LEANDRO DE MELO

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, CLÍNICA E DA MATRIZ METALOPROTEINASE – 8 (MMP-8) NA PERI-IMPLANTITE

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

1º Orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli
2º Orientador: Profª Drª Magda Feres

Guarulhos
2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jamil Awad Shibli _____

Prof. Dr. Elton Gonçalves Zenóbio _____

Prof[a] Dr[a] Luciene Cristina de Figueiredo _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Ariovaldo de Melo Filho, que dispensa comentários não só por suas realizações de sucesso e sua sabedoria, mas pelo exemplo de pai, homem e irmão que tenho em minha casa onde me orgulho e não me canso de dizer o quanto-o amo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pela saúde que me presenteia todos os dias da minha vida;e à ele minha eterna gratidão;

Aos meus pais que me deram à oportunidade de chegar até aqui, razão pela qual me esforço para não decepciona-los, e hoje, mais uma vez, meu sincero muito obrigado;

A Jackie, mulher forte que acompanha nossos passos e não desiste de nos apoiar diante das ousadias e batalhas que a vida nos proporciona;

A minha irmã Letícia, que mesmo distante das minhas conquistas, torce por elas e a recíproca é verdadeira;

A minha namorada Ana Maria pelo incentivo e compreensão na reta final da realização deste trabalho;

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Jamil Awad Shibli que não mediu esforços em passar seus conhecimentos clínicos e científicos aos alunos, certo de sua responsabilidade diante da árdua profissão e sua influência no crescimento intelectual de cada um;

A minha co-orientadora, Profª Drª Magda Feres, pela dedicação e empenho na função acadêmica e principalmente, pelo entusiasmo científico.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do mestrado acadêmico em Odontologia, Profª. Dra. Magda Feres, Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, Profa. Dra. Sheila C. Cortelli, Prof. Dra. Cristiane M. Amaral, Prof. Dr. Saulo Geraldelli, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, pelos ensinamentos transmitidos e pelos exemplos, dando uma importante colaboração em meus passos, rumo ao crescimento científico e profissional;

À Profa. Dra. Luciene de Figueiredo e Prof. Dra. Sheila Cortelli em especial por colaborarem não só na realização deste trabalho, mas por despertarem a necessidade de se buscar cada vez mais os conhecimentos científicos;

À Coordenadora do Curso de Odontologia da Universidade Guarulhos, Prof. Dra. Márcia Motta, pelo auxílio e competência nas sugestões dadas durante o exame de qualificação;

Aos meus colegas de curso, com os quais dividi esta caminhada, e que puderam compartilhar em nosso convívio seus conhecimentos e aqui em especial ao meu amigo Marcelo de Faveri, valeu mesmo;

Ao meu amigo Daniel Sanches Ferrari, pela presteza e disposição na realização de parte deste trabalho, meu muito obrigado;

A todos os meus amigos, principalmente a turma do tênis de “domingo” que durante toda a trajetória, entenderam como era importante para mim esta conquista e souberam compreender as minhas ausências;

Ao meu sócio Dr. Hélio Chagas Mendes, nossas auxiliares e nossos clientes por apoiarem e entenderem o quão importante é esta conquista para todos nós;

À Universidade Guarulhos pela preocupação em oferecer aos professores e alunos deste curso condições dignas de se realizar este trabalho e dar um importante passo rumo ao crescimento científico e profissional;

Aos funcionários da clínica, do CEPPE e de uma maneira geral a todos que colaboram com os alunos da pós-graduação desta universidade;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa Processo 03/05023-7.

Aos pacientes e aos voluntários que participaram de forma importantíssima para a realização deste trabalho. A todos, o meu muito obrigado!

RESUMO

Este estudo caso-controle comparou a microbiota, variáveis clínicas e imunológica da peri-implantite. Foram selecionados 44 indivíduos (média de idade de 48,9±13,51 anos) portadores de pelo menos uma prótese implanto-suportada há no mínimo 1 ano sob função, divididos em 2 grupos: peri-implantite (*n*=22) definido pela presença de lesão óssea radiográfica ≥ 3mm em forma de taça, sangramento à sondagem e/ou supuração; e grupo controle (*n*=22) – portadores de implantes saudáveis. Índice de placa, sangramento marginal, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, supuração e nível clínico de inserção foram avaliados em 6 sítios/implante. Amostras microbiológicas de biofilme supra- e subgengivais foram coletadas e analisadas para 38 bactérias utilizando *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization*. Amostras imunológicas foram obtidas do fluido peri-implantar e avaliadas para a concentração de matriz metaloproteinase-8 (MMP-8). Todos os parâmetros clínicos avaliados estavam estatisticamente aumentados no grupo teste em relação ao grupo controle, com exceção do índice de placa. A contagem de bactérias do complexo vermelho tais como *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Tanerella forsythensis* foi significativamente maior no grupo peri-implantite tanto para o biofilme supra- quanto para o biofilme subgengival ($p<0,001$). Todas as espécies detectadas no biofilme subgengival estavam presentes no biofilme supragengival. Houve uma forte correlação na presença ou ausência de *P. intermedia* e *P. gingivalis* no biofilme supra- e subgengival do mesmo implante de pacientes doentes. A concentração de MMP-8 foi estatisticamente maior nos pacientes do grupo teste ($p<0,0001$) e fortemente associada a espécies do complexo vermelho. Com base nestes dados conclui-se que as principais diferenças entre o grupo teste e controle foi o aumento das proporções e contagens de algumas espécies de bactérias dos complexos laranja e vermelho no biofilme supra- e subgengival e que há uma maior concentração de MMP-8 na peri-implantite.

