes dentários .....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
4.1 Delineamento experimental.....	45
4.2 Considerações éticas .....	45
4.3 População do estudo .....	46
4.4 Cálculo amostral .....	47
4.5 Exame clínico periodontal .....	47
4.6 Acompanhamento pós-estudo dos voluntários .....	47
4.7 Análise clínica .....	48
4.8 Análise microbiológica .....	51
4.8.1 <i>Obtenção das amostras microbiológicas</i> .....	51
4.8.2 <i>Análise microbiológica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	52
4.9 Análise estatística .....	53
5 RESULTADOS.....	54
6 DISCUSSÃO .....	62
7 CONCLUSÃO .....	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE A - Carta De Informação .....	86

<b>APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE C - Ficha De Anamnese .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE D- Ficha de Avaliação Periodontal .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Implantes osseointegrados são comumente usados para a fixação de restaurações protéticas. Branemark et al. (1985) foram os primeiros a descreverem a ancoragem de próteses em implantes dentários. Ao longo dos anos, diferentes sistemas de implantes têm sido introduzidos no mercado e suas indicações e aplicações gradualmente expandidas. Apesar do elevado índice de sucesso deste tratamento, falhas ainda ocorrem (Fiorellini et al., 1998). A média de falha do sistema Branemark é de 7,7% após um período de cinco anos em função. Falhas também têm sido relatadas em outros sistemas de implantes (Fiorellini et al., 1998).

Para encontrar uma terminologia de consenso, a falha dos implantes tem sido definida como a ausência de tecido capaz de dar suporte ou manter a osseointegração; e periimplantite como o processo inflamatório que afeta os tecidos ao redor dos implantes osseointegrados em função, resultando na perda de suporte ósseo e formação de uma bolsa periimplantar podendo levar a perda do implante (Mombelli, Lang, 1998; De Boever, De Boever, 2006; Pongnarisorn et al., 2007, Rêgo et al., 2007).

Estudos microbiológicos realizados em pacientes com periimplante saudável em humanos (Lee et al., 1999) e em animais (Shibli et al., 2003) tem demonstrado uma vasta microbiota composta principalmente por cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos. Em contraste, em sulcos periimplantares com presença de doença, nós encontramos uma microbiota semelhantes a da periodontite crônica com *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella nigrescens*, *Tanerella Forshythia* e *Aggregatibacter*

*actinomycescomitans* (Mombelli et al., 1988; Danser et al., 1995; Sordyl et al., 1995; Leitão et al., 2005; De Boever, De Boever, 2006; Devides, Franco, 2006).

Assim, existe uma grande relação entre a prevalência da microbiota que coloniza implantes com a que coloniza dentes naturais. Sabendo que o *A. actinomycescomitans* é um microrganismos prevalente na periodontite agressiva (Zambon et al., 1996; Fine et al., 2007), *P. gingivalis* apresenta grande prevalência na periodontite crônica (Kawada et al., 2004) e *C. rectus*, apesar de não ser considerado um periodontopatógeno verdadeiro, coloniza sítios de periodontite crônica (Macuch, Tanner, 2000), o objetivo do presente estudo foi comparar a prevalência de *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis* e *C. rectus* entre pacientes com periodontite, saúde periodontal, saúde periimplantar e periimplantite, empregando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

## 2 PROPOSIÇÃO

Baseado na literatura, a hipótese do estudo é que exista uma maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* e *P. gingivalis* na periodontite em relação à periimplantite e que essa prevalência é diferente da de sítios periodontais e periimplantares saudáveis que não devem apresentar diferenças entre si.

O objetivo do presente estudo é comparar a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* e *P. gingivalis* entre pacientes com doença periodontal, saúde periodontal, doença periimplantar e saúde periimplantar empregando a técnica da reação em cadeia da polimerase.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Doença periodontal

A doença periodontal é uma patologia de etiologia multifatorial, de origem infecciosa, iniciada pelo acúmulo de biofilme dental. A manifestação e progressão dessa patologia são determinadas por diversos fatores como, condições sociais, fatores sistêmicos, genéticos, composição microbiana e fatores de risco atuantes (Nunn, 2003).

A progressão da doença resulta na inflamação dos tecidos de proteção e sustentação do dente, com perda progressiva de inserção conjuntiva e de osso alveolar. A forma mais freqüentemente encontrada e de progressão mais lenta, é a periodontite crônica. Uma variante mais agressiva e menos freqüente é a periodontite agressiva (AAP, 1999).

A periodontite crônica é caracterizada pela constante presença de biofilme dental, associado à inflamação gengival e mobilidade dental aumentada (Page, Schroeder, 1976). A progressão da doença resulta em perda de inserção clínica, perda óssea alveolar e formação de bolsa periodontal em função da migração apical do epitélio (Seymour, Greenspan, 1979). Quando acomete até 30% dos sítios bucais, a periodontite crônica é classificada como localizada, e quando o acometimento é superior ao percentual citado, considera-se como generalizada. A severidade da patologia é baseada no nível clínico de inserção (NCI), onde, a patologia é considerada leve com média de 2 mm, moderada com NCI de 3 e 4 mm e avançada com valores superiores a 4 mm (AAP, 1999).

Atualmente, cerca de 600 gêneros bacterianos podem ser detectados em amostras de cavidade bucal humana. Normalmente, cerca de 30 a 40 gêneros bacterianos podem ser isolados de uma única amostra subgingival (Paster et al., 2002; Socransky, Háffajee, 2002; Kazor et al., 2003). A complexidade da microbiota é freqüentemente relacionada com saúde e doença dos tecidos periodontais (Ximenez-Fyvie et al., 2000). No entanto, o predomínio de alguns gêneros bacterianos, predispõe o indivíduo a desenvolver lesões periodontais, como periodontite crônica e agressiva (Potera, 1999).

O biofilme dental é formado pela colonização e crescimento de bactérias nas superfícies dentárias. Sua estrutura oferece inúmeras vantagens ao componente bacteriano, como proteção contra espécies competitivas, mecanismos de defesa do hospedeiro e substâncias tóxicas presentes no meio ambiente como anti-sépticos e antibióticos. Este biofilme favorece a aquisição e processamento de nutrientes, além da eliminação de produtos tóxicos produzidos pelo seu metabolismo por meio de canais de água existentes no seu interior, cuja estrutura se assemelha a um sistema circulatório primitivo (Socransky, Háffajee, 2002; Kazor et al, 2003).

As bactérias relacionadas com doença periodontal podem ser encontradas acima e/ou abaixo da margem gengival, o que permite fazer algumas distinções entre biofilme dental supra e subgingival. O biofilme dental supragengival é aderido à superfície do dente e é composto predominantemente por espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces*. Esta predominância ocorre em casos de saúde ou doença, no entanto, em quadros de doença periodontal a contagem de periodontopatógenos se encontra elevada (Ximenez-Fyvie et al., 2000; Socransky, Háffajee, 2002). A natureza do biofilme dental subgingival é mais complexa, pois além de estar associado à superfície dentária também tem relação com o tecido



gingival. Similarmente ao biofilme supragengival, observa-se a predominância de espécies de *Actinomyces* em casos de saúde, porém, ocorre significativo aumento na proporção de periodontopatógenos em casos de doença. A principal diferença entre o biofilme dental em casos de saúde e doença periodontal, é o marcante decréscimo nas proporções de espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces* na doença, sobretudo, na região subgingival (Ximenez-Fyvie et al., 2000; Socransky, Haffajee, 2002; Shibli et al., 2008).

### 3.2 Colonização microbiana da cavidade oral sem implantes

Amostras de sulcos gengivais sadios possuem cerca de  $10^3$  à  $10^6$  microrganismos com predominâncias de cocos e bastonetes gram-positivos, principalmente *Actinomyces naeslundii* (14%), *Actinomyces gerencseriae* (11%), *Streptococcus oralis* (14%), e *Peptostreptococcus micros* (5%) (Slotts, 1977; Tanner et al., 1998; Haffajee et al., 1998; Ximenez-Fyvie, 2000; Shibli et al., 2007). Bastonetes anaeróbios Gram-negativos somam aproximadamente 13% do total de microrganismos cultivados (Tanner et al., 1998).

Existe um consenso que periodontite é uma doença infecciosa associada a um pequeno número de espécies encontrado no biofilme dentário (Riviere et al., 1996). Com o desenvolvimento da periodontite, aumenta a proporção de Gram-negativos e diminui a de espécies Gram-positivas na microbiota subgingival. Na lesão periodontal estabelecida, são encontrados baixo número de cocos e alto número de bastonetes móveis e espiroquetas. São detectadas proporções aumentadas de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, e *Treponema* (Haffajee, Socransky, 1994; De Boever, De Boever, 2006).

Os microrganismos devem apresentar vários critérios para se tornarem associados com a periodontite destrutiva (Socransky, Haffajee, 1997):

- a) a espécie deve ser encontrada mais freqüentemente e em alta proporção em casos de infecção comparado a sítios não doentes;
- b) a ausência dessa espécie deve estar associada à remoção da doença;
- c) deve existir a produção de anti-corpos ou resposta imune-celular específicos;
- d) a progressão da doença periodontal deve estar associada com a presença da espécie em nível elevado.

Com base nesses critérios algumas espécies são relatadas como causa da doença periodontal destrutiva, desta forma *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* exibem uma forte associação. *A. actinomycetemcomitans* é reconhecido como periodontopatógeno associado à causa e patogenia principalmente da periodontite de início rápido (Rêgo et al., 2007), enquanto *P. gingivalis* está associado com a periodontite crônica. Em baixos níveis, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* são encontradas em periodontos saudáveis, mas eles podem também estar associados ao desenvolvimento da periodontite. Para afetar os tecidos periodontais essas espécies provavelmente devem existir no sulco gengival em níveis elevados e por extenso período de tempo. Já *Tannerella forsythia* é encontrado mais frequentemente em pacientes com periodontite. *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Treponema denticola* e *Treponema vicentii* também estão associados com destruição periodontal. Como *P. intermedia*, essas espécies são provavelmente patógenos oportunistas com baixa patogenicidade e precisam colonizar sítios subgengivais por longo período de tempo e em elevados níveis para serem capazes

de afetar o periodonto (Haffajee, Socransky, 1994; Ximenez-Fyvie et al., 2000; De Leitão et al., 2005; De Boever, De Boever, 2006; Rupani et al., 2008; Rêgo et al., 2007).

Após a extração de todos os dentes, ocorrem mudanças nos tecidos e/ou superfícies alterando a aderência dos microorganismos. Quando o paciente com periodontite severa torna-se edêntulo, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* não são encontrados sugerindo que seu habitat seja o sulco periodontal (Danser et al., 1994; Rupani et al., 2008).

### **3.3 Participação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na doença periodontal**

*A. actinomycetemcomitans* foi primeiramente descrito em 1912 pelo microbiologista alemão Klinger em uma amostra de actinomicose cervicofacial, sendo denominado *Bacterium actinomycetum comitans*. Após algumas propostas de alteração na nomenclatura, foi finalmente denominado *A. actinomycetemcomitans* em 1929 por Topley e Wilson. O emprego do termo “*actinomycetemcomitans*” está na similaridade existente com actinomicoses produzidas por *Actinomyces israelii* (Zambom, 1985).

*A. actinomycetemcomitans* é um bastonete Gram-negativo, curto, não formador de esporos, imóvel e anaeróbio facultativo (Slots, 1982). As células bacterianas medem de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro, e quando cultivados em meio de cultura sólido apresentam colônias convexas e translúcidas, apresentando em seu interior uma estrutura em forma de estrela (Zambom, 1985). Inicialmente, três sorotipos do patógeno foram descritos, (Zambon et al., 1983) *a*, *b* e *c*. Os sorotipos *a*

e *b* são mais encontrados na cavidade bucal humana, enquanto o *c* está mais freqüentemente relacionado a infecções extra-bucais. Posteriormente, outros dois sorotipos *d* e *e* foram descritos, (Saarela et al., 1992) sendo também mais relacionados a infecções extra-bucais.

*A. actinomycetemcomitans* destaca-se por ser uma das poucas espécies que possuem capacidade de infiltração nos tecidos epitelial e conjuntivo, podendo comprometer o sucesso da terapia periodontal (Tong et al., 2003; Muller, Heinecke, 2004), além de colonizar, simultaneamente, mucosa bucal e biofilme dental subgengival (Slots, 1995).

Atualmente, *A. actinomycetemcomitans* é considerado um dos principais patógenos de origem bucal a se relacionar com doenças sistêmicas como diabetes (Kuroe et al., 2004) e endocardite bacteriana (Paturel et al., 2004), além de ser detectado em diversas regiões do organismo, onde um processo infeccioso estiver instalado, como no fluido sinovial da articulação têmporo mandibular (Kim et al., 2003).

Dentre os fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans*, salienta-se a produção de leucotoxina com elevado potencial inflamatório. Pertencente ao grupo das toxinas RTX (*repeats in toxin*), a leucotoxina produzida por *A. actinomycetemcomitans* consegue inativar neutrófilos, algumas linhagens de células T, B e macrófagos humanos, podendo retardar a produção de anticorpos para a leucotoxina, assim comprometendo parcialmente a resposta do hospedeiro (Slots, 1997).

A lise celular acontece pela formação de canais condutores de íons, que causam despolarização da membrana da célula alvo, aumentando a pressão

osmótica com conseqüente passagem de líquido para o interior da célula (Lally et al., 1991; Fives-Taylor et al., 1996; Kolodrubetz, 1996).

A marcada relação de *A. actinomycetemcomitans* com os envoltimentos avançados de doença periodontal, induz a realização de estudos envolvendo seus fatores de virulência. Estudos atuais, atribuem ao *A. actinomycetemcomitans* a capacidade de induzir modificações patogênicas no biofilme dental através da produção de fímbrias, que favorecem o biofilme frente à resposta imunológica do hospedeiro (Inoue et al., 2003), e proteínas, em sua membrana, caracterizando uma versatilização nos fatores de virulência (Asakawa et al., 2003).

Zambon et al. (1996) realizaram uma avaliação microbiológica de indivíduos com periodontites de início precoce, buscando uma associação de elevada leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* com periodontite agressiva localizada. Para tanto, hibridização *dot blot* e PCR foram empregados em 165 isolados recentes de *A. actinomycetemcomitans*. Cepas de máxima leucotoxicidade foram encontradas em 22% dos indivíduos. Indivíduos portadores de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade eram mais jovens (média de idade 12,7 anos) do que os que apresentavam *A. actinomycetemcomitans* de mínima leucotoxicidade (média de idade 25,5 anos). Indivíduos diagnosticados com periodontite juvenil localizada apresentaram maior prevalência de cepas de máxima leucotoxicidade (57%) em comparação a indivíduos saudáveis ou com periodontite do adulto. PCR mostrou-se eficaz para identificar e distinguir cepas de máxima e mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*. Diante dos dados obtidos, os autores destacaram a importância de se identificar e diferenciar cepas de *A. actinomycetemcomitans* na patogênese de certos tipos de periodontites de início precoce e outras formas de doença periodontal de progressão rápida.

Haraszthy et al. (2000) avaliaram a importância da leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* na patogênese da doença periodontal. Aplicaram a PCR para diferenciar cepas de máxima e mínima leucotoxicidade, a partir de 1023 isolados recentes por cultura bacteriana de 146 indivíduos, incluindo, 71 com periodontite agressiva localizada, quatro com periodontite de início precoce, 11 com periodontite pós-juvenil na forma localizada, 41 com periodontite crônica e 19 indivíduos periodontalmente saudáveis. Cepas de máxima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* foram encontradas em 55% dos indivíduos com periodontite juvenil localizada e 50% em indivíduos com periodontite de início precoce. As referidas cepas acometeram mais frequentemente indivíduos jovens (média de idade de 13,95 anos), ao passo que cepas produtoras de mínima leucotoxicidade estiveram relacionadas a indivíduos de 6 a 65 anos de idade (média de idade de 35,47 anos). Diante dos resultados, os autores concluíram que *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade foram mais frequentemente isolados de indivíduos com periodontite juvenil localizada e periodontite de início precoce, sobretudo em indivíduos jovens.