Palavras-chave: Implantes osseointegrados, peri-implantite, MMP-8, microbiota

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the microbiological, clinical and immunological parameters of peri-implantitis. A total of 44 subjects (mean age 48.9±13.51 years) that present implant restored and in function for at least 1 year were divided in 2 groups: peri-implantitis (*n*=22) characterized as peri-implant sites with radiographical defects with a saucer shape ≥3mm, and bleending on probing; and control group (*n*=22) – subjects with health implants. Clinical assessment including dichotomous measures of gingival redness, plaque index, bleending on probing and suppuration as well as calibrated measurements of probing depth and, clinical attachment level were made at 6 sites per implant. Supra- and subgengival samples were taken separately and analysed for 38 microorganisms by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. The level of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) in peri-implant crevicular fluid were also evaluated. All clinical parameteres were statistically higher in diseased implants, with exception of plaque index. The total count of microorganism of red complex as *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola,* and *Tanerella forsythensis* were higher in the peri-implantitis for both supra- and subgengival biofilms ($p<0,001$). All the microorganism detected in subgengival biofilm were present in supragengival biofilm. The presence or absent of *P. gingivalis* and *P. intermedia* in supragingival biofilm presented higher correlation with the presence or absent of the same species in subgengival biofilm. MMP-8 presented higher levels at diseased sites ($p<0,0001$) as well as strongest correlation with microorganisms of red complex. The data of the present study showed a significant difference between supra- and sungengival biofilm of health and diseased implants. The total counts of some microorganism of red and orange complexes as well as the levels of MMP-8 were higher in supra- and subgengival biofilms of diseased implants.

Key-words: Dental implants, microbiota, peri-implantitis, MMP-8.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....01

1.1. Métodos para avaliação da composição do biofilme bacteriano.....02

1.2. Microbiota relacionada aos implantes osseointegrados.....04

1.3. Avaliação do fluido crevicular peri-implantar.....10

2. PROPOSIÇÃO.....12

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....13

3.1. Seleção dos indivíduos.....13

3.2. Critérios de Inclusão dos indivíduos envolvidos no estudo.....13

3.3. Inclusão dos implantes saudáveis e com peri-implantite.....14

3.4. Delineamento do estudo.....14

3.4.1. Seleção do sítio peri-implantar.....14

3.4.2. Seqüência da consulta de avaliação.....14

3.5. Exame clínico e radiográfico.....15

3.6. Análise da presença de MMP-8.....16

3.6.1. Coleta das amostras imunológicas.....16

3.6.2. Processamento das amostras imunológicas.....17

3.7. Avaliação microbiológica.....17

3.7.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento.....17

3.7.2. Isolamento do DNA e preparo das sondas.....18

3.7.3. Coleta das amostras de biofilme supra- e subgengival.....19

3.7.4. Checkerboard DNA-DNA hybridization.....19

3.7.4.1. Hibridização DNA-DNA.....19

3.7.4.2. Detecção das espécies.....21

3.8. Análise estatística.....25

3.8.1. Avaliação clínica.....25

3.8.2. Avaliação microbiológica.....25

3.8.3. Avaliação imunológica.....26

3.8.4.Correlação entre os achados clínicos, microbiológicos e imunológicos.....26

4. RESULTADOS.....27

4.1. Perfil epidemiológico e clínico da população avaliada.....27

4.2. Resultados microbiológicos.....27

4.2.1. Biofilme supragengival.....27

4.2.2. Biofilme subgengival.....28

4.2.3. Comparação entre o biofilme supra- e subgengival.....29

4.2.4. Proporções microbianas nos biofilmes supra- e subgengival....30

4.2.5. Relação entre os parâmetros clínicos e o complexo vermelho..30

4.3. Resultados imunológicos.....38

4.4.Correlação entre os resultados clínicos, microbiológicos e imunológicos.....38

5. DISCUSSÃO.....40

6. CONCLUSÃO.....45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....46

1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O conceito de que microrganismos específicos atuam como agentes etiológicos da doença periodontal, resultando em perda óssea alveolar e perda de inserção é bem estabelecido e aceito (Socransky & Haffajee 1994; Zambon, 1996; Socransky *et al.*, 1998). As doenças peri-implantares também têm sido correlacionadas ao acúmulo e especificidade do biofilme bacteriano e conseqüente perda óssea alveolar (Mombelli *et al.,* 1987; Schou *et al.,* 1996; Shibli, 2000, Mombelli *et al.,* 2001; Rutar *et al.,* 2002; Shibli & Marcantonio 2002; Shibli *et al.,* 2002; Shibli *et al.,* 2003b,c; Shibli, 2003).

Peri-implantite é o termo que caracteriza a presença de reações inflamatórias que afetam os tecidos peri-implantares sob função, ou seja, após receberem a prótese implanto ou muco-implanto suportada. Os sinais variam desde uma inflamação restrita à mucosa peri-implantar (mucosite) até sangramento à sondagem, supuração, perda clínica de inserção e perda óssea em forma de taça observada radiograficamente (Mombelli 1999).

Estudos têm demonstrado que a microbiota presente no sulco/bolsa peri-implantar é semelhante à presente no sulco/bolsa periodontal (Mombelli *et al.,* 1995; Listgarten & Lai, 1999; Nociti *et al.,* 2001; Shibli, 2003). Avaliações microbiológicas tanto em pacientes reabilitados com implantes osseointegrados (Apse *et al.,* 1991; Aughthum & Conrads, 1997; Lee *et al.,* 1999; Listgarten & Lai, 1999; Hultin, 2001; Plagnat *et al.,* 2002; Shibli, 2003) quanto em modelos experimentais em animais (Schou *et al.,* 1996; Tillmanns *et al.,* 1997; Hanisch *et al.,* 1997; Eke *et al.,* 1998; Nociti *et al.,* 2001; Shibli *et al.,* 2003b,c), mostraram uma microbiota predominantemente de cocos facultativos Gram-positivos em condições de saúde peri-implantar. Nas condições de inflamação e/ou doença peri-implantar, patógenos como *Fusobacterium nucleatum, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus e Tannerella forsythensis* têm sido detectados (Rosemberg *et al.,* 1991; Tillmanns *et al.,* 1997; Listgarten & Lai, 1999; Leonhardt *et al.,* 1999; Mombelli *et al.,* 2001; Nociti *et al.,* 2001; Plagnat *et al.,* 2002; Shibli *et al.,* 2003b,c).

Alguns estudos observaram ainda que o nível de detecção destes patógenos difere em pacientes parcialmente ou totalmente edêntulos (Danser *et al.,* 1994; Danser *et al.,* 1997), sugerindo que os dentes remanescentes poderiam funcionar como reservatórios de periodotopatógenos para futura colonização dos tecidos peri-implantares (Leonhardt *et al.,* 1993; Mombelli *et al.,* 1995; Papaiaonnou *et al.,* 1996; Mombelli & Lang, 1998; Shibli, 2003).

Além da importância do biofilme subgengival, estudos do biofilme supragengival têm recebido especial atenção na Implantodontia, uma vez que patógenos periodontais como o *T. forsythensis, A. actinomycetemcomintans, C. rectus, Treponema denticola* e *P. gingivalis* têm sido detectados no biofilme supragengival de sítios periodontais saudáveis e doentes (Lai *et al.,* 1987; Asikainen *et al.,* 1991; Gmür & Guggenheim, 1994; Listgarten, 1999; Ximénez-Fyvie *et al.,* 2000a,b). Estes achados ressaltam o possível papel do biofilme supragengival na formação e desenvolvimento do biofilme subgengival, além de poder atuar como fonte para re-infecção e recolonização bacteriana pós-tratamento periodontal.

Entretanto, são escassos os estudos que avaliaram de forma sistemática a composição da microbiota supra- e subgengivais em implantes saudáveis e doentes.

1.1 – Métodos para avaliação da composição do biofilme bacteriano

Inúmeros métodos foram e têm sido utilizados para a identificação dos microrganismos bucais. As microscopias de contraste de fase e de campo escuro podem demonstrar diferenças de tamanho, forma e mobilidade dos microrganismos presentes no biofilme bacteriano. Porém, estes métodos microscópicos não diferenciam as espécies bacterianas (Loesche *et al.*, 1985; Beltrami *et al.*, 1987; Omar *et al.*, 1990; Furuichi *et al.*, 1997; Dahan *et al.*, 2004). A utilização do método de cultura, considerado um *gold standard*, é capaz de identificar diversos microrganismos presentes na placa bacteriana, além de ser extremamente importante para a busca de novas espécies e para a determinação da susceptibilidade microbiana à diferentes antibióticos (Newman & Socransky,1977; Ali *et al.,*1992; Lie *et al.*, 1995). Entretanto, a

maior parte dos estudos em periodontia e implantodontia que utilizaram métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico enfrentou uma série de limitações. O método de cultura bacteriana, por exemplo, possibilita a avaliação de um número limitado de amostras e espécies bacterianas devido ao fato de ser extremamente trabalhoso e custoso. Além disso, grande parte dos patógenos periodontais é anaeróbia estrita, bactérias difíceis de serem isoladas e cultivadas em meios de ágar.

Assim sendo, foram desenvolvidas técnicas imunológicas e de biologia molecular para diagnóstico microbiológico, como anticorpos monoclonais (Kamyia *et al.*, 1994; Graber et al., 1999; Booth & Lehner, 1997), oligonucleotídeos sintéticos, como os utilizados na "Reação em Cadeia da Polimerase"- PCR (Okada *et al.,* 2001) e sondas de DNA (Socransky *et al.*, 1994). O desenvolvimento destas tecnologias vem proporcionando um exame mais detalhado da composição do biofilme bacteriano supra- e subgengivais e uma avaliação mais eficaz do efeito de diversas terapias periodontais e peri-implantares, sobrepondo grande parte dos problemas relacionados à necessidade de cultivo dos microrganismos.

O método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi desenvolvido por Socransky *et al.* (1994) e utiliza sondas de DNA para a identificação de até 40 espécies bacterianas em 28 amostras de placa bacteriana por teste. Esta técnica permite a elaboração de estudos microbiológicos de grande porte em periodontia, por meio da avaliação de um grande número de amostras e de microrganismos orais. As maiores vantagens deste método de diagnóstico incluem a rápida identificação e a quantificação dos microrganismos presentes nas amostras, a identificação de bactérias difíceis de serem cultivadas e o baixo custo. Sendo assim, o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* tem sido utilizado com sucesso na avaliação sistemática dos efeitos de diversas terapias periodontais na composição da microbiota subgengival (Haffajee *et al.*, 1997a, b; Feres *et al.*, 1999; Cugini *et al.*, 2000; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000a; Feres *et al*., 2001; Carvalho *et al*., 2005). Um estudo realizado por Papapanou *et al*. em 1997 comparou a técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* com métodos de cultura. Foi observado por estes autores que tal metodologia

resultou em contagens bacterianas significativamente mais altas do que a cultura para a grande maioria das espécies testadas, como por exemplo *T. forsythensis, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis, P. gingivalis, P.intermedia* e *P. nigrescens*.

*O*s estudos que avaliaram a composição do biofilme bacteriano demonstraram haver uma grande variedade de microrganismos presentes neste ecossistema (Slots, 1977; Tanner *et al.*, 1977; Rosenberg *et al.*, 1981; Moore *et al.*, 1982; Moore *et al.*, 1983; Moore *et al*., 1987; Dzink *et* al., 1988; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky *et al*., 1998; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000b). Aqueles feitos com microscopia, tanto óptica quanto eletrônica, demonstraram existir uma seqüência no padrão de colonização das espécies bacterianas nas superfícies dentárias (Listgarten *et al.* 1978; Hinrichs *et al.*, 1984; Müller *et al.*, 1986). Outras investigações que utilizaram cultura bacteriana, métodos imunológicos ou sondas de DNA demonstraram que certas espécies freqüentemente ocorrem juntas no biofilme subgengival periodontal e peri-implantar (Gmur *et al.,* 1989; Sbordone *et al.,* 1990; Ali *et al.*, 1994; Socransky *et al.*, 1998; Lee *et al.* 1999; Salcetti *et al.* 1997; Quirynen *et al.*, 1994 ; Ramberg *et al.*, 2003).