Cortelli et al. (2000) avaliaram a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em 87 indivíduos com doença periodontal avançada na região do Vale do Paraíba - SP. Amostras de biofilme dental subgengival foram coletadas com cone de papel estéril e processadas por cultura bacteriana. Foi observada prevalência de 19,3% de *A. actinomycetemcomitans* na população estudada, sendo 12,4% para indivíduos com doença periodontal avançada e 6,8% para indivíduos com periodontite moderada. Em função dos dados encontrados, os autores destacaram a maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos que apresentavam periodontite avançada.

Em 2001, Tan avaliou a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* de máxima e mínima leucotoxicidade através da PCR em 45 indivíduos com doença periodontal moderada e cinquenta periodontalmente saudáveis. *A. actinomycetemcomitans* foi isolado de 29 indivíduos (69%) com doença periodontal e quatro saudáveis (7,8%). Todas as amostras positivas foram de *A. actinomycetemcomitans* de mínima leucotoxicidade, o que levou os autores a supor a presença de *A. actinomycetemcomitans* na microbiota normal de adultos chineses.

Em 2003, Cortelli et al. propuseram a detecção de cepas de *A. actinomycetemcomitans*, de máxima e mínima leucotoxicidade e sua relação com o tipo de doença periodontal em 136 indivíduos diagnosticados com gengivite, periodontite crônica e periodontite agressiva. Para tanto, foram obtidos índices dicotômicos de biofilme dental e sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção em todos os dentes presentes. Foram então selecionados os cinco dentes com os maiores valores de profundidade de sondagem, onde foram obtidas amostras de biofilme dental subgengival. Foram também obtidas amostras extra-sulculares da mucosa jugal e dorso da língua. *A. actinomycetemcomitans* foi cultivado em placas contendo Agar TSBV e, posteriormente à incubação, foram identificados pela morfologia de colônia característica, coloração de Gram e provas bioquímicas. Nas amostras de biofilme dental subgengival, a expressão de leucotoxina foi avaliada por meio da PCR. *A. actinomycetemcomitans* foi isolado de 29,4% dos indivíduos, onde se observou estatisticamente relação entre o diagnóstico periodontal e o resultado da cultura bacteriana, presença de cepas de máxima leucotoxicidade e indivíduos com idade inferior a 28 anos e diagnosticados com periodontite agressiva.

Poulsen et al. (2003) avaliaram a detecção da cepa JP2 de *A. actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme dental subgengival através da PCR. Os autores relacionam esta cepa, conhecida por sua máxima leucotoxicidade, a envolvimento de periodontite agressiva nas formas localizada e generalizada, bem como sua maior prevalência em indivíduos jovens. Destacaram ainda, a importância da detecção diferencial dessa cepa no estabelecimento do diagnóstico precoce e tratamento das doenças periodontais agressivas.

A detecção da mesma cepa de *A. actinomycetemcomitans* foi mostrada por Haubek & Westergaard (2004) em uma família de imigrantes marroquinos com múltiplos casos de periodontite agressiva localizada. A avaliação da família mostrou cinco jovens com periodontite agressiva localizada. Raspagem dental e aplainamento radicular foram aplicados e após um ano, a condição microbiológica foi avaliada. Em apenas um jovem não foi detectada a cepa JP2 por PCR, podendo esta ausência de detecção ser relacionada à combinação terapia cirúrgica e antibioticoterapia empregada exclusivamente nesse indivíduo. Os autores destacaram a importância de exames rotineiros em famílias com indícios de periodontite agressiva para o estabelecimento de diagnóstico precoce.

Cortelli et al. (2005) analisaram a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite crônica. Foram selecionados 66 pacientes. Amostras de biofilme subgengival foram removidas de oito sítios diferentes de cada paciente. Além disso, amostras da língua e mucosa foram coletadas com auxílio de um swab estéril e amostras de saliva também foram obtidas. A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi detectada através de cultura e a PCR foi realizada para detecção de *A. actinomycetemcomitans* de máxima e mínima leucotoxicidade. Os resultados demonstraram a presença de *A.*



*actinomycetemcomitans* em 63,63% das amostras de sulco gengival, 56,06% das amostras de saliva e 45,45% das amostras de mucosa. Não houve diferença significativa entre as amostras de saliva e do sulco gengival. Os resultados sugerem que em periodontite crônica, a saliva é representativa para a detecção de *A. actinomycetemcomitans*.

Analisando a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* na periodontite agressiva, Fine et al. (2007) analisaram 1075 adolescentes de 11 a 17 anos. Os indivíduos que apresentavam sítios de periodontite agressiva localizada apresentaram maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans* que pacientes saudáveis. Esses achados sugerem que a detecção de *A. actinomycetemcomitans* em crianças pode servir como um fator de risco para o aparecimento de periodontite agressiva.

Tentando encontrar uma relação entre a transmissão de *A. actinomycetemcomitans* em membros de uma mesma família, Dogan et al. (2008) selecionaram 66 pacientes com periodontite agressiva (AgP). Foram colhidas amostras de todos os indivíduos e realizada cultura para detecção de *A. actinomycetemcomitans*. Os autores concluíram que indivíduos com AgP com presença de *A. actinomycetemcomitans* tem grande chance de transmitir esse microrganismo aos seus parentes.

### **3.4 Participação de *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal**

*P. gingivalis* e *P. intermedia* foram pela primeira vez descritos no manual Bergey's em 1923, sendo relatados como família Bacteroidaceae. Posteriormente, essa família foi subdividida em três gêneros, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e

*Leptotrichia*. Como produtoras de ácidos e com características de anaerobiose, *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram classificadas como *Bacteroides*. Em 1989 Shah & Collins propuseram a redefinição de dois novos gêneros, *Porphyromonas* e *Prevotella*.

*P. gingivalis* é um membro do grupo *Bacteroides* de pigmento negro. Os microrganismos deste grupo formam colônias com coloração de marrom a preta em meio de cultura sólido e foram inicialmente classificados em uma única espécie, *Bacteroides melaninogenicus*. Posteriormente foi reconhecido que, *Bacteroides* de pigmento negro compreendiam espécies assacarolíticas (*P. gingivalis*), espécies com nível intermediário de fermentação de carboidratos (*P. intermedia*) e outras altamente sacarolíticas (*Prevotella melaninogenica*) (Socransky, Haffajee, 2002).

*P. gingivalis* é um bastonete curto, Gram-negativo, anaeróbio, não esporulado, não-fermentador de carboidratos, freqüentemente isolado de amostras de biofilme dental subgingival de indivíduos com diversas formas de doença periodontal, incluindo periodontite crônica (Samaranayake, 1996). Seu papel na patogênese da doença periodontal baseia-se, em parte, no fato de ser isolado em reduzidas proporções no sulco gengival de indivíduos periodontalmente saudáveis, sendo encontrado numa prevalência elevada em quadros de inflamação dos tecidos periodontais (Zambom, 1996).

Um importante fator de virulência de *P. gingivalis* é o polissacarídeo capsular, que, em geral, confere diversas vantagens às bactérias, principalmente a capacidade de inibir fagocitose pelas células imunes do hospedeiro. Acredita-se, baseado em estudos de ultra-estrutura de *P. gingivalis* (Okuda, Takazoe, 1974; Yoshimura et al., 1985, Lee et al., 1992; Njoroge et al., 1997), que cepas não-virulentas tendem a apresentar quantidade muito menor de material capsular

extracelular do que as cepas virulentas. Além disso, a cápsula polissacarídica de *P. gingivalis* favorece também na aderência celular (Zambom,1996).

Kawada et al. (2004) analisaram a prevalência de *P. gingivalis* na doença periodontal através da técnica de PCR - *real time*. Foi constatado que a cada milímetro de aumento da profundidade da bolsa periodontal, a concentração de *P. gingivalis* aumentava 10 vezes. Foi constatada ainda uma significativa diferença entre a proporção de *P. gingivalis* antes e após o tratamento. Esses resultados sugeriram que o número absoluto e relativo de *P. gingivalis* na bolsa periodontal está associado ao estágio em que se encontra a periodontite, e que a análise quantitativa é importante na escolha da correta terapia periodontal.

Existe ainda uma relação entre a diabetes tipo II e a prevalência de *P. gingivalis* na bolsa periodontal. Makiura et al. (2008) estudaram 30 pacientes com diabetes tipo II que receberam raspagem subgengival e análise microbiológica através da PCR. Além disso, foram analisados a profundidade da bolsa, sangramento a sondagem e parâmetros metabólicos como hemoglobina glicosada, glicemia, colesterol total e triglicérides. Os resultados mostraram que houve uma grande melhora nos parâmetros clínicos após o tratamento juntamente com uma redução na concentração de *P. gingivalis*, diminuição esta detectada mais frequentemente em indivíduos com aumento da hemoglobina glicosada.

### **3.5 Participação de *campylobacter rectus* na doença periodontal**

O gênero *Campylobacter* apresenta 13 espécies diferentes, das quais sete são encontradas no sulco gengival. São microrganismos relacionados com doenças em humanos e animais (Moore, Moore, 1994). Os níveis de *C. rectus* e *C.*

*gracilis* são elevados nos sulcos gengivais de pacientes com doença periodontal moderada e severa, quando comparados a sítios saudáveis (Tanner et al., 1987). Além disso, *C. rectus* é um microrganismo relacionado à periodontite inicial (Tanner et al., 1998).

*C. rectus* raramente é detectado em amostras de sulco gengival sadio (Kama et al., 1994). Ele tem sido citado como um periodontopatógeno, entretanto outras espécies de *Campylobacter* não estão associadas à periodontite.

Gmur & Guggenheim (1994) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* no biofilme interdental supragengival de pacientes sem periodontite. Foram selecionados 25 indivíduos com média de idade de 23,5 anos e coletadas amostras do biofilme supragengival, entre os dentes primeiro e segundo molares em todos os quadrantes e realizadas culturas para detecção dos microrganismos. *P. nigrescens* esteve presente em 100% dos casos, sete amostras apresentavam *A. actinomycetemcomitans*. *T. forsythia* e *C. rectus* foram encontrados em 48% e 43% das amostras, respectivamente. Com os resultados, os autores levantaram a hipótese de que esses microrganismos são oportunistas e tem como habitat natural o biofilme supragengival.

Em um estudo em 2000, Macuch & Tanner avaliaram a presença de *C. rectus* em pacientes com saúde periodontal e periodontite. Os resultados demonstraram que *C. rectus* estava mais prevalente em pacientes com periodontite, quando comparados com pacientes que apresentavam periodonto saudável. Esses resultados confirmaram a relação entre a presença de *C. rectus* e doença periodontal.

Yokoyama et al. (2008) realizaram um estudo demonstrando a relação entre os níveis de *C. rectus* e a situação periodontal de pacientes grávidas. Foram coletadas amostras de saliva não estimulada de 22 mulheres grávidas e 15 não grávidas. Profundidade da bolsa e sangramento a sondagem foram obtidos. Foi realizada a técnica de PCR *real-time* para quantificar a concentração do microrganismo nas amostras de saliva, além disso, a concentração de estradiol foi medida na saliva. A média de idades, o número de dentes e o número de bactérias na saliva de ambos os indivíduos foram semelhantes. A quantidade de pacientes com bolsa maior que 4 mm e com presença de estradiol na saliva foram significativamente maiores nas pacientes grávidas. O número de sítios que apresentavam sangramento a sondagem e a concentração de *C. rectus* foram maiores nas pacientes grávidas, mas não apresentaram diferenças estatísticas. Houve uma relação direta entre os níveis de estradiol e a presença de *C. rectus*, e entre os níveis de *C. rectus* e a quantidade de sítios com bolsa maior que 4 mm em mulheres grávidas.

### **3.6 Prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *C. rectus* na doença periodontal**

Söder et al. (1993) propuseram a utilização de sonda de DNA específica para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter rectus* em 20 indivíduos diagnosticados com periodontite avançada. Foram obtidas de nove a dez amostras de biofilme dental subgengival de cada indivíduo, totalizando 198 sítios avaliados. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em pelo menos um sítio em 75% dos indivíduos, *P. gingivalis* em 95%, *P. intermedia*

e *C. rectus* em 90% e *T. denticola*, *E. corrodens* e *F. nucleatum* foram detectados em todos os indivíduos. Quando foram avaliadas as 198 amostras, observou-se prevalência de 25% para *A. actinomycetemcomitans*, 51,5% para *P. gingivalis*, 64,1% para *P. intermedia*, 60,6% para *T. denticola*, 72,9% para *E. corrodens*, 74,7% para *F. nucleatum* e 65,7% para *C. rectus*. Após análise dos resultados, os autores destacaram a infecção multibacteriana que ocorre em casos de periodontites com alto grau de destruição tecidual.

Em 1995, Slots et al. avaliaram a detecção de periodontopatógenos de amostras subgengivais por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em indivíduos com doença periodontal avançada. Após o processamento das amostras, 36,8% dos indivíduos apresentaram *A. actinomycetemcomitans*, 54,3% *T. forsythia*, 54,3% *C. rectus*, 63,9% *E. corrodens*, 84,5% *P. gingivalis* e 73,6% *P. intermedia*. Em função do exposto, os autores demonstraram a capacidade de detecção de patógenos periodontais pela PCR e destacaram a elevada prevalência de *P. gingivalis* e *P. intermedia* em indivíduos com doença periodontal avançada.

Em 1996, Steenbergen et al. conduziram um estudo comparativo sobre a eficácia na detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* entre cultura bacteriana e sonda de DNA. Amostras de biofilme dental subgengival foram coletadas de vinte indivíduos com doença periodontal moderada ou avançada. Quatro coletas foram realizadas por indivíduo e simultaneamente avaliadas em cultura bacteriana com meio seletivo para cada microrganismo de interesse e sonda de DNA. A sonda de DNA foi mais sensível na detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. *P. intermedia* foi detectada mais freqüentemente com cultura bacteriana. Diante dos resultados analisados, os autores destacaram a discrepância existente na detecção de patógenos periodontais

por cultura bacteriana e sonda de DNA, bem como a possibilidade de ocorrência de falso positivo e falso negativo na detecção microbiológica por sonda de DNA.

Ashimoto et al. (1996) avaliaram a presença de oito patógenos periodontais em amostras subgingivais de indivíduos com gengivite e periodontite através da PCR. Após extração de DNA das amostras bacterianas e sua respectiva amplificação através de *primers* específicos para cada espécie bacteriana pesquisada, foi obtida prevalência para os casos de periodontite e gengivite de 30% e 14% para *A. actinomycetemcomitans*, 86% e 18% para *T. forsythia*, 74% e 52% para *C. rectus*, 80% e 70% para *E. corrodens*, 70% e 10% para *P. gingivalis*, 58% e 12% para *P. intermedia*, 52% e 20% para *P. nigrescens* e 54% e 16% para *T. denticola* respectivamente. Em função dos resultados, os autores encontraram forte associação dos patógenos pesquisados com doença periodontal e considerou a detecção de patógenos periodontais através de PCR baseada na amplificação da região 16S do RNA ribossômico uma técnica eficaz e importante no diagnóstico microbiano periodontal.

Garcia et al. (1998) testaram a efetividade de detecção rápida de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* através da utilização da técnica multiplex PCR. Após extração de DNA de amostras subgingivais obtidas de indivíduos com doença periodontal não tratada, foi realizada amplificação a partir de *primer* característico de patógenos periodontais. Os resultados mostraram efetividade da técnica na detecção dos microrganismos citados, podendo essa ser utilizada para detecção rotineira na clínica.

Em 2000, Lopez avaliou a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* em indivíduos portadores de doença periodontal avançada. Para tanto, amostras subgingivais foram coletadas de 56 indivíduos, em quatro

sítios previamente selecionados, dois apresentando doença periodontal ativa e dois com doença periodontal inativa. Após hibridização com sondas genômicas de DNA, observou-se prevalência de 75% de *P. gingivalis* nos sítios com atividade de doença periodontal e 59,7% nos sítios inativos; 6,25% de *A. actinomycetemcomitans* em sítios ativos e 12,5% em inativos e, 49,1% de *P. intermedia* para sítios ativos e 30,3% para sítios inativos. Em função dos resultados encontrados, o autor destacou existir relação entre *P. intermedia* e *P. gingivalis* em casos ativos ou inativos de periodontite avançadas, relação não observada para *A. actinomycetemcomitans*.

Em 2001, Hamlet et al. através da aplicação de reação ELISA, determinaram a distribuição de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* em uma população de 504 indivíduos australianos. Após análise de 6030 amostras de biofilme dental, *A. actinomycetemcomitans* apresentou a maior prevalência, (22,8% dos indivíduos) seguido por *P. gingivalis* e *P. intermedia* (14,4% e 9,5% dos indivíduos respectivamente). A maioria dos indivíduos (83%) apresentou infecção por um único patógeno. A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi predominantemente observada em indivíduos com menor faixa etária, contrário à prevalência de *P. gingivalis* e *P. intermedia* predominantes em faixas etárias mais avançadas. Após análise dos resultados, os autores destacaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* como membros da microbiota subgengival de indivíduos australianos.

Em 2002, Ávila-Campos & Veásquez-Meléndez determinaram a prevalência de periodontopatógenos em indivíduos com doença periodontal e saudáveis da cidade de São Paulo, SP, Brasil. Coletas microbiológicas subgengivais foram realizadas em 100 indivíduos (50 com doença periodontal e 50 saudáveis) e, após extração de DNA, tiveram seus produtos amplificados pela PCR através de



*primers* específicos para *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *T. denticola*. A detecção bacteriana em indivíduos saudáveis e com doença periodontal foi de 70% e 90% para *A. actinomycetemcomitans*, 30% e 82% para *T. forsythia*, 66% e 78% para *P. gingivalis*, 48% e 80% para *C. rectus*, 50% e 80% para *E. corrodens*, 64% e 84% para *P. intermedia*, 92% e 96% para *F. nucleatum* e 32% e 60% para *T. denticola*. Diante dos resultados, os autores apontaram uma diferença significativa na prevalência dos patógenos citados em casos de saúde e doença periodontal, mesmo diante de relativas prevalências em indivíduos periodontalmente saudáveis.

Takeuchi (2003) estudou a prevalência de periodontopatógenos em 50 indivíduos com periodontite agressiva (10 localizada e 40 generalizada), 35 com periodontite crônica generalizada e 18 saudáveis na população japonesa. *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* foram avaliadas por PCR, sendo *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* ainda quantificados por cultura bacteriana. O autor concluiu que *P. gingivalis* foi o periodontopatógeno predominante em casos de periodontite agressiva e *T. forsythia*, *C. rectus* e *T. denticola* foram comumente encontrados em indivíduos com periodontite crônica. O autor destacou ainda, elevada a presença de *A. actinomycetemcomitans* (20% nos casos de periodontite agressiva localizada e 17,5% nos casos generalizados) na população estudada.

Também fazendo uso da PCR para detectar e cultura bacteriana para quantificar, Dogan et al. (2003) determinaram a prevalência de periodontopatógenos em uma amostra representativa da população da Turquia. Foram obtidas amostras de biofilme dental subgingival de indivíduos com periodontite agressiva localizada e

generalizada, periodontite crônica e indivíduos periodontalmente saudáveis. *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *Campylobacter rectus*, *P. gingivalis*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* foram freqüentemente detectados em indivíduos com qualquer patologia periodontal. *A. actinomycetemcomitans* mostrou-se o patógeno mais prevalente em casos de periodontite agressiva.

Utilizando PCR em tempo real, Nonnenmacher (2005) realizou um estudo quantificando microrganismos de pacientes com doença periodontal. Foram coletadas 83 amostras de sulcos gengivais de pacientes com periodontite e 43 amostras de pacientes periodontalmente saudáveis. Os resultados mostraram que pacientes com saúde apresentaram-se positivos para a maioria dos patógenos periodontais, entretanto a quantidade desses microrganismos foi muito menor que em pacientes com periodontite.

Calabrese et al. (2007) detectaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *Treponema denticola* no cálculo periodontal. Foram selecionados indivíduos com grande quantidade de cálculo dental, na região anterior, apresentando doença periodontal moderada. Amostras foram preparadas para visualização em microscopia eletrônica de transmissão. *T. denticula* foi a espécie mais prevalente. *A. actinomycetemcomitans* foi raramente encontrado. Os autores concluíram que o cálculo dental parece ser capaz de manter patógenos periodontais ativos e conseqüentemente ser um fator de risco para a instalação de doença periodontal.

Kulekci et al. (2008) analisaram a presença de periodontopatógenos em crianças com dentição mista e saúde periodontal. Foram colhidas salivas de 41 crianças com idade entre seis e treze anos. A identificação das bactérias foi realizada através da PCR. *P. nigrescens* foi a espécie mais frequentemente

encontrada (80%), seguida de *T. denticola* (32%), *A. actinomycetemcomitans* (24%) e *P. gingivalis* (12%). *P. intermédia* e *T. forshythia* não foram detectados.

### **3.7 Classificação das doenças periimplantares**

#### *3.7.1 Mucosite periimplantar*

São reações inflamatórias reversíveis nos tecidos moles ao redor dos implantes (Albrektsson et al., 1994; De Boever, De Boever, 2006).

A classificação da mucosite periimplantar está baseada nas manifestações clínicas que são (Esposito et al., 1998; Mombelli, Lang, 1998):

- a) mucosite periimplantar: é uma lesão inflamatória reversível confinada aos tecidos moles superficiais;
- b) mucosite hiperplásica: é uma inflamação exuberante, frequentemente encontrada em conjunção com componentes protéticos soltos. Comum em overdenture, possivelmente como resultado de uma mudança na microflora, mas também pode ser observado durante o tratamento com dilantina sódica, um agente anticonvulsivante;
- c) abscesso mucosal: é uma coleção circunscrita de pus na mucosa periimplantar, freqüentemente encontrado quando partículas densas de alimento penetram e são retidas em sulcos periimplantares profundos;
- d) fistulação: é freqüentemente encontrada em conjunção com componentes protéticos soltos. É, também, o resultado final de abscesso mucosal não-tratado.

### *2.7.2 Periimplantite*

A periimplantite é definida como um processo inflamatório que afeta os tecidos ao redor de um implante osseointegrado, resultando em perda do osso de suporte (Albrektsson et al., 1994). Periimplantite tem sido considerada como uma infecção sítio-específica que tem muitos padrões em comum com a periodontite crônica (Mombelli et al., 1987; Pongnarisorn et al., 2007; Rêgo et al., 2007).

A periimplantite é diagnosticada quando ocorre progressiva perda de osso periimplantar que excede os limites de tolerância de reabsorção de osso depois do sucesso da osseointegração do implante, ou seja, a média de perda óssea vertical ao redor do implante não deve ser maior que 0,2 mm anualmente (Smith, Zarb, 1989).

Existem dois tipos de falhas na osseointegração: a falha precoce, onde a falha ocorre antes mesmo da colocação da prótese, causada por erro na cirurgia, super aquecimento, ausência de estrutura óssea suficiente, carga prematura ou infecção (Adell et al., 1981; Tonetti, 1994); e a falha tardia, onde a estabilidade da osseointegração não é mantida, implicando um processo que causa perda da osseointegração, ou seja, ocorrem após a colocação da prótese sobre o implante.

Existem evidências de que patógenos periodontais, principalmente aqueles do grupo dos anaeróbios Gram-negativos, possuem um importante papel no desenvolvimento da periimplantite.

Segundo Mombelli & Lang (1998) os parâmetros para o diagnóstico da periimplantite são:

- a) profundidade de sondagem acima de 5 mm;
- b) sangramento a sondagem;

- c) supuração;
- d) perda óssea superior a 0,2mm ao ano;
- e) altos níveis de periodontopatógenos como *aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *porphyromonas gingivalis* e *prevotella intermedia*.

A prevalência de mucosite é em torno de 80% dos indivíduos restaurados com implantes, e periimplantite varia de 28 a 56%. Os fatores de risco incluem: higiene oral deficitária, história de periodontite, diabetes e fumo (Lindhe et al., 2008).

Ferreira et al. (2006) avaliaram a prevalência de doença periimplantar em indivíduos brasileiros. Foram estudados 212 indivíduos reabilitados com implantes osseointegrados. A prevalência de mucosite e periimplantite foi de 64,6% e 8,9% respectivamente. Indivíduos com saúde periimplantar apresentaram baixo índice de placa e menos sangramento à sondagem. A presença de periodontite e diabetes foram associadas a um maior risco de desenvolvimento de periimplantite. Esse estudo concluiu que a presença de periodontite, a diabetes e a falta de higiene contribuem para aumentar o risco de desenvolvimento de doença periimplantar.

De acordo com Heuer et al. (2007), a formação do biofilme ao redor de implantes dentários é um pré-requisito para o aparecimento da periimplantite, mas a aderência celular ao redor dos implantes através dos hemidesmossomas reduz o risco de formação de bolsa perimplantar.

Serino & Strom (2008) avaliaram a periimplantite em pacientes parcialmente edentados. Foram selecionados 23 pacientes com sinais clínicos de periimplantite ao redor de um ou mais implantes dentários e dentes remanescente na mesma arcada ou na oposta. Foram obtidos índices de placa (PI), de sangramento gengival (GBI), de profundidade de sondagem da bolsa (PPD),

capacidade do paciente de higienizar os sítios de implantes, e tempo em função. Os pacientes foram ainda subdivididos em subgrupos: com ou sem periodontite, perda óssea ou não no dente e fumante ou não fumante. Treze pacientes apresentavam perda óssea mínima ao redor dos dentes e não apresentavam periodontite ativa, cinco apresentavam perda óssea superior a um terço da raiz, mas sem sinais de periodontite ativa e apenas cinco apresentavam periodontite. Seis pacientes eram fumantes. 74% dos implantes não permitiam acesso para higienização. Raramente um sítio que apresentava condições de higiene apresentou periimplantite. Periimplantite foi um achado freqüente em pacientes que apresentavam perda óssea nos dentes naturais.

Também em 2008, Aloufi et al. avaliaram a saúde periimplantar de pacientes com periodontite crônica. Foram selecionados 61 indivíduos com média de idade de 58 anos. Desses, 31 apresentavam periodontite crônica severa e 30 não apresentavam periodontite. Foram realizados exames periodontais de índice de placa, índice gengival, índice de sangramento, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e perda óssea radiográfica. Os resultados demonstraram que houve diferença significativa na perda de inserção ao redor dos implantes no grupo com periodontite crônica severa. Os autores concluíram então que em pacientes com periodontite crônica severa e que irão se submeter a reabilitações com implantes deve haver um maior controle da saúde periimplantar.

## 2.8 Microbiota ao redor de implantes dentários

O conceito de que a composição da microbiota subgingival em pacientes parcialmente edentados é um resultado da composição da microbiota ao redor do dente tem sido confirmada em vários estudos (Malmestron et al., 1990; Quirynen et al., 1996; Fardal et al., 1999; Heuer et al., 2007; Pongnarisorn et al., 2007; Aloufi et al., 2008). Portanto, a microbiota periimplantar em pacientes parcialmente edentados depende da flora periodontal dos dentes remanescentes. Da mesma forma como em pacientes edentados a colonização dos sítios dos implantes com flora específica para aquele paciente ocorre logo após os implantes entrarem em contato com o meio oral (Leonhardt et al., 1993; Leitão et al., 2005; Heuer et al., 2007). Mengel & Flores-de-Jacoby (2005) mostraram que é possível a realização de uma reabilitação com implantes em pacientes submetidos a tratamento de periodontite crônica e agressiva, porém deve haver um maior controle.

A microbiota ao redor de implantes de pacientes com periimplantite apresenta microrganismos periodontopatogênicos, além de espécies oportunistas como *Staphylococcus* ssp e *Candida* ssp (Leonhardt et al., 2003).

O resultado de vários estudos sugere similaridade entre a microbiota ao redor dos implantes falhos e a associada com periodontite (Nevins, Langer, 1995; Jansson et al., 2005; Heuer et al., 2007; Shibli et al., 2007).

Malmestron et al. (1990) e Fardal et al. (1999) concluíram que implantes colocados em pacientes com história de periodontite refratária provavelmente possuem um maior risco de falha. Entretanto, isso não é demonstrado em vários estudos nesses pacientes, que relatam um índice de sucesso acima de 90% (Nevins, Langer, 1995; Jansson et al., 2005; Heuer et al., 2007; Shibli et al., 2007).

O biofilme subgengival associado com a periimplantite é caracterizado por uma microbiota complexa e densa, onde bastonetes Gram-negativos móveis constituem a maior proporção. A microbiota encontrada em lesões destrutivas ao redor do implante se assemelha à periodontite crônica (Shibli et al., 2007).

As falhas de implantes devido à ação bacteriana tendem a apresentar altas porções de espiroquetas e bastonetes móveis, já implantes que falharam devido à ação de trauma mecânico apresentavam morfotipos bacterianos semelhantes a implantes saudáveis (cocos e bastonetes não-móveis) (Rosenberg et al., 1991; Heuer et al., 2007; Pongnarisorn et al., 2007).

Uma grande variedade de microrganismos pode ser cultivada de regiões periimplantares de implantes falhos em pacientes parcialmente ou totalmente edentados. A falha no implante não pode estar relacionada a um microrganismo específico (Jansson et al., 2005; Heuer et al., 2007).

Mombelli et al. (1987) isolaram grande proporção de bastonetes anaeróbios gram-negativos em pacientes totalmente ou parcialmente edentados, especialmente *P. intermedia* e *Fusobacterium*. Alcoforado et al. (1990) observaram alta proporção de *P. intermedia*, *P. micros*, *C. rectus*, e espécies de *Fusobacterium*. Listgarten & Lai (1999) isolaram *T. forsythia* (59%), espiroquetas (54%), *Fusobacterium* (41%), *P. micros* (39%) e *P. gingivalis* (27%) ao redor de implantes falhos em pacientes parcialmente edentados.

Segundo Quirynen et al. (1990) nenhuma diferença significativa na distribuição de espécies bacterianas foi encontrada entre implantes e dentes naturais. A porcentagem de cocos, bastonetes móveis, espiroquetas e outras bactérias foi 65.8, 2.3, 2.1 e 29.8% para sítios com implantes e 55.6, 4.9, 3.6, e 34.9% para dentes, respectivamente. Porém, quando a composição do biofilme nos



implantes nos pacientes edêntulos totais foi comparada com os dentes ou implantes de pacientes parcialmente edêntulos, várias diferenças foram achadas: foram maiores os índices de placa ao redor dos implantes dos edêntulos parciais que em implantes em edêntulos totais. Os resultados desse estudo sugerem que dentes podem servir de reservatório para colonização bacteriana dos implantes de titânio na mesma boca. Isto leva a concluir que pacientes que possuem implantes adjacentes a dentes naturais com história previa de doença periodontal são mais susceptíveis a desenvolverem periimplantite.

Em estudo de Leonardt et al. (1993), 19 pacientes parcialmente edentados foram seguidos por 3 anos após a colocação de implantes. Pré-operatoriamente, mais de 30% dos pacientes foram colonizados com *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Um mês após a colocação dos implantes esses microrganismos foram encontrados ao redor dos implantes, mas após 3 anos de avaliação, perda óssea marginal foi observada em apenas 1 paciente. Esses resultados sugerem que a presença de patógenos periodontais não necessariamente resulta no desenvolvimento de periimplantite.

Para avaliarem a microbiota periimplantar de pacientes que apresentavam problemas periodontais antes da instalação de implantes dentários, Mombelli et al. (1995) selecionaram vinte pacientes. Através de cultura, antes da instalação dos implantes, quatro pacientes foram positivos para *P. gingivalis*, 13 para *P. intermedia*, dois para *A. actinomycetemcomitans*, 16 para *Fusobacterium* e sete para *C. rectus*. Após seis meses do implante exposto na cavidade oral, dois pacientes apresentaram *P. gingivalis*, seis apresentavam *P. intermedia*. *Fusobacterium* esteve presente em 13 periimplantes, quatro pacientes mostraram evidências de *C. rectus*. Em nenhum periimplante foi encontrada a presença de *A. actinomycetemcomitans*.