Socransky *et al.* (1998) examinaram as relações existentes entre as espécies bacterianas na placa subgengival, utilizando o método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Foram avaliadas 13.261 amostras de placa subgengival e os autores demonstraram a existência de associações entre as espécies bacterianas estudadas, as quais foram agrupadas da seguinte forma: complexo vermelho, composto por *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*; complexo laranja, composto por subespécies de *F. nucleatum* (*F. nucleatum* ss *nucleatum*, *F. nucleatum* ss *polymorphum, F. nucleatum* ss *vincentii*), *F. periodonticum, P. intermedia*, *P. nigrescens, Micromonas micros, Campylobacter showae, C. rectus, Campylobacter gracilis, Eubacterium nodatum e Streptococcus constellatus*; complexo verde, formado por 3 espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena*), *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a; complexo amarelo, formado por espécies

de *Streptococcus* (*Streptococcus mitis, S. sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius*) e complexo roxo, composto de *A. odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Espécies como *Selenomonas noxia, A. actinomycetemcomitans* sorotipo b e *Actinomyces naeslundii* genospécie 2 não formaram complexos com outras espécies microbianas. Este mesmo estudo demonstrou, ainda, a existência de relações entre os complexos, de forma que, por exemplo, o complexo laranja precede a colonização do complexo vermelho. Também foram observadas as relações existentes entre certos complexos e aspectos clínicos da doença periodontal. Os parâmetros de profundidade à sondagem e sangramento à sondagem, por exemplo, mostraram relação direta com a presença das espécies do complexo vermelho e, em certa extensão, do complexo laranja.

1.2 – Microbiota relacionada aos implantes osseointegrados

Sendo a infecção bacteriana uma das razões primárias da falência dos implantes após a osseointegração, vários estudos observaram diferenças microbianas entre sítios peri-implantares clínica e radiograficamente sadios e sítios peri-implantares doentes. Além das diferenças nas características microbiológicas entre a saúde e a infecção dos implantes osseointegrados, serão comentadas as similaridades da peri-implantite com a periodontite.

A reação dos tecidos peri-implantares frente ao biofilme bacteriano é semelhante a observada nos tecidos periodontais. Fatores como: tipo e localização dos conectores protéticos, altura inadequada dos conectores e localização desfavorável do implante dificultam os procedimentos de higienização por parte do paciente podendo levar ao desenvolvimento das mucosites peri-implantares e/ou peri-implantites (Gatewood *et al.,*1993).

O tecido peri-implantar apresenta menos fibroblastos, uma maior quantidade de fibras colágenas, irrigação e vascularização sangüínea oriunda do plexo subjacente ao periósteo e orientação paralela do feixe de fibras gengivais quando comparado ao seu homólogo natural (Berglundh *et al.* 1994). Além desses fatores inerentes à histopatofisiologia do tecido peri-implantar, os implantes osseointegrados ainda podem diferir quanto ao formato ou

macroestrutura (rosqueáveis ou batidos; um ou dois estágios cirúrgicos), tipo de superfície ou microestrutura (titânio comercialmente puro, ligas de titânio, plasma *spray* de titânio, hidroxiapatita, superfícies jateadas com óxidos, tratadas com ácidos ou uma associação destas) e a rugosidade da superfície ou ultraestrutura (cristalinidade da hidroxiapatita que reveste o implante, tipo do ácido ou óxido utilizado). Todos estes fatores aqui listados podem ter uma influência significativa na composição da microbiota adjacente aos tecidos peri-implantares.

Além das diferenças entre implantes e dentes, a microbiota presente em implantes com saúde peri-implantar e implantes acometidos pela peri-implantite apresenta contrantes (Mombelli & Lang, 1998; Shibli 2003; Shibli *et al.,* 2003b). Para um completo entendimento da doença peri-implantar, tornam-se importante e imprescindível à obtenção de informações sobre a colonização de diferentes grupos de bactérias sobre diferentes tipos de implantes, os diferentes grupos de bactérias envolvidas na doença peri-implantar (Palmisano *et al.,* 1991) e a similaridade da resposta inflamatória peri-implantar com a doença periodontal (Talarico *et al.,* 1997).

Rams & Link (1983) e Rams *et al.* (1984) foram os primeiros a investigar a microbiota do sulco/bolsa peri-implantar. Rams *et al.* (1984) colhendo amostras de 17 implantes inseridos há no mínimo 6 meses, em 13 pacientes, valendo-se de microscópio de contraste de fase, observaram altos níveis de espiroquetas e bastonetes móveis em 3 implantes considerados perdidos. Esses dados foram ratificados por Holt & Newman (1986), que observaram por meio de cultura e contraste de fase uma grande quantidade de espiroquetas e *Bacteroides* sp. em implantes doentes. Ericsson & Lekholm (1986) observaram em implantes e dentes pilares de prótese, ambos clinicamente livres de inflamação, a presença de bacilos/cocos e bastonetes móveis, perfazendo 50 e 25% do total da contagem, respectivamente.

Comparando a microbiota associada a implantes sadios e implantes acometidos pela peri-implantite, Mombelli *et al.* (1987), utilizando microscópio de campo escuro e meios de cultura, encontraram, nos implantes com peri-implantite, uma microbiota complexa com grande proporção de anaeróbios

Gram-negativos. *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp. foram encontrados regularmente; espiroquetas e fusiformes assim como bastonetes móveis. Nos sítios sadios (controle) os autores observaram uma grande quantidade de cocos e uma pequena quantidade de bastonetes móveis e fusiformes. Espiroquetas não foram encontradas nesses sítios.

Mombelli *et al.* (1988), avaliando a ocorrência de shift bacteriano em conectores protéticos recém-colocados em pacientes edentados totais, utilizando microscópio de campo escuro e cultura bacteriana, observaram que a microbiota era similar à encontrada nos conectores que já estavam presentes na cavidade bucal. Dos microrganismos identificados 86% eram cocos e 80% dos microrganismos cultivados eram cocos facultativos Gram-positivos. *A. odontolyticus*, *Fusobacterium* spp. e espiroquetas pequenas foram observadas em um sítio considerado clinicamente doente. Nos implantes saudáveis não foi observada a presença de espiroquetas. *Bacteroides* spp. não foram encontrados com freqüência. Os autores concluíram que o shift bacteriano no sítio doente foi mais rápido quando comparado ao sítio saudável.