Objetivando analisar a microbiota ao redor de implantes osseointegrados de pacientes edêntulos com história de doença periodontal, Danser et al. (1997) selecionaram vinte pacientes. *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* não foram detectados, *P. intermedia*, *Peptostreptococcus* ssp e *Fusobacterium* ssp mostraram-se mais prevalente. *Campylobacter rectus* e *Pseudomonas* foram detectados em menor frequência.

Lee et al. (1999) avaliaram a microbiota da língua, dentes e de implantes dentários antes e após a colocação de implantes. Foram selecionados dez pacientes edentados e 11 parcialmente dentados. Houve semelhança na prevalência de microrganismos em implantes e dentes. A quantidade de microrganismo encontrada na língua foi maior, entretanto as espécies foram similares. Não houve diferença significativa entre a microbiota da língua de pacientes edentados e parcialmente dentados. Mais espécies de microrganismos foram encontradas na língua antes da colocação dos implantes.

Sumida et al. (2002) analisaram a transmissão de bactérias da doença periodontal para região de implantes dentários. Através da PCR detectaram a transmissão de *P. gingivalis* e *P. intermedia* de bolsas periodontais para regiões de periimplante. Os autores indicaram a remoção desses periodontopatógenos das bolsas periodontais, antes da colocação de implantes dentários.

Em periimplantite induzida Shibli et al. (2003) avaliaram a microbiota e a perda óssea radiográfica de 36 (9 de titânio comercialmente puro, 9 tratados com plasma spray de titânio, 9 com hidroxiapatita e 9 com ataque ácido) implantes com quatro diferentes superfícies instalados em mandíbulas caninas. Após 3 meses com ótimo controle de placa, foi realizada a colocação dos *abutments* cicatrizadores. Nos dias 0, 20, 40 e 60 após a colocação de fios de algodão, amostras microbiológicas e

radiografias periapicais foram obtidas. A presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Campylobacter ssp*, *Fusobacterium ssp*, *Streptococcus*  $\beta$  hemolíticos e *Candida ssp* foram analisados por meio de cultura. *P. intermedia* foi detectado em 13,89% dos implantes no tempo zero e em 100% nos demais tempos analisados. *P. gingivalis* não foi detectado no início, mas após 20 e 40 dias foi detectado em 33,34% e em 60, 29,3%. *Fusobacterium ssp* foi detectado em todos os períodos. *Streptococcus ssp* foram detectados em 16,67%, 83,34%, 72,22%, e 77,42% dos implantes nos períodos 0, 20, 40, 60 respectivamente. *Campylobacter ssp* e *Candida ssp* não foram detectados. Não houve diferença significativa entre as superfícies. Houve diferença na composição da microflora antes e após a colocação do fio de algodão, mas não houve diferença estatística entre os períodos. Além disso, a perda óssea radiográfica não foi significativa entre as diferentes superfícies estudadas.

Leitão et al. (2005) analisaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* no sulco periimplantar de 19 pacientes parcialmente edentados através de PCR e ainda avaliaram a profundidade do sulco, sangramento a sondagem e risco de doença. Dos indivíduos estudados, dez apresentavam história de doença periodontal. Foram encontradas amostras desses microrganismos em sete indivíduos, dos quais quatro apresentavam história de doença periodontal. Os resultados sugeriram que mesmo quando não existem sinais significantes de processo inflamatório, a constatação da presença de periodontopatógenos pode indicar um maior risco ao desenvolvimento da periimplantite, requerendo um maior controle pós-operatório destes pacientes.

Com a proposta de comparar a microbiota associada à saúde e doença ao redor de implantes e dentes, Mengel & Flores-de-Jacob (2005) selecionaram 39

indivíduos parcialmente edentados que possuíam um total de 150 implantes. Destes, 15 tinham história de periodontite agressiva (GAgP), 12 de periodontite crônica (GCP) e 12 com saúde periodontal. Todos os pacientes foram examinados a cada três meses por um período de três anos. Em cada sessão, parâmetros clínicos de profundidade de sondagem (PD), recessão gengival (GR), nível de inserção (AL), índice gengival (GI) e índice de placa (PI) foram realizados e a composição da microbiota foi determinada através de PCR. Em pacientes com doença periodontal, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram detectadas em dentes e implantes no primeiro e terceiro ano. O GI e PI dos implantes e dos dentes variaram respectivamente de 0,25 e 0,6 em todos os grupos e em todo o período estudado. Além disso, houve um aumento de PD e uma contínua perda de inserção nos pacientes com GAgP. A perda de inserção foi maior nos implantes em todos os grupos. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em dois pacientes GAgP, enquanto *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram prevalentes tanto em indivíduos com GAgP como em pacientes com GCP. Radiograficamente foi detectada uma extensa perda óssea nos periimplantes e periodontos dos pacientes GAgP após três anos. Os resultados demonstraram que a reabilitação oral pode ser realizada em pacientes com história de periodontite agressiva e crônica.

Utilizando PCR, Devides & Franco (2006) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* em mandíbulas edêntulas antes, quatro e seis meses após a colocação de implantes dentários suportados por próteses. No arco edêntulo, foi encontrado *A. actinomycetemcomitans* em 13,3%, *P. intermedia* em 46,7% e não foi encontrado *P. gingivalis*. Após quatro e seis meses, *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em 60% e 73,3% respectivamente, *P.*

*intermedia* em 46,7% e 53,3% respectivamente e *P. gingivalis* em 46,7% e 53,3% respectivamente.

Com o intuito de analisar a prevalência de marcadores periodontais e gene específico de IL-1 e seus efeitos em indivíduos que receberam implantes imediatos, Rabel & Koheler (2006) selecionaram 59 pacientes (18 fumantes) com periodontite crônica avaliados num período pós-operatório de um ano. Previamente a extração duas amostras de DNA foram obtidas para o diagnóstico microbiológico de cinco patógenos anaeróbios Gram-negativos (*Porphyromonas gingivalis*, *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* *Tannerella forshythia*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*) e identificado o polimorfismo do gene IL-1. Os pacientes foram tratados com 95 implantes dentários colocados em sítios de extração sendo que 78 receberam carga imediata. Após um ano, quatro implantes falharam e todos os pacientes eram fumantes. Não houve diferenças na microbiota de paciente fumantes e não fumantes. O cigarro mostrou aumentar o risco de perda do implante. Não foi encontrada associação entre falha do implante e a presença de polimorfismo de IL-1. Em conclusão, segundo os autores, sítios infectados não são contra-indicações para realização de implantes imediatos.

Furst et al. (2007) analisaram a colonização na superfície dos implantes imediatamente após sua colocação e doze semanas após a cirurgia para comparar a microbiota periimplantar subgingival e adjacentes a sítios dentários. Eles verificaram que a colonização bacteriana ocorre 30 minutos após a colocação do implante.

Analisando a colonização bacteriana ao redor de implantes dentários, Heuer et al. (2007) propuseram uma investigação quantitativa do biofilme formado ao redor dos abutments protéticos dos implantes e se *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* estão presentes no fluido gengival ao redor de implantes dentários. A

formação de biofilme de 14 abutments cicatrizadores, inseridos por 14 dias em dez pacientes foi analisada quantitativamente pelo método do elétron secundário. PCR foi utilizado para detectar a presença ou não de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* no fluido gengival. Para essa análise, amostras de fluido gengival foram coletadas com o auxílio de cones de papel estéreis de quatro sítios por abutment. A diferença entre os biofilmes presentes na superfície supragengival (17,5 +/- 18,3%) e subgengival (0,8 +/- 1%) foram diferentes estatisticamente. Os dois patógenos periodontais estudados não estavam presentes em nenhuma das amostras.

Shibli et al. (2008) compararam a composição microbiana do biofilme sub e supragengival de indivíduos com e sem periimplantite. Foram selecionados 44 pacientes com pelo menos um implante na boca em função por aproximadamente dois anos divididos em dois grupos de 22: um grupo com periimplantite, com indivíduos apresentando sítios de periimplantites com defeitos ósseos > 3 mm, sangramento a sondagem e/ou supuração e o grupo controle constituindo de indivíduos com periimplante saudável. Os parâmetros clínicos avaliados foram: índice de placa, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Amostras de biofilme supra e subgengivais foram removidas do local mais profundo do sulco periimplantar dos pacientes e analisada a presença de 36 microrganismos através da técnica de hibridização de DNA-DNA *checkboard*. Elevada concentração de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* foram observados no grupo com periimplantite, tanto supra como subgengival. A proporção dos patógenos do complexo vermelho apresentou-se elevada.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento experimental**

O presente estudo apresentou as características metodológicas abaixo citadas:

- a) Desenho: transversal;
- b) Grupos experimentais: periimplantite; periimplante saudável; periodontite; periodonto saudável.

### **4.2 Considerações éticas**

A presente pesquisa atendeu a Resolução nº196, de 16 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, e ao Código de Ética Profissional Odontológico (Resolução CFO nº042/2003). A todos os indivíduos recrutados foram oferecidas explicações verbais e escritas sobre os objetivos, método, benefícios e eventuais riscos relacionados à participação na pesquisa (Apêndice A). Assim, os indivíduos que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da CPO - São Leopoldo Mandic sob o número 2008/0098 (Anexo A). Todos os participantes foram encaminhados para programas preventivos ou receberam tratamento periodontal/periimplantar de acordo com suas necessidades individuais.

### 4.3 População do estudo

Todos os voluntários, provenientes do Serviço de Triagem da Universidade de Taubaté - UNITAU (Departamento de Odontologia), foram submetidos à anamnese (Anexo D) para obtenção de informações pessoais e caracterização da condição de saúde geral.

a) Critérios de inclusão:

- Sexo: feminino ou masculino;
- Idade: entre 27 e 62 anos;
- Número mínimo de 8 dentes;
- O mínimo de uma prótese sobre implante osseointegrado, sob função há pelo menos um ano e no máximo três anos; nos grupos com implante.

b) Critérios de exclusão:

- Tabagismo, etilismo;
- Diabetes melito, imunossupressão, gestação e lactação;
- Envolvimento de bifurcação: Classes I, II ou III;
- Dispositivos ortodônticos ou protéticos extensos, móveis ou fixos;
- Tratamento periodontal prévio: período de 12 meses;
- Antibióticoterapia local ou sistêmica: nos seis meses prévios ao início do estudo;
- Uso regular de anti-sépticos bucais nos seis meses que antecederam o início do estudo.



#### **4.4 Cálculo amostral**

Suportados por dados de estudos similares da literatura, foi conduzido um cálculo amostral com auxílio do software Bio Estat 5.0. Foi aplicado o teste estatístico *t* de Student para amostras independentes, adotando poder do teste de 80% e nível  $\alpha$  de significância de 5 %. A partir dos resultados, foi proposta a utilização de 22 indivíduos em cada grupo.

O presente estudo foi composto de quatro grupos nomeados abaixo, respeitando os critérios descritos no item 4.7 d (pág. 52):

- a) Indivíduos com periimplantite (n=22);
- b) Indivíduos com periodontite (n=22);
- c) Indivíduos com periimplante saudável (n=22);
- d) Indivíduos com periodonto saudável (n=22).

#### **4.5 Exame clínico periodontal**

Foram realizadas as medidas de Profundidade de sondagem (PS), Índice de Placa (IP) e Índice de Sangramento Gengival (ISG) de Ainamo & Bay (1975), para os quatro grupos e anotados em uma ficha de avaliação periodontal (Anexo E).

#### **4.6 Acompanhamento pós-estudo dos voluntários**

Todos os indivíduos incluídos no presente estudo foram encaminhados para as clínicas de graduação e/ou pós-graduação em Periodontia da UNITAU para que fosse realizada a terapia periodontal ou periimplantar de acordo com as necessidades individuais. Para o atendimento das demais necessidades

odontológicas, os indivíduos foram encaminhados às disciplinas especializadas do mesmo Departamento. Os indivíduos saudáveis receberam orientação sobre higiene bucal e hábitos alimentares.

#### 4.7 Análise clínica

##### a) calibração dos examinadores:

Cada parâmetro clínico foi obtido por um único examinador cegado em relação ao grupo e previamente calibrado conforme metodologia descrita por Araujo et al. (2003). Para a variável contínua profundidade de sondagem foi utilizado o EPM (erro padrão da medida) e para as variáveis categóricas, índice de placa e índice de sangramento gengival foi utilizado o teste Kappa. O examinador foi considerado calibrado mediante  $EPM \leq 0,8$  e  $K > 0,8$  e  $< 0,95$ .

##### b) parâmetros periimplantares avaliados:

Os parâmetros clínicos utilizados para determinar a condição periimplantar foram obtidos em seis sítios/implante (mesio-vestibular; medio-vestibular; disto-vestibular; mesio-palatino; médio-palatino e disto-palatino) por um único examinador calibrado e auxílio de sonda periodontal manual<sup>‡</sup> e espelho plano número 5 sob luz artificial e isolamento relativo do campo operatório. Adicionalmente, a altura da crista óssea foi determinada em radiografias periapicais. Os parâmetros foram considerados conforme descrição abaixo:

1. presença (1) ou ausência (0) de placa bacteriana visível;
2. presença (1) ou ausência (0) de sangramento marginal;
3. presença (1) ou ausência (0) de sangramento à sondagem;

---

<sup>‡</sup> PCPUNC 15 Hu-friedy Mfg Co Inc. Chigago IL

4. presença (1) ou ausência (0) de supuração;
5. profundidade de sondagem (mm) - caracterizada pela distância da margem periimplantar até o fundo da bolsa ou sulco;
6. presença (+) ou ausência (-) de perda óssea = 3mm. Radiografias periapicais foram obtidas utilizando-se películas radiográficas simples por meio da técnica do paralelismo e reveladas em processadora automática. Com auxílio do software Imagelab, um único examinador realizou as mensurações da distância entre o conector e a crista óssea nas radiografias já digitalizadas.

c) parâmetros periodontais avaliados:

Independente do grupo todos os participantes foram periodontalmente examinados pelo mesmo pesquisador calibrado, sendo as mensurações obtidas em seis pontos por dente (mesio-vestibular; medio-vestibular; disto-vestibular; mesio-palatino; médio-palatino e disto-palatino), em todos os dentes presentes excetuando-se os terceiros molares, também com auxílio de uma sonda periodontal manual<sup>‡</sup>: Os parâmetros avaliados estão descritos abaixo:

1. profundidade de sondagem (PS) - distância em mm entre a margem gengival e o fundo do sulco/bolsa periodontal;
2. nível de inserção clínica (NIC) - distância em mm entre a junção cimento-esmalte e o fundo do sulco/bolsa periodontal;
3. presença (1) ou ausência (0) de placa bacteriana visível;
4. presença (1) ou ausência (0) de sangramento gengival;
5. presença (1) ou ausência (0) de sangramento à sondagem;

---

<sup>‡</sup> PCPUNC 15 Hu-friedy Mfg Co Inc. Chigago IL

6. presença (1) ou ausência (0) de supuração;
7. presença (+) ou ausência (-) de perda óssea alveolar. Radiografias periapicais foram obtidas utilizando-se películas radiográficas simples por meio da técnica do paralelismo e reveladas em processadora automática. Com auxílio do software Imagelab, um único examinador realizou as mensurações da distância entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea nas radiografias já digitalizadas. Considerou-se normal uma distância de até 2mm entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar.

d) classificação dos indivíduos:

Periimplantite: Indivíduo com no mínimo um sítio periimplantar com sangramento e/ou supuração à sondagem, perda óssea radiográfica maior que 3 mm a partir da linha do conector protético, e defeito ósseo em forma de cálice (Mombelli, Lang, 1998). Sítios dentários sem lesões ativas de cárie e/ou doença periodontal.

Periimplante saudável: ausência de qualquer sítio periimplantar com mucosite ou periimplantite, de acordo com os mesmos parâmetros anteriormente descritos em qualquer um dos seus implantes. Sítios dentários sem lesões ativas de cárie e/ou doença periodontal.

Periodontite: indivíduos que apresentem no mínimo 4 sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm e nível de inserção clínica maior ou igual a 3 mm, distribuídos em dentes diferentes segundo critérios estabelecidos por Lopez et al. (2002). Ausência de implantes osseointegrados.

Periodonto saudável: Indivíduo com média de perda de inserção clínica < 1,5 mm; ausência de sítios com perda de inserção clínica de > 2 mm; ausência de inflamação gengival e perda óssea alveolar (Cortelli et al., 2008). Ausência de implantes osseointegrados.

## **4.8 Análise microbiológica**

### *4.8.1 Obtenção das amostras microbiológicas*

Em todos os grupos foram realizadas coletas microbiológicas intra-sulculares dos sítios mesio-vestibulares dos dentes e implantes correspondentes, empregando para isto, cone de papel absorvente autoclavado nº30 (Dentsply®).

Neste procedimento, cada sítio periodontal ou periimplantar selecionado foi isolado com roletes de gaze esterilizada e o biofilme dental supragengival foi removido com algodão esterilizado. Um cone de papel foi inserido na porção mais apical do sulco periodontal ou periimplantar e mantido em posição por 60 segundos (Cortelli et al., 2005). Em seguida, o cone de papel foi colocado em um único microtubo tipo Eppendorf® contendo 1,5 mL de solução de Ringer reduzida e transportados ao laboratório de Biologia Molecular da UNITAU. As amostras foram mantidas a temperatura de - 80°C até o seu processamento.

Para todos os grupos não foram realizadas coletas microbiológicas em sítios com supuração espontânea ou a sondagem.

#### 4.8.2 Análise microbiológica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Espécies bacterianas pesquisadas:

- a) *Campylobacter rectus*;
- b) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*;
- c) *Porphyromonas gingivalis*

Processamento das amostras:

a) extração de DNA genômico : Para o procedimento de extração do DNA genômico, os microtubos (contendo cones de papel) foram homogeneizados em agitador mecânico por 15 segundos (Vortex<sup>®</sup>, Phoenix, AP56). Após esta etapa, 500µL de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo previamente identificado, e esse submetido à centrifugação por dez minutos (12000rpm). Ao término do processo de centrifugação, o sobrenadante foi removido e 200µL de Matriz comercial de extração e purificação de DNA (Instagene, Bio-Rad<sup>®</sup>) foram adicionados ao *pellet* formado. Após homogeneização por 15 segundos, o microtubo foi mantido em banho-maria por trinta minutos a 56°C. Em seguida, o microtubo foi novamente homogeneizado por trinta segundos e então mantido por oito minutos em banho-maria a 100°C. Ao término desse período, a conclusão do processo de extração e purificação deu-se pela homogeneização por trinta segundos e centrifugação por três minutos (12000rpm).

b) detecção dos periodontopatógenos: As amostras foram amplificadas para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos para identificação das cepas de *C. rectus*, sense: 5'-TTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTC-3', e antisense: 5'-TTTCTGCAAGCAGACACTCTT-3', *A. actinomycetemcomitans*, sense: 5'-

AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC-3', e antisense: 5'-  
ATGCCAACTTGACGTAAAT-3' e *P. gingivalis* sense: 5'-  
AGGCAGCTTGCCATACTGCGG-3' e antisense: 5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-  
3'.

A PCR foi realizada em um termociclador tipo Mastercycler Gradient (Eppendorf®) com as seguintes especificações: Um ciclo inicial a 94°C/5min, 35 ciclos 94°C/30seg, 55°C/30seg, 72°C/1min, e um ciclo final de 72°C/5min. Para a análise dos produtos amplificados pela PCR foi empregada eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com SYBR Safe™ (Invitrogen®). A eletroforese foi conduzido a 5V/cm<sup>2</sup> em solução tamponada (TAE) por 120min. A visualização dos produtos gerados pela amplificação pela PCR foi realizada em câmara de irradiação ultravioleta (UV). Marcador de peso molecular (Ladder 100 - Invitrogen®), bem como, controles positivos e negativos foram empregados em todos os géis, para a confirmação dos resultados obtidos pela PCR. Os géis foram fotografados e comparados com os produtos amplificados a partir de cepas padrão.

#### 4.9 Análise estatística

Após o término do processamento dos dados, os mesmos foram submetidos a um tratamento estatístico específico. Para tanto, foi adotado o nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) e com auxílio dos softwares Bioestat 5.0 e SPSS 11.0, a análise foi conduzida. Inicialmente a característica da distribuição amostral foi testada e em todas as análises foi aplicado o teste Qui-quadrado.

## 5 RESULTADOS

Foram incluídos no presente estudo 88 indivíduos de ambos os sexos, de acordo com os grupos estabelecidos (Quadro 1). A caracterização dos indivíduos em função dos parâmetros clínicos profundidade de sondagem (PS), índice de placa (IP) e índice de sangramento gengival (ISG) encontra-se expressa no Quadro 2.

	<b>Periimplantite</b> <b>(MI± DP)</b>	<b>Periodontite</b> <b>(MI± DP)</b>	<b>Periimplante Saudável</b> <b>(MI± DP)</b>	<b>Periodonto Saudável</b> <b>(MI± DP)</b>
<b>Masculino</b>	5	5	8	5
<b>Feminino</b>	17	17	14	17
<b>Total</b>	22 (47,59±11,9)	22 (35,09±7,29)	22 (44,45±17,74)	22 (32,45±7,28)

Quadro 1 - Distribuição da população estudada. MI - Média de idade; DP - Desvio padrão

	<b>PS</b> <b>(Média ± DP)</b>	<b>IP</b> <b>(Média ± DP)</b>	<b>ISG</b> <b>(Média ± DP)</b>
<b>Periimplantite</b>	4,98 ± 2,03	0,33 ± 0,41	0,44 ± 0,39
<b>Periodontite</b>	3,48 ± 0,61	0,72 ± 0,19	0,53 ± 0,24
<b>Periimplante Saudável</b>	3,39 ± 1,09	0,48 ± 0,47	0,33 ± 0,36
<b>Periodonto Saudável</b>	2,10 ± 0,21	0,64 ± 0,50	0,32 ± 0,21

Quadro 2 - Distribuição média dos parâmetros clínicos profundidade de sondagem (PS), índice de placa (IP) e índice gengival (ISG) em função dos grupos incluídos no presente estudo. DP - Desvio padrão.



Após completa leitura e interpretação dos géis de agarose para *C. rectus* (figura 3), *A. actinomycetemcomitans* (figura 4) e *P. gingivalis* (figura 5), inicialmente, foi proposta uma avaliação da prevalência de *C. rectus*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em cada grupo incluído no presente estudo. Para os indivíduos portadores de periimplantite, *C. rectus* e *P. gingivalis* apresentaram-se mais prevalentes ( $p < 0,05$ ) em comparação a *A. actinomycetemcomitans*. Nos indivíduos acometidos por periodontite, *C. rectus* foi o patógeno mais prevalente ( $p < 0,05$ ), seguido por *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* sucessivamente. Para os indivíduos com periodonto e periimplante saudáveis, *C. rectus* foi o patógeno isoladamente mais ( $p < 0,05$ ) freqüente (figura 1).

Posterior a análise intra-grupos, foi proposta uma análise inter-grupos para a prevalência dos patógenos periodontais. Um primeiro agrupamento comparou os grupos periodontite com periimplantite (Quadro 3) e em outro agrupamento comparou-se os portadores de periodonto e periimplante saudáveis (Quadro 4).

Para os grupos com doença estabelecida, apenas *P. gingivalis* apresentou diferença estatisticamente significativa, estando mais freqüente ( $p < 0,05$ ) nos indivíduos acometidos por periimplantite em comparação aos com periodontite (Quadro 3). Já para o agrupamento de indivíduos saudáveis, apenas *C. rectus*, apresentou-se mais prevalente ( $p < 0,05$ ) no grupo periodonto saudável em comparação ao grupo de periimplante saudável, estando os demais patógenos em freqüências similares entre esses grupos (Quadro 4).

Finalmente, foi proposta uma análise conjunta da freqüência bacteriana entre os 4 grupos envolvidos no presente estudo (figura 2).

*C. rectus* apresentou-se menos prevalente ( $p < 0,05$ ) nos indivíduos com periimplante saudável em comparação aos demais grupos avaliados. Para *A.*

*actinomycetemcomitans*, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre todos os grupos. Já *P. gingivalis*, apresentou-se mais prevalente no grupo periimplantite, seguido pelo grupo periodontite e por último nos grupos periodonto e periimplante saudáveis que se mostraram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) equivalentes (figura 2).

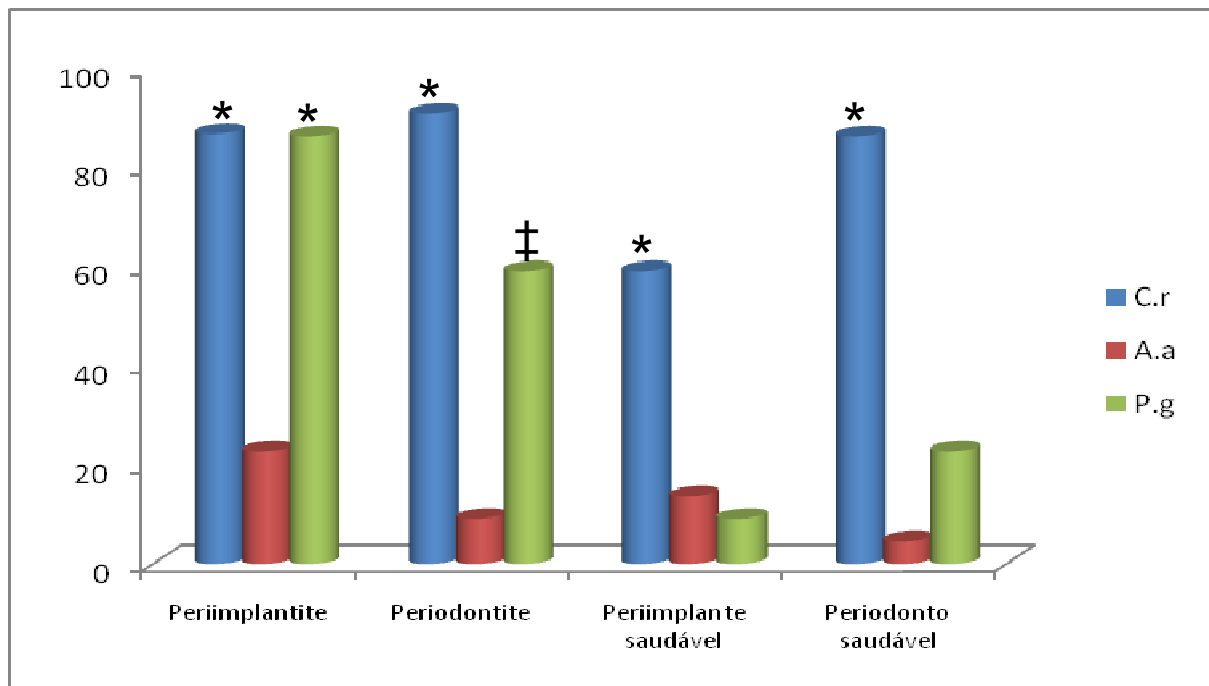


Figura 1 - Distribuição percentual da prevalência bacteriana isoladamente em cada grupo (intra-grupo) do presente estudo.

\* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), maior valor médio - teste Qui-quadrado.

‡ - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), segundo maior valor médio - teste Qui-quadrado.

		<b>C. rectus</b>	<b>A. actinomycescomitans</b>	<b>P. gingivalis</b>
<b>Periimplantite</b>	Positivo	19	5	19
	Negativo	3	17	3
	Frequência	86,36%	22,72%	86,36%
<b>Periodontite</b>	Positivo	20	2	13
	Negativo	2	20	9
	Frequência	90,90%	9,09%	59,09%
p valor		0,9867	0.4097	0.0423

Quadro 3 - Distribuição da presença, ausência e frequência dos patógenos periodontais estudados para os indivíduos portadores de periimplantite e periodontite.

		<b>C. rectus</b>	<b>A. actinomycescomitans</b>	<b>P. gingivalis</b>
<b>Periimplante saudável</b>	Positivo	13	3	2
	Negativo	9	19	20
	Frequência	59,09%	13,63%	9,09%
<b>Periodonto saudável</b>	Positivo	19	1	5
	Negativo	3	21	17
	Frequência	86,36%	4,54%	22,72%
p valor		0,0423	0,6000	0,4097

Quadro 4 - Distribuição da presença, ausência e frequência dos patógenos periodontais estudados para os indivíduos portadores de periodonto e periimplante saudáveis.

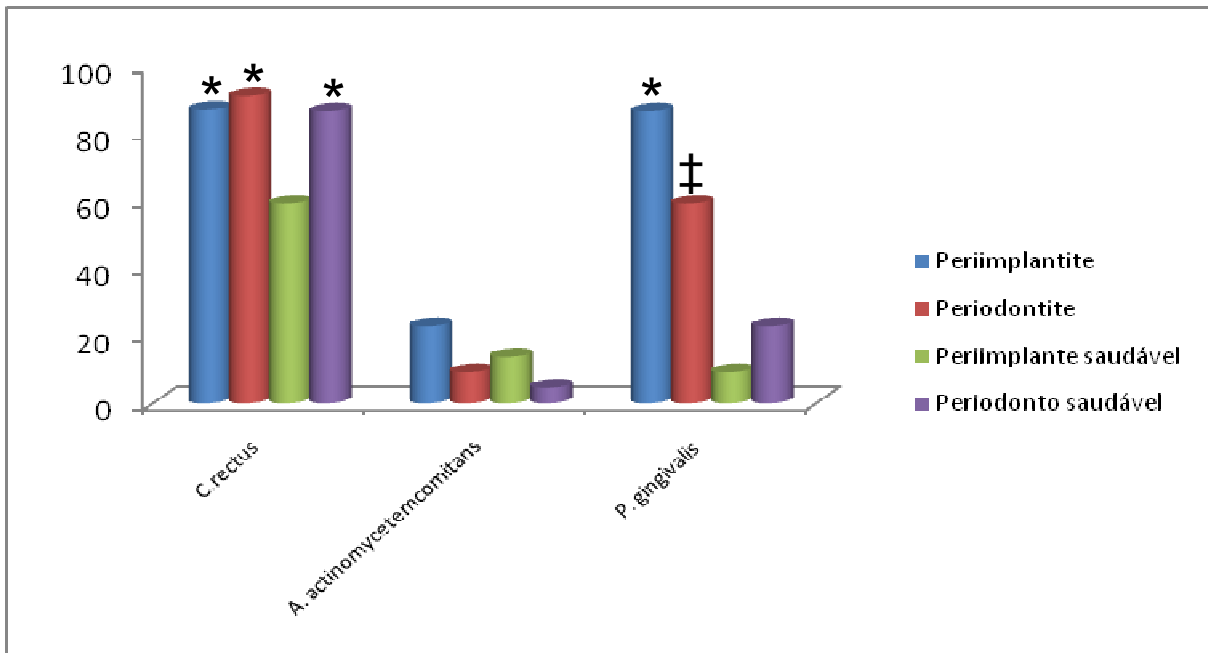


Figura 2 - Distribuição percentual da prevalência bacteriana entre os grupos (inter-grupo) do presente estudo.

\* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), maior valor médio - teste Qui-quadrado.

‡ - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), segundo maior valor médio - teste Qui-quadrado.