A microbiota associada a implantes cerâmicos de safira foi avaliada por Sanz *et al.* (1990). Utilizaram dentes com saúde e doença periodontal como grupos controle e implantes com e sem inflamação clínica do tecido peri-implantar como grupo teste. Os sítios doentes tanto em dentes quanto em implantes apresentaram uma grande quantidade de bastonetes anaeróbios Gram-negativos, *Bacteroides* spp. e bactérias que estavam se estabelecendo na superfície. Nos sítios sadios havia predominância de cocos facultativos Gram-positivos e bastonetes, sugerindo que a microbiota peri-implantar tinha composição semelhante à microbiota periodontal nas condições de saúde e doença.

Avaliando as condições clínicas e microbiológicas de 36 implantes acometidos pela peri-implantite, Becker *et al.* (1990) mostraram um aumento da mobilidade e presença de radiolucidez, notada radiograficamente, ao redor desses implantes. Utilizando sondas de DNA encontraram 37,5% de *P.gingivalis*, 35,4% de *P. intermedia* nos sítios peri-implantares, mas em concentrações moderadas; o *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em

27,8% dos sítios, mas em pequenas quantidades. Em outro estudo, analisando a microbiota de conectores protéticos de implantes sadios, Mombelli & Mericske-Stern (1990), por meio de cultura, observaram que 52,8% dos microrganismos cultivados eram cocos anaeróbios facultativos; 17,4% de bastonetes anaeróbios facultativos e 7,3% de bastonetes anaeróbios Gram-negativos. *Fusobacterium* spp. e *P. intermedia* perfaziam 8,8% das amostras enquanto espiroquetas e *P. gingivallis* não foram encontradas. Examinando a presença de patógenos periodontais em pacientes portadores de próteses implanto-suportadas ou muco-implanto-suportadas, Ong *et al.* (1992) e George *et al.* (1994), encontraram *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*. Ong *et al.* (1992), examinando pacientes que faziam uso de digluconato de clorexidina a 0,2% como enxaguatório bucal, encontraram além da saúde clínica do tecido peri-implantar, um maior número de sítios peri-implantares com anaeróbios. *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e a *P. gingivalis* foram encontradas em 1, 7 e 0 sítios, respectivamente, de um total de 37 sítios analisados.

Avaliando 98 implantes de 24 pacientes, George *et al.* (1994), mostraram que 62,5% dos pacientes possuíam um ou mais implantes colonizados pelo *A. actinomycetemcomitans* e/ou *P. intermedia/P. gingivalis*, enquanto, somente 37,5% não possuíam nenhum dos seus implantes colonizados por essas espécies. Sugeriram que esses microrganismos, geralmente, associados à doença periodontal ocorrem com maior freqüência em implantes que exibem inflamação dos tecidos peri-implantares. Assim, a maioria dos estudos comentados sugere que a formação e maturação da microbiota peri-implantar segue os mesmos cursos tanto nas situações de saúde como de doença periodontal. Papaioannou *et al.* (1995), correlacionando parâmetros periodontais e a microbiota ao redor de implantes osseointegrados, observaram uma microbiota, composta na sua maior parte, em cocos na situação de saúde peri-implantar.

Avaliando conectores com diferentes graus de rugosidade, Bollen *et al.* (1996), observaram o acúmulo do biofilme nesses conectores, em diferentes períodos. A análise microbiológica, utilizando cultura e microscópio de

contraste de fase, não apresentou diferença estatisticamente significante para *P. intermedia* e *F. nucleatum* nos conectores com diferentes graus de rugosidade ao longo dos períodos estudados.

Augthun & Conrads (1997) avaliaram a microbiota presente nos tecidos moles que circundavam os defeitos ósseos peri-implantares, qualitativa e quantitativamente. Após adição dos tecidos a soluções nutrientes, uma alíquota da suspensão foi levada para semeadura e posterior cultura microbiana. Verificaram a presença de espécies da família *Bacteroidaceae* (*P. intermedia, Prevotella buccae, Prevotella oralis, Prevotella melaninogenica, Prevotella denticola*), e *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *Capnocytophaga* spp. e *Eikenella corrodens*. Observaram a presença desses microrganismos em 16 das 18 amostras observadas, sugerindo a ocorrência de invasão bacteriana nos tecidos peri-implantares. Lee *et al.* (1999) comparando a microbiota do tecido peri-implantar ao redor de 101 implantes clinicamente saudáveis, dentes com coroas totais e dentes hígidos de 43 pacientes, encontraram estreptococos, *Veillonella parvula*, *M. micros* e *F. nucleatum* na grande maioria dos implantes. As espécies periodontopatógenas *P. gingivalis*, *T. forsythensis, P. intermedia, P. nigrescens* e *C. rectus* foram detectados em alguns sítios. Para os dentes com coroas totais a microbiota foi similar à encontrada nos implantes. Nos dentes hígidos, observaram a presença de estreptococos e *Selenomonas noxia* e *P. intermedia.* Esses dados foram corroborados pelos achados de Fardal *et al.* (1999), em um caso clínico de falência múltipla de implantes em curto espaço de tempo, observaram a predominância de *P. gingivalis, S. sanguis, S. oralis* e *Capnocytophaga* spp.*;* o *A. actinomycetemcomitans* não foi isolado.

Comparando implantes com doença peri-implantar e dentes periodontalmente doentes de diferentes pacientes, Listgarten & Lai (1999), por meio de culturas bacterianas, encontraram *T. forsythensis* (59%), *Fusobacterium* spp. (41%), *M. micros* (39%) e *P. gingivalis* (27%) nas amostras dos implantes doentes. Nos dentes periodontalmente doentes encontraram *T. forsythensis* (83%), *Fusobacterium* spp. (80%), espiroquetas (79%), *M. micros* (51%), *P. gingivalis* (59%) e *E. corrodens* (37%) na periodontite de adulto e *T.*

forsythensis (85%), *Fusobacterium* spp. (83%), *P. gingivalis* (60%), espiroquetas (59%), *M. micros* (56%) e *C. rectus* (56%) na periodontite refratária. Sugeriram que haveria diferenças qualitativas entre os implantes com peri-implantite e sítios comprometidos periodontalmente. Além de cultura para identificação dos microrganismos presentes no sulco peri-implantar, alguns autores têm utilizado os métodos enzimáticos e imunológicos para a detecção de algumas espécies ou grupos de bactérias valendo-se de seus metabólitos/fatores de virulência (Palmisano *et al.,* 1991; Adonogianaki *et al.,* 1995).

Palmisano *et al.*(1991) utilizaram o teste BANA (hidrólise do N-Benzoil-DL-Arginina-2-Naftilamida na presença de uma enzima semelhante à tripsina), para a detecção de *T. forsythensis*, *Treponema denticola, P. gingivalis* e algumas espécies do gênero *Capnocytophaga*. Valendo-se também de microscópio de campo escuro observaram os morfotipos presentes nas amostras de biofilme de dentes e implantes obtidos junto a 25 pacientes. Correlações positivas foram observadas com profundidades de sondagem >5mm, isto é, alta prevalência de espiroquetas e espécies BANA-positivas. Nas correlações negativas observaram a presença predominante de cocos e bastonetes imóveis.

Analisando o nível de proteínas da fase aguda e imunoglobulina G (IgG) contra *P. gingivalis* presentes no fluido crevicular peri-implantar (PICF) e sua associação clínica com o estado inflamatório da mucosa peri-implantar, Adonogianaki *et al.* (1995), observaram que os níveis, de IgG e proteínas da fase aguda, estavam elevadas nos sítios com inflamação quando comparados ao sítios saudáveis. Observando, também as respostas imunológicas presentes no fluido crevicular gengival (GCF) quando comparado ao PICF, mostraram similaridade na resposta observada nos sítios peri-implantares. Hart *et al.* (1996) analisaram a microbiota e o pH do fluido peri-implantar das amostras provenientes de sítios acometidos pela peri-implantite e sítios peri-implantares saudáveis. Observaram, por meio de cultura em anaerobiose, a presença de *Staphylococcus aureus* e bacilos entéricos Gram-negativos. Concluíram que a

peri-implantite estava associada ao baixo pH e à presença de microrganismos que não eram comuns na cavidade bucal.

Utilizando o *Checkerboard* DNA-DNA *Hibrydization*, Salcetti *et al.* (1997) avaliaram os níveis de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e a presença de 40 espécies microbianas associadas a implantes doentes e compararam com implantes osseointegrados saudáveis. Avaliaram 21 amostras de biofilme de pacientes que tinham implantes com peri-implantite (grupo 1) e 8 pacientes com implantes saudáveis (grupo 2). Amostras do fluido crevicular foram colhidas e analisadas segundo a presença de "protagonistas" anabólicos para a reabsorção óssea, prostaglandina E_2 (PGE_2), interleucina-1β (IL-1β) e IL-6, fatores anabólicos de neoformação óssea, fator de transformação de crescimento β (TGF-β) e fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF). Embora tendências positivas fossem notadas, não observaram nenhuma diferença significativa em qualquer amostra microbiológica ou para os níveis de mediadores de inflamação nos implantes doentes quando comparados aos implantes que eram estáveis no grupo 1. Encontraram também em uma freqüência muito alta o *P. nigrescens, P. micros, F. nucleatum* ss *vicentii* e *F. nucleatum* ss *nucleatum*, assim como uma elevação significante no fluido crevicular de PGE_2, IL-1β e PDGF nos pacientes com implantes falidos quando comparados aos implantes saudáveis. O fator de risco parece estar primariamente relacionado ao nível sistêmico e secundariamente ao nível local (implante), de acordo com as características clínicas, microbiológicas (*P. nigrescens* e *M. micros*) e bioquímicas (PGE_2 e IL-1β). Além disso, encontraram uma contagem de *P. nigrescens* e *M. micros* que foi correlacionada com as concentrações de PGE_2 .

1.3 – Avaliação do fluido crevicular peri-implantar

Complementarmente, os fluídos crevicular gengival e peri-implantar têm sido freqüentemente utilizados para verificar e monitorar os mediadores de inflamação, permitindo algumas vezes, o diagnóstico e prognóstico precoce da doença (Page, 1991; Gustafsson *et al.,* 1995; Engebreston *et al.,* 2002). Os mediadores presentes nos fluídos creviculares funcionam ainda como

indicadores da presença de bactérias Gram-negativas e de seus produtos nos tecidos periodontal e peri-implantar. Esta reação ativa macrófagos que por sua vez liberam citocinas e mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2 (PGE_2), interleucina-1ß (IL-1ß), e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). Esses mediadores iniciam e estimulam osteoclastos resultando em perda óssea e perda clínica de inserção (Nguyen *et al.,* 1991; Rasmussen *et al.,* 2000). Entretanto, a diferença na histopatofisiologia do tecido peri-implantar quando comparado ao tecido periodontal (Berglundh *et al.,* 1992; Lindhe *et al.,* 1992), poderia induzir uma resposta imunológica diferente, principalmente na produção da IL-1ß, induzindo degranulação de neutrófilos e liberação de colagenase 2 ou matriz metaloproteinase 8 (MMP-8) (Sorsa *et al.,* 1999). A correlação entre os parâmetros microbiológicos, clínicos e imunológicos tem sido realizada para avaliar as condições de doença nos tecidos peri-implantares, podendo contribuir no monitoramento de terapias mais específicas para o tratamento e até a prevenção das doenças peri-implantares (Salcetti *et al.,* 1997; Aboyoussef *et al.,* 1998; Kao *et al.,* 1995; Schubert *et al.,* 2001; Kivela-Rajamaki *et al.,* 2003; Shibli, 2003).