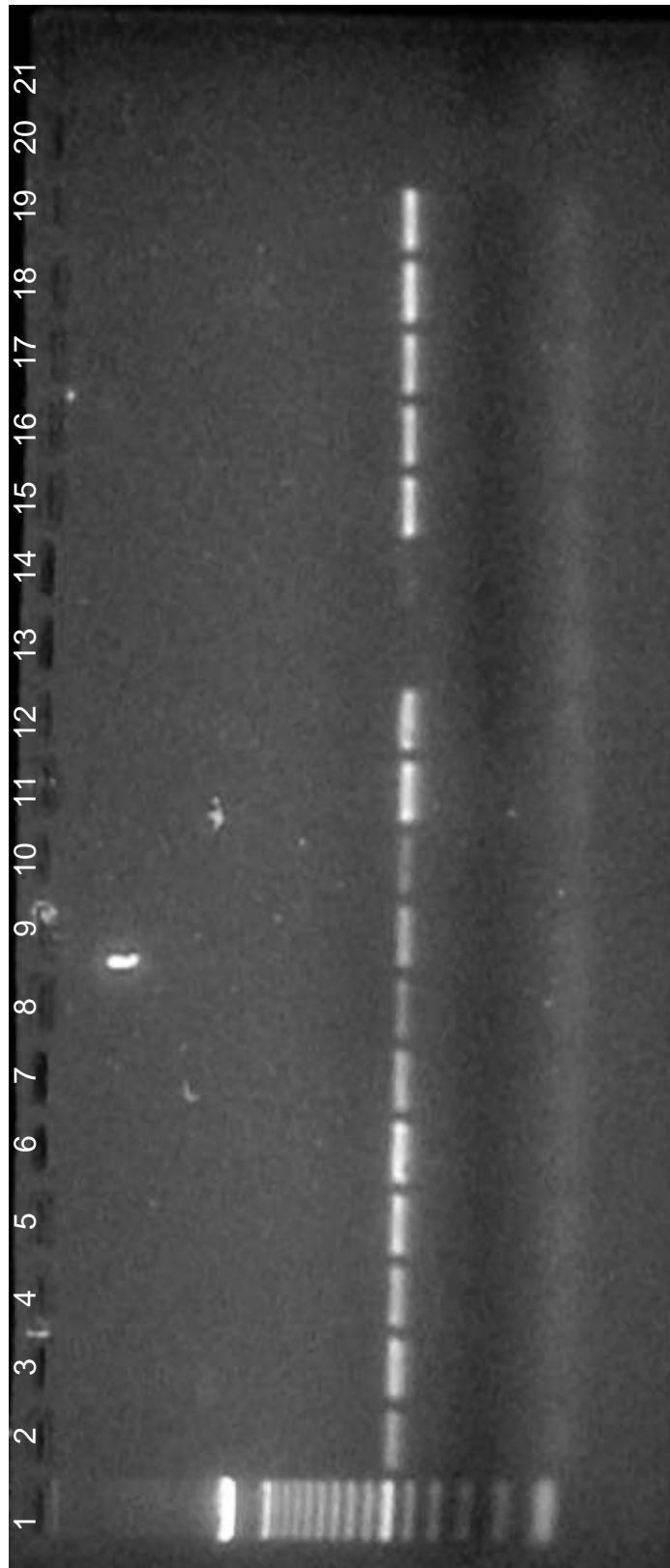


Figura 3 - Gel de agarose com primer específico para *C. rectus*.

1 - Marcador de peso molecular - Ladder 100; 2 - Controle positivo; 3-19 - Amostras; 20 - Ausente; 21 - Controle negativo



Figura 4 - Gel de agarose com primer específico para *A. actinomycetemcomitans*.

1 - Marcador de peso molecular - Ladder 100; 2 - Controle positivo; 3-19 - Amostras; 20 - Ausente; 21 - Controle negativo

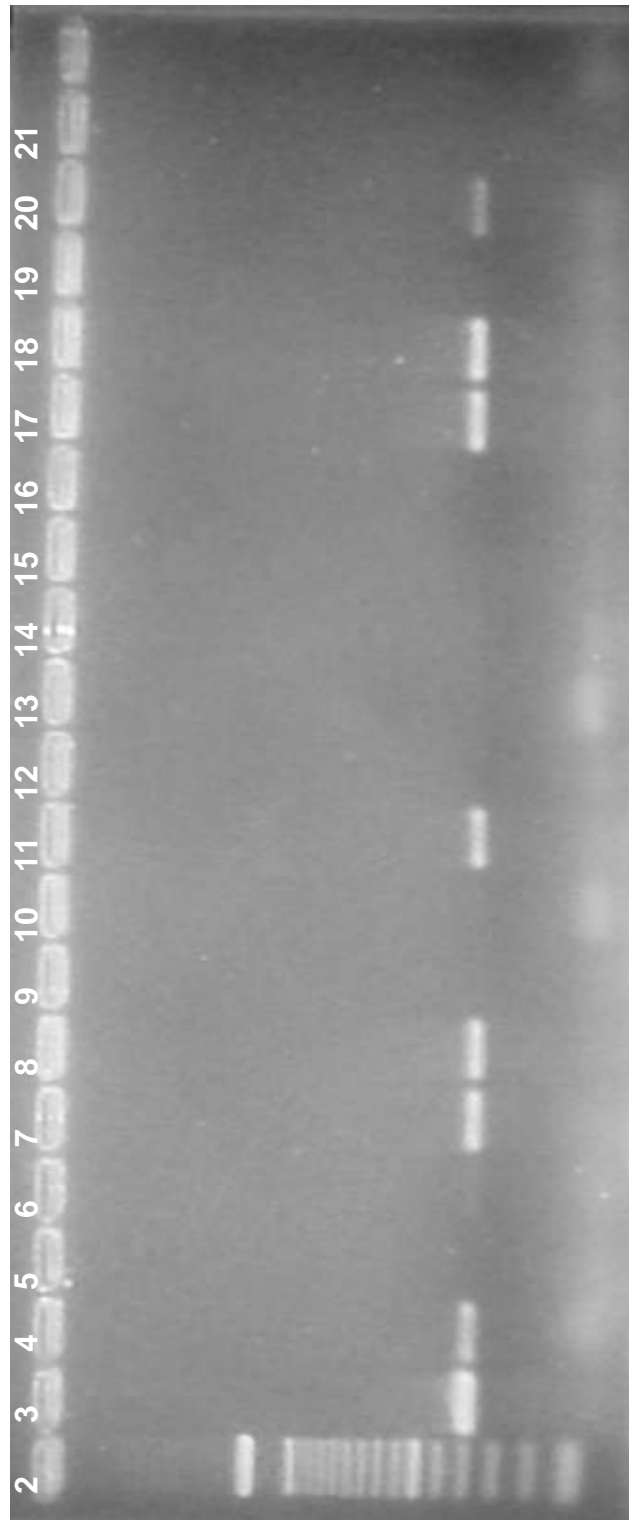


Figura 5 - Gel de agarose com *primer* específico para *P. gingivalis*.

1 - Marcador de peso molecular - Ladder 100; 2 - Controle positivo; 3-19 - Amostras; 20 - Ausente; 21 - Controle negativo

## 6 DISCUSSÃO

A doença periodontal originariamente infecciosa, tem sua progressão condicionada a fatores como, características sociais, fatores sistêmicos, fatores genéticos e composição microbiana (Nunn, 2003).

A periodontite crônica, forma mais comum de doença periodontal, caracteriza-se pela lenta progressão, com presença de elevados níveis de biofilme dental e inflamação gengival (Aap, 1999; Page, Schroeder, 1976). Observa-se prevalência de periodontite crônica na população adulta em torno de 35% (Albandar et al., 1999).

Já a periimplantite corresponde ao processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos mole e duro ao redor de implantes osseointegrados, levando a formação de uma bolsa periimplantar e conseqüentemente, perda óssea (Shibli et al., 2003). Estudos comprovam uma semelhança na evolução da periodontite crônica com a periimplantite e além disso, demonstram uma semelhança na prevalência de microrganismos periodontopatogênicos (Leonhardt et al., 2003; Leitão et al., 2005; Heuer et al., 2007).

Em pacientes edêntulos, a área subgengival ao redor dos implantes apresenta principalmente cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos e bastonetes não móveis. Em periimplantes saudáveis, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mitis* são os microrganismos mais predominantes (Mombelli, Lang, 1994). *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* são raramente detectados, enquanto *P. intermedia* e *P. nigrescens* são mais comuns. A microbiota periimplantar em pacientes edêntulos é comparado à microbiota que coloniza tecidos moles de



pacientes edêntulos sem implantes e a subgengival de pacientes periodontalmente saudáveis (Gusberti et al., 1985; Nakou et al., 1987; Mombelli et al., 1988; Sordyl et al., 1995; Danser et al., 1995; Leitão et al., 2005; Devides, Franco, 2006; Heuer et al., 2007; Pongnarisorn et al., 2007; Shibli et al., 2007; Rupani et al., 2008).

O *A. actinomycetemcomitans* é um patógeno periodontal que pode estar presente no biofilme subgengival de pacientes saudáveis, mas é mais prevalente na periodontite agressiva que geralmente é localizada e acomete pacientes jovens. Na periodontite crônica sua prevalência é menor (Cortelli et al., 2003; Fine et al., 2007).

Já *P. gingivalis* é um periodontopatógeno comum em pacientes com periodontite crônica e está presente em menor quantidade em pacientes com saúde periodontal (Hamlet et al., 2001; Ávila-Campos, Veásquez-Meléndez, 2002). Da mesma forma, *C. rectus* parece apresentar grande prevalência em pacientes com periodontite crônica (Dogan et al., 2003; Takeuchi, 2003).

Conhecendo o comportamento clínico da periimplantite o objetivo do nosso estudo foi estabelecer um comparativo entre a prevalência de *C. rectus*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em pacientes com periimplantite, periodontite, periimplante saudável e periodonto saudável, promovendo uma relação entre os microrganismos dentro de cada grupo e comparando os microrganismos entre si.

Em pacientes parcialmente edentados o número total de microrganismos no periimplante é elevado e a proporção de bastonetes móveis, espiroquetas e cocos estão aumentados quando comparado a pacientes edentados (Quirynen, Listgarten, 1990; Quirynen et al., 1996).

Há controvérsia nos estudos comparativos da microbiota subgengival de implantes em pacientes edêntulos vs. pacientes parcialmente edêntulos. Quirynen &

Listgarten (1990) acharam um aumento na proporção de bastonetes móveis e espiroquetas em pacientes parcialmente edêntulos. Apse et al. (1989) encontraram algumas diferenças na composição bacteriana de implantes e dentes em pacientes parcialmente edêntulos, indicando que o fluido gengival ao redor dos dentes deve agir como reservatório de bactérias que podem colonizar os sítios dos implantes. Em função desta discrepância encontrada entre a microbiota subgengival de periimplantes de pacientes edêntulos e parcialmente edêntulos, nosso estudo padronizou selecionar somente indivíduos parcialmente edentados com no mínimo oito dentes, pois apresenta maior semelhança a pacientes com periodontite crônica que é também nosso objeto de estudo.

A faixa etária adotada nesse estudo foi de 27 a 62 anos de idade. Esse critério foi estabelecido considerando-se a média de idade da população e uma composição homogênea dos grupos. Isso porque a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* sofre influência direta do fator idade, apresentando-se superior nos indivíduos com menor faixa etária (Zambon et al., 1996; Haraszthy et al., 2000; Haubek et al., 2001; Cortelli et al., 2002; Cortelli et al., 2003). No estudo de Zambon et al. (1996), os indivíduos portadores de *A. actinomycetemcomitans* produtores de maior quantidade de leucotoxina apresentavam média de idade de 12,7 anos. Haraszthy et al. (2000) observaram maior prevalência em indivíduos com média de 13,95 anos de idade e Cortelli et al. (2003) observaram maior prevalência em indivíduos com idade inferior a 28 anos.

Durante o estabelecimento dos grupos de pacientes portadores de implantes dentários foi necessário obter certa similaridade. Sabemos que o tecido periimplantar é formado a partir do epitélio gengival após a colocação dos transmucosos e da prótese sobre implante (Adell et al., 1981; Branemark et al., 1985;

Albretsson et al., 1994). Conseqüentemente, para que fosse possível avaliar um periimplante totalmente maduro, cuja cicatrização não interferisse na formação do biofilme subgingival, selecionamos pacientes com no mínimo um ano com a prótese em função. Para não ampliarmos as variáveis, esses implantes não poderiam estar com as próteses instaladas há mais de 3 anos.

Para realização desta avaliação, alguns cuidados foram observados na seleção dos indivíduos. Situações que pudessem influenciar o componente microbiano, como tratamento periodontal nos últimos seis meses ou utilização de antibioticoterapia no mesmo período, impossibilitaram os indivíduos de participar do estudo. Condições que, por qualquer razão, alterassem a qualidade da resposta imunológica ou hormonal do indivíduo também foram consideradas, como diabéticos, imunossuprimidos, gestantes, lactantes, como comprovado por Makiura et al. (2008) que ao analisarem a prevalência de *P. gingivalis* em pacientes diabéticos com periodontite, verificaram a diminuição da prevalência deste microrganismo após o tratamento da enfermidade. Além de obter uma relação direta entre o aumento da glicemia e a concentração de *P. gingivalis*. Yokoyama et al. (2008) provaram existir um aumento da concentração de *C. rectus* em pacientes grávidas após coleta de saliva. Outra condição que impossibilitou alguns pacientes de participarem de nosso estudo foi a presença do tabagismo. Segundo a literatura, este hábito interfere diretamente na saúde periodontal e periimplantar (Serino, Strom, 2008). Van der Veldem et al. (2003) realizaram um estudo sobre o efeito do tabagismo na microbiota de pacientes tratados de periodontite. Os resultados demonstraram que tanto fumantes como não fumantes demonstraram melhora no quadro clínico após o tratamento. Nos pacientes não fumantes foi encontrada uma diminuição na prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P.*

*intermedia*, *T. forshythia* e *F. nucleatum*. Nos pacientes fumantes os resultados mostraram apenas uma redução na prevalência de *P. gingivalis*.

Para chegarmos a um diagnóstico preciso de doença ou saúde, foi utilizado examinador calibrado conforme metodologia de Araújo et al. (2003) e estabelecidos critérios de saúde ou doença periimplantar de Mombelli & Lang (1998) e de periodontite ou saúde periodontal de Lopes et al. (2002) e Cortelli et al. (2008), respectivamente.

A diferença nos valores do parâmetro clínico de profundidade de sondagem (PS), principalmente entre pacientes com periimplantite e periimplante saudável em relação aos pacientes com periodontite e periodonto saudável sinalizam o fato comprovado na literatura de que a profundidade de sondagem não é uma condição imperativa da ocorrência de doença periimplantar uma vez que esta medida reflete em alguns casos a situação em que o implante dentário foi instalado em relação à altura gengival disponível (Mombelli, Lang, 1998).

A coleta microbiológica foi realizada nos dois dentes com maior PS (Savitt, Socransky 1984; Savitt et al., 1991). Estes foram colocados em um mesmo microtubo. O critério clínico para reduzir o número de sítios de coleta bacteriana subgengival por indivíduo baseou-se na necessidade de dois sítios com presença de mais que 3 mm de PS, associado a sangramento gengival para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *C. rectus* (Savitt et al., 1991).

A técnica de PCR foi aplicada para avaliação microbiológica por apresentar alta sensibilidade (Slots et al., 1995; Steenbergen et al., 1996) e não depender da viabilidade do microrganismo para sua detecção (Étienne, 2003).

A PCR foi descrita em 1985 por Mullis, e permitiu ampliar de modo considerável a quantidade de DNA do qual se dispõe inicialmente, tornando a técnica extremamente sensível. Parte-se de duas seqüências conhecidas de oligonucleotídeos (*primers*) que limitam a região do DNA a ser ampliado. Uma seqüência repetida (ciclos) de alterações de temperatura permite a separação das fitas duplas de DNA da amostra inicial e produção de fitas complementares por uma enzima (DNA polimerase) com função de síntese. Após a ampliação do DNA, o mesmo é visualizado em forma de bandas dispostos em géis, normalmente de agarose, em fotografias obtidas por sistemas específicos de captação de imagem (Étienne, 2003).

Antes do processo de amplificação com os *primers* para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *C. rectus* utilizados no presente estudo, todas as amostras subgingivais foram processadas com *primer* específico para o gene da actina humana. O gene desta proteína pode ser detectado em amostras contendo material humano, e desta forma, o processamento prévio com *primer* desta proteína possibilitou a confirmação do sucesso do processo de extração do DNA, bem como, uma confirmação da viabilidade da mistura e número de ciclos propostos para a realização da PCR. Todas as amostras originais foram previamente duplicadas e uma das duas congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para assegurar a possibilidade de repetição dos procedimentos microbiológicos quando da presença de eventuais problemas.