As metaloproteinases (MMPs) são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação da maioria das matrizes extracelulares durante a organogênese, crescimento e *turnover* tecidual. A expressão e atividade desta enzima é baixa ou limitada, entretanto aumentos significantes em várias condições patológicas podem levar a uma destruição tecidual, processos inflamatórios, crescimentos tumorais e metástase (Sorsa *et al*. 2004). Alguns estudos têm demonstrado que a MMP-8 ou colagenase 2 foi encontrada em elevadas concentrações na doença periodontal, sendo considerada como a mais prevalente (Sorsa *et al.,* 2004).

Entretanto, pouco se sabe sobre quais são e como agem as citocinas envolvidas na etiologia e progressão das peri-implantites (Zambon, 1996; van Winkelhoff *et al.,* 2000; Mombelli *et al.,* 2001; Plagnat *et al.,* 2002).

2 - PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo:

(1) avaliar e comparar a composição do biofilme supra- e subgengivais, os parâmetros clínicos e a concentração de matriz metaloproteinase 8 (MMP-8) em implantes sadios e implantes acometidos pela peri-implantite, e

(2) correlacionar os achados microbiológicos, clínicos e imunológicos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Seleção dos indivíduos

A população avaliada neste estudo foi composta por 44 indivíduos adultos (>21 anos), de ambos os gêneros, portadores de prótese implanto-suportada divididos em 2 grupos:

- **Grupo controle** (*n*=22 indivíduos): indivíduos portadores de implantes saudáveis em função a pelo menos um ano. Estes implantes apresentavam ausência de sinais clínicos e radiográficos de peri-implantite, ou seja ausência de supuração e de perda óssea radiográfica maior que 3mm a partir da linha do conector (*abutment*) protético (van Steenberghe *et al.,* 1999) , e;

- **Grupo teste** (*n*=22 indivíduos): indivíduos portadores de implantes que apresentavam os seguintes sinais clínicos de doença peri-implantar **(Figuras 1 a 3):** sangramento à sondagem e/ou supuração, perda óssea radiográfica maior que 3mm e defeito ósseo em forma de cálice (Mombelli, 1999; Shibli 2003).

3.2 – Critérios de inclusão dos indivíduos envolvidos no estudo

Para a participação neste estudo, os pacientes deveriam preencher os seguintes requisitos clínicos (Plagnat *et al.,* 2002; Shibli, 2003):

1. Apresentar pelo menos uma prótese implanto-suportada, utilizando implantes de superfície lisa (titânio comercialmente puro) sob função há no mínimo 1 ano;
2. Apresentar boas condições de saúde geral;
3. Não ter passado por tratamento periodontal nos últimos 12 meses;
4. Não ser fumante;
5. Não ter utilizado antibióticos ou antiinflamatórios durantes os 12 meses que antecederam o estudo;
6. Não estar utilizando contraceptivos hormonais;
7. Ausência de histórico de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, hepatite, febre reumática, asma, diabetes, desordens imunes e sanguíneas;
8. Não estar grávida ou amamentando.

Na tentativa de minimizar a influência de possíveis traumas oclusais, foram excluídos os indivíduos que apresentassem durante a avaliação clínica presença de facetas de desgaste, quebra ou destruição do material restaurador estético (resina ou porcela), mobilidade, quebra de parafusos ou soltura dos componentes protéticos junto às próteses implanto-suportadas.

Os indivíduos incluídos na amostra populacional foram informados dos procedimentos clínicos e das coletas das amostras microbiológicas e imunológica aos quais seriam submetidos, e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (Protocolo 205/03).

3.3 - Inclusão dos implantes saudáveis e com peri-implantite

Caso o indivíduo do grupo controle apresentasse mais do que um implante saudável, foi incluído no estudo o implante localizado na posição mais anterior. Todos os indivíduos do grupo peri-implantite apresentavam apenas um implante acometido pela doença peri-implantar. Caso o indivíduo apresentasse um implante sadio e um doente, foi coletada somente amostra do sítio doente, sendo este indivíduo incluído no grupo teste (peri-implantite). Este procedimento foi adotado pela maior dificuldade em se obter indivíduos portadores de peri-implantite (Esposito *et al.* 1998; Shibli, 2003).

3.4 - Delineamento do estudo

3.4.1 - *Seleção do sítio peri-implantar*

As amostras para as análises microbiológicas e imunológicas foram coletadas do mesmo sítio de cada implante selecionado. Foi selecionado para coleta o sulco/bolsa peri-implantar de maior profundidade de sondagem. Quando os sítios apresentavam a mesma profundidade de sondagem, foi escolhido o sítio mesial.

3.4.2 - *Seqüência da consulta de avaliação*

Após seleção inicial e inclusão dos indivíduos de ambos os grupos (*ver* ***3.1 - Seleção dos indivíduos***), os seguintes passos foram criteriosamente seguidos na consulta de avaliação;

1- Seleção do sítio a ser coletado *(ver **3.4.1 - Seleção do sítio peri-implantar**)*
2- Coleta de biofilme supragengival;
3- Remoção de biofilme supragengival;
4- Coleta de fluido crevicular peri-implantar;
5- Coleta de biofilme subgengival, e
6- Exame clínico peri-implantar.

O exame radiográfico foi realizado durante a seleção inicial dos indivíduos.

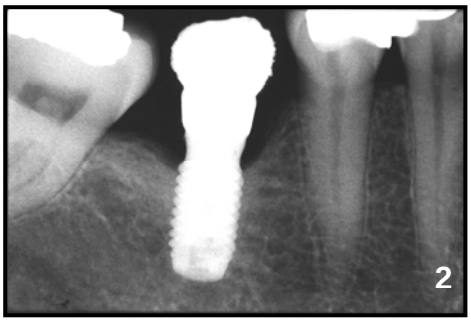
3.5 - Exame clínico e radiográfico

Os parâmetros clínicos avaliados foram:

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,
4. Presença (1) ou ausência (0) de supuração,
5. Profundidade de sondagem (mm) - caracterizada pela distância da margem peri-implantar até o fundo da bolsa ou sulco,
6. Nível clínico de inserção (mm) - caracterizada pela distância de ponto fixo previamente determinado (junção conector/implante) até o fundo da bolsa ou sulco.