Diversos autores preconizaram a realização de 25 a 30 ciclos na obtenção de uma amplificação suficiente de DNA para originar géis com boa característica de visualização e conseqüente leitura (Ashimoto et al., 1996; Zambom et al., 1996; Haraszthy, et al., 2000; Cortelli et al., 2003). No entanto, no presente

estudo, a aplicação de 35 ciclos de amplificação proporcionou géis com bandas mais visíveis e definidas, equivalente ao protocolo proposto por Garcia et al. (1998). No presente estudo, o tempo médio de corrida dos géis foi de 2 horas, tempo suficiente para obtenção do posicionamento definitivo das bandas. Este tempo foi similar ao proposto por Garcia et al. (1998) e superior ao proposto por outros autores (Ashimoto et al., 1996; Zambom et al., 1996; Haraszthy, et al., 2000; Cortelli et al., 2003). O maior número de ciclos e tempos de corrida dos géis empregados neste estudo pode ser explicado, em parte, pelo volume final de 25µl utilizado na mistura para realização da PCR em comparação a outros protocolos que adotaram volume final de 50 a 100µl (Ashimoto et al., 1996; Zambom et al., 1996; Haraszthy, et al., 2000; Cortelli et al., 2003). Em todos os géis obtidos, na primeira coluna foi colocado apenas o marcador de peso molecular, para confirmar sua viabilidade e evitar resultados falsos negativo. A segunda coluna foi utilizada para amplificação do DNA proveniente de uma cepa padrão da bactéria pesquisada. Dessa maneira, todas as bandas geradas na eletroforese puderam ser comparadas a um controle positivo, facilitando a leitura dos géis e eliminando eventuais dúvidas com relação ao número de pares de base do produto gerado. Como controle negativo, a última coluna de cada gel continha a mistura utilizada para as amostras sem o DNA genômico, com o volume final igualado com água deionizada. A aplicação desse procedimento foi fundamental para evidenciar a não contaminação da mistura empregada na PCR, bem como dos constituintes dos géis.

Nossos resultados demonstraram uma pequena prevalência de *A. actinomycetemcomitans* entre os pacientes com periimplantite, periodontite, periodonto saudável e periimplante saudável, não havendo diferença significativa entre a prevalência desses microrganismos entre os grupos estudados. Estes

achados se justificam em função da população estudada por nós, que representou indivíduos com periodontite crônica e periimplantite e não periodontite agressiva, onde o *A. actinomycetemcomitans* é mais prevalente.

Vários estudos (Söder et al., 1993; Zambon et al., 1996; Lopez, 2000; Haraszthy et al., 2000; Cortelli et al., 2002; Avila-Campos, Veásques-Meléndez, 2002, Cortelli et al., 2002; Cortelli et al., 2003) demonstraram maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em regiões com maior destruição dos tecidos periodontais, como em periodontites avançadas ou periodontite agressiva, em relação à envoltimentos mais brandos como gengivite ou periodontite crônica leve e moderada.

Já trabalhos como o de Slot et al. (1995) encontraram uma prevalência de 36,8% de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite, enquanto nós encontramos uma prevalência de 9,09%. Apesar de o referido trabalho utilizar também o método da PCR, a população estudada foi de pacientes exclusivamente com periodontite avançada. Resultados semelhantes obtiveram Soder et al. (1993) que também avaliaram pacientes com periodontite avançada.

Em relação à presença de *A. actinomycetemcomitans* em periimplantes doentes e saudáveis, nosso estudo demonstrou uma baixa prevalência como nos outros grupos o que é comprovado na literatura por trabalhos como o de Mombeli et al. (1995) que avaliaram a microbiota ao redor do periimplante de pacientes sadios com história de doença periodontal, de todos os periodontopatógenos avaliados, *A. actinomycetemcomitans* apresentou a menor prevalência; de Lee et al. (1999) que comparando pacientes parcial e totalmente edentados observaram uma baixa prevalência deste microrganismo; e de Furst et al. (2007) que avaliaram a microbiota ao redor de implantes saudáveis e constataram, um ano após a instalação da

prótese, uma prevalência de *A. actinomycetemcomitans* de 4,3%, muito semelhante a encontrada em nosso estudo. Já Danser et al. (1997) utilizando cultura para avaliar a presença de periodontopatógenos em pacientes parcialmente edentados reabilitados com implantes dentários não encontraram *A. actinomycetemcomitans* em nenhuma amostra de biofilme subgengival estudada. Também utilizando cultura, Shibli et al. (2003) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* em periimplantite induzida em cães. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 20, 40 e 60 dias após a colocação de fio de algodão ao redor do periimplante para induzir doença. Novamente, não foi encontrado este microrganismo. Talvez, um método mais sensível como a PCR ou a utilização de uma sonda de DNA pudessem indicar a presença deste microrganismo, mesmo que em pequena proporção.

*C. rectus* é um microrganismo Gram-negativo de patogenicidade intermediária que tem sido relacionado à sítos ativos de doença periodontal (Yokoyama et al., 2008). Nosso trabalho revelou uma grande prevalência deste microrganismo em todos os grupos sendo que na periodontite, periimplantite e no periodonto saudável, os índices foram altos e não apresentaram diferença significativa entre si. A única diferença encontrada foi comparando estes grupos com o grupo com periimplante saudável.

Na literatura encontramos dados controversos. Segundo Gmur & Guggenheim (1994), a prevalência de *C. rectus* em periodontos saudáveis foi de 43%, longe dos nossos 86,36%. Essa diferença pode ser explicada pelo fato dos autores utilizarem o método de cultura para detecção dos microrganismos. Macuch & Tanner (2000), também utilizando cultura, compararam a presença de *C. rectus* entre indivíduos com periodontite e saúde periodontal e encontraram uma maior prevalência na periodontite, o que não pode ser confirmado por nossos estudos. A



população estuda pelos autores apresentou uma média de idade inferior ao do nosso estudo.

Entretanto, Soder et al. (1993) utilizando sonda de DNA para avaliação da prevalência de *C. rectus* em pacientes com periodontite avançada encontraram a presença deste microrganismo em 90% das amostras, confirmado pelo nosso estudo. Isso provavelmente ocorreu pelo fato da sonda de DNA ser uma técnica mais sensível que a cultura para a detecção de microrganismos, aproximando-se da PCR (Steenbergen, 1996; Garcia et al., 1998). Slots et al. (1995) utilizando também a PCR encontraram uma prevalência menor (63,9%) de *C. rectus* em pacientes com periodontite avançada. Resultados estes semelhantes aos de Ashimoto et al. (1996) que também utilizando a PCR encontraram uma prevalência de 74%.

Em 2002, Ávila-Campos & Veásquez-Meléndez avaliaram através da PCR a presença de *C. rectus* em saúde e doença periodontal de 100 indivíduos (50 com saúde e 50 com doença) e encontraram resultados semelhantes aos nossos somente em casos de periodontite, mas como nos trabalhos anteriores, encontrou baixa prevalência em periodonto sadio, o que não se confirma em nossos resultados.

No periimplante saudável de pacientes com história de periodontite, Mombelli et al. (1995) utilizando cultura encontraram uma prevalência de 1,2% de *C. rectus* três meses após a ativação do implante. Essa baixa prevalência, como já citada anteriormente, provavelmente se deve ao método de diagnóstico. Outra diferença do nosso estudo foi o tempo avaliado, pois nós observamos pacientes com implantes de um a três anos de ativação. No trabalho de periimplantite induzida em cães, Shibli et al. (2003) não detectaram a presença de *C. rectus*, porém esse

estudo também utilizou cultura e a análise foi realizada em no máximo 60 dias após a instalação dos transmucosos.

Outro bastonete Gram-negativo estudado, *P. gingivalis* é um periodontopatógeno relacionado fortemente com a periodontite crônica. Além disso, sua concentração no sulco gengival está diretamente relacionada ao estágio da doença periodontal, como relatado por Kawada et al. (2004). Soder et al. (1993) encontraram uma prevalência de 95% de *P. gingivalis* em sulcos periodontais de pacientes com periodontite avançada, resultados compatíveis com os obtidos por Slots et al. (1995) que encontraram uma prevalência de 84,5% avaliando também indivíduos com periodontite avançada. Apesar de o primeiro trabalho utilizar sonda de DNA e o segundo a PCR, os resultados foram semelhantes. Em contrapartida, nosso estudo encontrou uma prevalência de 59,9% de *P. gingivalis* em pacientes com periodontite crônica. Pelo perfil clínico dos nossos pacientes, eles se encontram classificados como periodontite crônica de moderada a avançada. Como a população estudada por Slots et al. (1995) e Sanders et al. (1993) foram indivíduos exclusivamente com periodontite avançada, isso pode explicar a diferença encontrada. Assim como o estudo de Dogan et al. (2003) que apresentou uma prevalência de 90% .

Quando comparado com resultados de Ashimoto et al. (1996) que também analisaram indivíduos com periodontite crônica, sem especificar indivíduos com quadro avançado através da PCR, os resultados foram semelhantes aos nossos com uma prevalência de 58%. Outro estudo que apresentou essa paridade de resultados com os nossos, apesar de realizar diagnóstico através de sonda de DNA, foi o de Garcia et al. (1998).

Lee et al. (1999) utilizando sonda de DNA analisaram a presença de periodontopatógenos em sulcos periimplantares saudáveis e encontraram uma prevalência de 16% de *P. gingivalis* após um ano de instalação da prótese, ligeiramente superior a encontrada em nosso estudo (9,09%), porém, os periimplantes analisados eram de pacientes com história de doença periodontal. A título de curiosidade, uma baixa detecção desse microrganismo foi observada nos primeiros meses de instalação do elemento protético. Fato este confirmado pelo trabalho de Shibli et al. (2003) sobre periimplantite induzida em cães que detectaram através de cultura, ausência de *P. gingivalis* no momento da instalação da prótese. Após 60 dias com periimplantite, observou uma prevalência de 29,3%. Dados esses que não podem ser comparados ao nosso estudo pela divergência de modelos experimentais.

Houve uma grande prevalência de *P. gingivalis* na periimplantite em nosso estudo (86,36%). Esse fato comprova a grande importância deste microrganismo na patogenia da doença periimplantar. Trabalhos na literatura como o de Shibli et al. (2008), também encontraram uma grande proporção deste periodontopatógeno em indivíduos com doença periimplantar.

O grande mérito do nosso trabalho foi a possibilidade de realizar uma comparação direta entre periimplantite, periodontite; periodonto e periimplante saudáveis em indivíduos selecionados dentro de um mesmo critério de inclusão e exclusão, o que não encontramos na literatura até o momento. Assim, demonstramos que *A. actinomycetemcomitans* tem uma prevalência semelhante entre todos os grupos estudados, como era esperado, já que a literatura nos mostra uma prevalência baixa desse microrganismo em caso de saúde e doença periimplantar ou periodontal, exceto na periodontite agressiva (Cortelli et al., 2002;

Ávila-Campos, Veásques-Meléndez, 2002, Cortelli et al., 2002; Cortelli et al., 2003), que não foi objeto de nosso estudo, já que a literatura comprova uma similaridade entre a periimplantite e a periodontite crônica.

Em contrapartida, *C. rectus* e *P. gingivalis*, microrganismos periodontopatogênicos relacionados à periodontite crônica (Dogan et al., 2003), foram encontrados também em grande prevalência na periimplantite, sendo que nesta, *P. gingivalis* apresentou maior prevalência que na periodontite. O curioso em nosso trabalho foi a presença, em grande parte dos indivíduos estudados, de *C. rectus* tanto em estados de saúde como em doença, o que clinicamente não apresenta grande relevância já que esse microrganismo possui uma patogenicidade intermediária (Yokoyama et al., 2008).

Poucos trabalhos na literatura relatam a prevalência de microrganismos na periimplantite, essa dificuldade deve-se ao fato de que, apesar de os implantes dentários terem surgido na década de 60, somente a partir de meados dos anos 80 (Branemark et al., 1985) começaram a ser utilizados clinicamente, sendo largamente empregado apenas nos anos 90, ou seja, a menos de vinte anos. Outro fator importante, é que como o custo dos implantes dentários continua relativamente alto, o acesso da população a esse tipo de tratamento, portanto, é limitado. Levando em consideração que a aderência celular ao redor do implante através de hemidesmossomas, segundo Heuer et al. (2007) reduz o risco de formação de bolsa periimplantar, a prevalência desta doença é baixa, em torno de 8,9% (Ferreira et al., 2006), o que torna extremamente difícil estudar esta enfermidade.

A partir disso, sugerimos o desenvolvimento de um maior número de estudos, talvez multicêntricos a respeito da microbiota relacionada à periimplantite,

para que possamos utilizar implantes dentários com maior previsibilidade no dia a dia da clínica.

## 7 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados podemos concluir que:

- a) o microrganismo *campylobacter rectus* possui grande prevalência na periimplantite, periodontite crônica, periodonto saudável e periimplante saudável, sendo significativamente menos prevalente neste último;
- b) *porphyromonas gingivalis* apresenta mais prevalência na periimplantite que na periodontite, demonstrando uma pequena prevalência em casos de saúde;
- c) *aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um periodontopatógeno de baixa prevalência em indivíduos com periodontite crônica, periimplantite, saúde periodontal e periimplantar;
- d) a periimplantite parece ser mais dependente da presença de periodontopatógenos que a periodontite.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981;10(6):387-416.
- Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol.* 1999;70(1):13-29.
- Albrektsson TO, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontol 2000.* 1994;4:58-73.
- Alcoforado GA, Kristoffersen T, Johannessen AC, Nilsen R. The composition of gingival inflammatory cell infiltrates in children studied by enzyme histochemistry. *J Clin Periodontol.* 1990;17(6):335-40.
- Aloufi F, Bissada N, Ficara A, Faddoul F, Al-Zahrani MS. Clinical Assessment of Peri-Implant Tissues in Patients with Varying Severity of Chronic Periodontitis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2008 Apr 10.
- American Academy of Periodontology. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.
- Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res.* 1989;24(2):96-105.
- Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, et al., Reproducibility of probing depth measurements using a constant - force electronic probe: analysis of inter - and intraexaminer variability. *J Periodontol.* 2003;74(9):1736-40.
- Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S *et al.*, Outer membrane protein100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol.* 2003;50(4):1125-39.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11(4):266-73.
- Avila-Campos MJ, Velasquez-Melendez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44(1):1-5.
- Branemark P-I, Zarb GA, Albrektson T (eds). *Tissue-Integrated Protheses: Osseointegration in Clinical Dentistry.* Chicago: Quintessence, 1985.

---

<sup>1</sup> De acordo com o Manual de Normalização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-Graduação CPO São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2007, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Calabrese N, Galgut P, Mordan N. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* within human dental calculus: a pilot investigation. J Int Acad Periodontol. 2007;9(4):118-28.

Cortelli SC, Cortelli JR, Nascimento LFC, Jorge AOC. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in moderate and advanced periodontitis. PGR Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000;3(1):30-6.

Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. Pesqui Odontol Bras. 2003;17(2): 83-8.

Cortelli SC, Feres M, Rodrigues AA, Aquino DR, Shibli JA, Cortelli JR. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. J Periodontol. 2005;76(2):204-9.

Cortelli JR, Cortelli SC, Pallos D, Jorge AOC. Prevalência de periodontite agressiva em adolescentes e adultos jovens. Pesqui Odontol Bras. 2002;16(2):163-8.

Cortelli JR, Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, Carvalho-Filho J, Franco GCN et al. An etiological study analyzing initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. J Clin Microb. 2008;20:2051-7.

Danser MM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J, Loos BG, van der Velden U. Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. J Clin Periodontol. 1994;21(7):484-9.

Danser MM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J, van der Velden U. Putative periodontal pathogens colonizing oral mucous membranes in denture-wearing subjects with a past history of periodontitis. J Clin Periodontol. 1995;22(11):854-9.

Danser MM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants. J Periodontol. 1997;68(3):209-16.

De Boever AL, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. Clin Oral Implants Res. 2006;17(1):8-17.

Devides SL, Franco AT. Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006;21(2):262-9.

Doğan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. J Periodontol. 2003;74(6):803-14.

Doğan B, Kipalev AS, Okte E, Sultan N, Asikainen SE. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. J Periodontol. 2008;79(2):307-15.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. Eur J Oral Sci. 1998;106(3):721-64.



Étienne J. *Biologia molecular*. In: Étienne, J. *Bioquímica Genética e Biologia Molecular*. 6a ed. São Paulo: Santos; 2003.

Fardal O, Johannessen AC, Olsen I. Severe, rapidly progressing peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 1999;26(5):313-7.

Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol*. 2006;33(12):929-35.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3859-69.

Fiorellini JP, Martuscelli G, Weber HP. Longitudinal studies of implant systems. *Periodontol 2000*. 1998;17:125-31.

Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. 1996;67(4):291-7.

Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(4):501-8.

García L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromona gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodontal Res*. 1998;33(1):59-64.

Gmür R, Guggenheim B. Interdental supragingival plaque--a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res*. 1994;73(8):1421-8.

Gusberti FA, Gada TG, Lang NP, Geering AH. Cultivable microflora of plaque from full denture bases and adjacent palatal mucosa. *J Biol Buccale*. 1985;13(3):227-36.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.

Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird PS, Palmer J, Seymour GJ. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. *J Clin Periodontol*. 2001;28(12):1163-71.

Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(6):912-22.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. 2001;80(6):1580-3.

Haubek D, Westergaard J. Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. *Int J Paediatr Dent*. 2004;14(1):41-8.

Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, Stiesch-Scholz M. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil.* 2007;34(5):377-82.

Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, Sogawa CA, Asaumi J, Koikeguchi S et al. Biofilm formation by a fimbriae- deficient mutant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol Immunol.* 2003;47(11):877-81.

Jansson H, Hamberg K, De Bruyn H, Bratthall G. Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2005;7(1):51-9.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J Periodontol.* 1994;65(11):1073-8.

Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T, Oho T, Koga T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(5):289-92.

Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE et al. Diversity of bacterial of populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):558-63.

Kim SJ, Park YH, Hong SP, Cho BO, Park JW, Kim SG. The presence of bacteria in the synovial fluid of the temporomandibular joint and significance: preliminary. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(10):1156-6.

Kolodrubetz D, Kraig E. Transposon Tn5 mutagenesis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via conjugation. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9(5):290-6.

Kolodrubetz D. Molecular Genetics and the Analysis of leukotoxin in *A. actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* 1996;67(4):309-16.

Kulekci G, Leblebicioglu B, Keskin F, Ciftci S, Badur S. Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontally healthy children. *Anaerobe.* 2008;14(1):49-54.

Kuroe A, Taniguchi A, Sekiguchi A, Ogura M, Murayama Y, Nishimura F et al. Prevalence bacterial infection in non-obese Japan type 2 diabetic patients: relationship with C-reactive protein and albuminuria. *Horm Metab Res.* 2004;36(2):116-8.

Lally ET, Kieba IR, Demuth DR, Rosenbloom J, Golub EE, Taichman NS et al. Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Feb 28;159(1):256-62.

Lally ET, Golub EE, Kieba IR, Taichman NS, Decker S, Berthold P, Gibson CW, Demuth DR, Rosenbloom J. Structure and function of the B and D genes of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin complex. *Microb Pathog.* 1991 Aug;11(2):111-21.

Lee JY, Sojar HT, Bedi GS, Genco RJ. Synthetic peptides analogous to the fimbriin sequence inhibit adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 1992 Apr;60(4):1662-70.

Lee KH, Tanner AC, Maiden MF, Weber HP. Pre- and post-implantation microbiota of the tongue, teeth, and newly placed implants. *J Clin Periodontol*. 1999;26(12):822-32.

Lee KH, Maiden MF, Tanner AC, Weber HP. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *J Periodontol*. 1999;70(2):131-8.

Leitão JA, De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ, Sendyk WR. Analysis of the presence of pathogens which predict the risk of disease at peri-implant sites through polymerase chain reaction (PCR). *Braz Oral Res*. 2005;19(1):52-7.

Leonhardt A, Adolfsson B, Lekholm U, Wikström M, Dahlén G. A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 1993;4(3):113-20.

Leonhardt A, Bergström C, Lekholm U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003;5(4):226-32.

Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol*. 1999;70(4):431-7.

López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(6):948-54.

López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2002;73(8): 911-24.

Macuch PJ, Tanner AC. *Campylobacter* species in health, gingivitis, and periodontitis. *J Dent Res*. 2000;79(2):785-92.

Malmstrom HS, Fritz ME, Timmis DP, Van Dyke TE. Osseo-integrated implant treatment of a patient with rapidly progressive periodontitis. A case report. *J Periodontol*. 1990;61(5):300-4.

Makiura N, Ojima M, Kou Y, Furuta N, Okahashi N, Shizukuishi S, Amano A. Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(4):348-51.

Mengel R, Flores-de-Jacoby L. Implants in patients treated for generalized aggressive and chronic periodontitis: a 3-year prospective longitudinal study. *J Periodontol*. 2005;76(4):534-43.

Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*. 1987;2(4):145-51.

Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbiol Immunol*. 1988;3(3):113-20.

Mombelli A, Lang NP. Microbial aspects of implant dentistry. *Periodontol* 2000. 1994;4:74-80.

Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1995;22(2):124-30.

Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998;17:63-76.

Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:66-77.

Müller HP, Heinecke A. Clinical effects of scaling and root planing in adults infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clin Oral Investig*. 2004;8(2):63-9.

Nakou M, Mikx FH, Oosterwaal PJ, Kruijssen JC. Early microbial colonization of permucosal implants in edentulous patients. *J Dent Res*. 1987;66(11):1654-7.

Nevins M, Langer B. The successful use of osseointegrated implants for the treatment of the recalcitrant periodontal patient. *J Periodontol*. 1995;66(2):150-7.

Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun*. 1997 May;65(5):1980-4.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*. 2005;76(9):1542-9.

Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology* 2000. 2003;32:11-23.

Okuda K, Takazoe I. Immunological study of pili of *Bacteroides melaninogenicus*. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1974;19(1):93-8.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976;34(4):235-49.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001 June;183(12):3770-83.

Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Feb;10(2):98-118.

Poulsen K, Ennibi OK, Haubek D. Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4829-32.

Pongnarisorn NJ, Gemmell E, Tan AE, Henry PJ, Marshall RI, Seymour GJ. Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Feb;18(1):114-25.

Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999;283(5409):1837-9.

Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. *Clin Oral Implants Res*. 1990;1(1):8-12.

- Quirynen M, Papaioannou W, van Steenberghe D. Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces. *J Periodontol.* 1996; 67(10):986-93.
- Rabel A, Köhler SG. Microbiological study on the prognosis of immediate implant and periodontal disease. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2006;10(1):7-13.
- Rêgo RO, Spolidorio DM, Salvador SL, Cirelli JA. Transmission of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* between Brazilian women with severe chronic periodontitis and their children. *Braz Dent J.* 2007;18(3):220-4.
- Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, Adams DF. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Periodontol.* 1996;67(2):109-15.
- Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(3):135-44.
- Rupani D, Izano EA, Schreiner HC, Fine DH, Kaplan JB. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype f O-polysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(2):127-30.
- Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhälä L, Lai CH, Jousimies-Somer H. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7(5):277-9.
- Samaranayake LP. Lactobacilli. In: *Essential microbiology for dentistry.* China: Churchill Livingstone; 1998.
- Savitt ED, Darack AP, Killoy WJ, Lieberman MG. Site selection criteria for microbiological testing of periodontal microorganisms. *J Periodontol.* 1991;62(9):558-61.
- Savitt ED, Socransky SS. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J Periodontol Res.* 1984;19(2):111-23.
- Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Feb;20(2):169-74.
- Seymour GJ, Greenspan JS. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodont Res.* 1979;14(1):39-46.
- Shah HN, Collins MD. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani e Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *Int J Syst Bacteriol.* 1989;39(1):85-7.
- Shibli JA, Martins MC, Lotufo RF, Marcantonio E Jr. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(3):383-90.
- Shibli JA, Vitussi TR, Garcia RV, Zenóbio EG, Ota-Tsuzuki C, Cassoni A, Piattelli A, d'Avila S. Implant surface analysis and microbiologic evaluation of failed implants retrieved from smokers. *J Oral Implantol.* 2007;33(4):232-8.

- Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):975-82.
- Slots J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res.* 1977;85(4):247-54.
- Slots J, Zambon JJ, Rosling BG, Reynolds HS, Christersson LA, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. *J Periodontal Res.* 1982;17(5):447-8.
- Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* 1995;20 Suppl 2:S304-7.
- Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 1989;62(5):567-72.
- Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical Periodontology and implant dentistry.* Copenhagen: Munksgaard; 1997.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000.* 2002;28:12-55.
- Söder PO, Jin LJ, Söder B. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1993;101(6):363-70.
- Sordyl CM, Simons AM, Molinari JA. The microbial flora associated with stable endosseous implants. *J Oral Implantol.* 1995;21(1):19-22.
- Steenbergen TJ, Timmerman MF, Mikx FH, de Quincey G, van der Weijden GA, van der Velden U, de Graaff J. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. *J Clin Periodontol.* 1996;23(10):955-9.
- Sumida S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(5):696-702.
- Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol.* 2003;74(10):1460-9.
- Tan KS, Woo CH, Ong G, Song KP. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *J Clin Periodontol.* 2001;28(9):886-90.
- Tanner AC, Dzink JL, Ebersole JL, Socransky SS. *Wolinella recta*, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis*, and *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. *J Periodontal Res.* 1987;22(4):327-30.
- Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):85-98.
- Tonetti MS, Schmid J. Pathogenesis of implant failures. *Periodontol 2000.* 1994;4:127-38.

Tong KS, Zee KY, Lee DH, Corbet EF. Clinical responses to mechanical periodontal treatment in Chinese chronic periodontitis patients with and without *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontol. 2003 Nov;74(11):1582-8.

Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Loos BG. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. J Clin Periodontol. 2003;30(7):603-10.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol. 2000;27(10):722-32.

Yokoyama M, Hinode D, Yoshioka M, Fukui M, Tanabe S, Grenier D, Ito HO. Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(1):55-9.

Yoshimura F, Takasawa T, Yoneyama M, Yamaguchi T, Shiokawa H, Suzuki T. Fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*: physical, chemical, and immunological properties. J Bacteriol. 1985 Aug;163(2):730-4.

Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol. 1983;54(12):707-11.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol. 1985;12(1):1-20.

Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. Ann Periodontol. 1996;1(1):879-925.

## APÊNDICE A - CARTA DE INFORMAÇÃO

### CARTA DE INFORMAÇÃO

Caro participante,

A doença periodontal é aquela doença que acontece na gengiva deixando os dentes moles sem formar cavidade. A doença de gengiva também causa mau hálito (cheiro ruim na boca) e sangramento ao escovar os dentes, comer ou dormir. A placa dental (massa branca e mole) e o tártaro (massa dura) que provocam a doença de gengiva são formados por muitas bactérias. Da mesma forma, quem possui implantes dentários está sujeito a doenças semelhantes. Esse estudo chamado “**Análise comparativa da prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campilobacter rectus* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes com doença periimplantar ou periodontal**”, quer verificar a presença de alguns desses microrganismos encontrados na boca de pessoas com doença de gengiva e comparar a participação deles na doença que ocorre ao redor de implantes.

Para o estudo é necessário coletar um pouco de material da boca com uma ponta de papel e o exame não causa dor ou incômodo. Não existe risco de você se machucar participando deste estudo.

Todas as pessoas que participarem do estudo receberão tratamento para os problemas de gengiva. Se a pessoa precisar de outros tratamentos como canal ou obturação, ela será encaminhada para as outras disciplinas do Departamento de Odontologia da UNITAU. Em caso de tratamento que exige serviço de terceiros, como confecção de próteses, cada professor responsável, junto com a Assistente Social, irão estabelecer os valores e o número de vezes para efetuar o pagamento do mesmo.

Caso o participante queira deixar o estudo, mesmo com a desistência, continuará recebendo o tratamento. Será necessário fazer a comunicação ao dentista.

Cada participante receberá seu exame individualmente, respeitando a privacidade de cada um, no entanto, os resultados dos seus exames serão avaliados junto com os resultados dos outros participantes.

Como pesquisadores responsáveis pelo estudo, estaremos sempre à disposição para responder a qualquer dúvida.

Procure a Clínica de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da UNITAU - Rua Expedicionário Ernesto Pereira, nº 110 - Centro - Taubaté - SP - (012) 3225-4147.

Atenciosamente,

Pesquisadores responsáveis:

Profa. Dra. Vera Cavalcanti Araújo

Rogério de Lima Romeiro



**APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_, residente à \_\_\_\_\_, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Análise comparativa da prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes com doença periimplantar ou periodontal**”. Discuti com o pesquisador Rogério de Lima Romeiro sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Taubaté, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente/Representante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

## APÊNDICE C - FICHA DE ANAMNESE

### FICHA DE ANAMNESE

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Número: \_\_\_\_\_

R.G.: \_\_\_\_\_ C.P.F.: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Gênero: ( ) Feminino ( ) Masculino

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Fone: ( ) \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Há quanto tempo foi a sua última consulta médica? \_\_\_\_\_

Qual o motivo? \_\_\_\_\_ Médico: \_\_\_\_\_

No momento está fazendo algum tratamento médico? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Está tomando algum medicamento? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

NOME	DOSAGEM	TEMPO DE USO

Possui sensibilidade a algum anestésico ou alergia a algum medicamento?

( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Pressão arterial: \_\_\_\_\_

Fuma? ( ) Sim ( ) Não Quantidade (Cigarros/dia): \_\_\_\_\_ Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Ex-fumante? \_\_\_\_\_ Quanto tempo fumou? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

Está grávida? ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_ Toma anticoncepcional? \_\_\_\_\_

Está na menopausa? \_\_\_\_\_ A quanto tempo? \_\_\_\_\_ Faz reposição hormonal? \_\_\_\_\_

Possui alguma outra alteração hormonal? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Faz tratamento? \_\_\_\_\_ Possui ciclo menstrual regulado? \_\_\_\_\_

Usa fio dental? Sim ( ) Não ( ) Quantas vezes você escova os dentes por dia? \_\_\_\_\_

Você já passou por um tratamento periodontal? ( ) Sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÕES:**

---



---



---



---

### APÊNDICE D- FICHA DE AVALIAÇÃO PERIODONTAL

The image shows a grid-based form for dental periodontal evaluation. It consists of approximately 10 columns and 15 rows. The columns are labeled with tooth numbers and quadrants, such as 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. The rows are labeled with different parameters to be measured, including: 1. Perímetro (mm) - 2. Índice de Sangramento (mm) - 3. Índice de Placa (mm) - 4. Índice de Inflamação (mm) - 5. Índice de Recção (mm) - 6. Índice de Recao (mm) - 7. Índice de Recao (mm) - 8. Índice de Recao (mm) - 9. Índice de Recao (mm) - 10. Índice de Recao (mm) - 11. Índice de Recao (mm) - 12. Índice de Recao (mm) - 13. Índice de Recao (mm) - 14. Índice de Recao (mm) - 15. Índice de Recao (mm). The form is designed for recording clinical measurements for each tooth.

## ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



*São Leopoldo Mandic*  
*Faculdade de Odontologia*  
*Centro de Pesquisas Odontológicas*  
**Certificado de Cumprimento de Princípios Éticos**

CERTIFICO que, após analisar o projeto de pesquisa

**Título** *Análise comparativa da prevalência de Aggregatibacter actinomycetemcomitans em pacientes com doença Periimplantar e Periodontal.*

**Pesquisador principal:** Rogério de Lima Romeiro

**Orientador:** Vera Cavalcanti de Araújo

**Data Avaliação:** 24/9/2008

o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic considerou que o projeto está de acordo com as diretrizes para a proteção do sujeito de pesquisa, estabelecidas pela Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

*Campinas, SP, Brazil, quarta-feira, 24 de setembro de 2008*

-----  
**CERTIFICATION OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES**

I hereby, certify that upon analysis of the Research Project,

**Title:** Comparative analysis of the predominance of Aggregatibacter actinomycetemcomitans in patients with Periimplantar and Periodontal disease.

**Main Researcher(Author):** Rogério de Lima Romeiro

**Advisor:** Vera Cavalcanti de Araújo

the Committee of Ethics for Research of São Leopoldo Mandic School of Dentistry and Research Center, has considered the mentioned project to be in accordance to the guidelines of protection to the subject of the research, established by the Regulation number 196/96, from the National Health Council of the Brazilian Health Ministry.

**Prof. Dr. Thomaz Wassall**  
**Coordenador de Pós-Graduação**