O exame peri-implantar foi realizado por um único examinador, previamente treinado e calibrado (Araújo *et al.,* 2003), sendo que o erro padrão da medida observado para este examinador foi considerado satisfatório (0,21mm). As medidas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção foram determinadas utilizando uma sonda periodontal manual do tipo Carolina do Norte (PCPUNC 15 Hu-friedy Mfg Co Inc. Chigago IL). As mensurações foram realizadas em 6 faces do implante: mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, médio-lingual e disto-lingual.

Os exames radiográficos foram realizados por meio de filmes do tipo Ektaspeed (Kodak, Eastman Co,USA) utilizando-se a técnica do paralelismo. As radiografias obtidas foram processadas pelo método tempo-temperatura e logo após digitalizadas por meio de scanner para películas de 35mm (Polaroid, USA). Em seguida, foram realizadas as mensurações da distância entre o conector (*abutment*) e a crista óssea alveolar peri-implantar, utilizando-se o software do CDR (Computed Dental Radiography, Schink Tecnologies Inc., USA). Estas mensurações foram realizadas por um único examinador treinado.



Figuras 1 e 2 – Aspecto clínico e radiográfico de um dos indivíduos do grupo teste (peri-implantite). Note a presença de uma grande profundidade de sondagem (7mm) e sangramento à sondagem no sítio mesial.

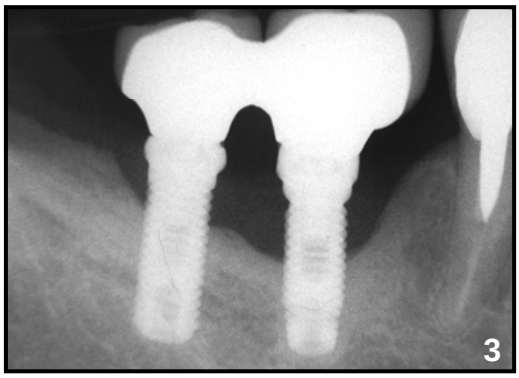


Figura 3. Aspecto radiográfico de indivíduo portador de peri-implantite (grupo teste) apresentando extensa perda óssea radiográfica.

3.6 - Análise da presença de MMP-8

3.6.1- *Coleta das amostras imunológicas*

Os sítios peri-implantares selecionados foram isolados com roletes de algodão, seco com jato de ar e aguardou-se 3 minutos para que houvesse afluxo de fluído peri-implantar. As amostras foram coletadas por meio de cone

de papel estéril, gentilmente introduzido no sulco ou bolsa peri-implantar. Os cones foram inseridos até encontrarem certa resistência, e mantidos em posição por 30 segundos, sendo logo após transferidos para um tubo plástico contendo um mistura de solução tampão fosfato e albumina de soro bovino (BSA, 1mg/mL), associados a um coquetel inibidor de protease constituído de antipain (1μg/mL), aprotinina (1μg/mL), leupeptin (1μg/mL), N-ethylmaleimide (1mM) e Zwittergent 3-12 (50μg/mL), totalizando 1ml de solução (Johnson *et al.,* 1997; Shibli, 2003). As amostras foram imediatamente congeladas a -20°C até serem processadas.

3.6.2 - *Processamento das amostras imunológicas*

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, agitando-se os tubos no vortex a cada 5 minutos, para facilitar a extração do fluído crevicular do cone de papel para posterior processamento. Alíquotas de 50μL de amostra foram utilizadas imediatamente após o descongelamento. As concentrações de MMP-8 foram determinadas utilizando kits comerciais (Amershan Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) do tipo ELISA (*enzime-linked immunosorbent assay*). O kit selecionado não apresenta reações cruzadas com outras citocinas sendo que o nível de detecção é da ordem de 1pg/ml (informação do fabricante). Os resultados foram obtidos por meio de leitora de placas ELISA a 405nm e os valores expressos em médias, já que todas as amostras foram processadas em duplicatas.

3.7- Avaliação microbiológica

3.7.1. *Cepas bacterianas e condições de crescimento*

A lista das 38 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na **Tabela 1**. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, USA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N_2, 10% CO_2, 10%H_2).

Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythensis*, por exemplo, foi cultivada em ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de sódio, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

3.7.2 - *Isolamento do DNA e preparo das sondas*

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith *et al.* (1989). As sondas multi-genômicas (*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 38 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal/peri-implantar (Haffajee

& Socransky, 1994; Mombelli & Lang, 1998; Mombelli,1999; Quirynen *et al.*, 2002; Shibli 2003; Shibli *et al.,* 2003b,c).

3.7.3. *Coleta das amostras de biofilme supra- e subgengival*

Amostras de biofilme supra- e subgengival dos sítios peri-implantares previamente selecionados, em cada um dos 44 indivíduos foram obtidas independentemente. Após isolamento da área com rolos de algodão, as amostras de biofilme supra- e subgengivais foram colhidas *(ver **3.4.2 – Sequência da consulta de avaliação**)* por meio de curetas de Gracey estéreis. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150μl de solução TE (pH 7,6), ao qual foram adicionados 100μl de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. Estes tubos foram então identificados e armazenados até serem analisados por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para as 38 cepas bacterianas descritas na **Tabela 1**, no laboratório de microbiologia da Universidade Guarulhos.

3.7.4. *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

3.7.4.1*. Hibridização DNA-DNA*

As suspensões contidas nos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de placa bacteriana contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immunetics, Cambridge, MA, USA- **Figura 4**) ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x 15cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do *Minislot* (Immunetics) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky *et al.*, 1994; Haffajee *et al.*, 1997a, b).

Tabela 1. Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA, subdivididas em Complexos microbianos (Socransky *et al.*, 1998).

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
Grupo *Actinomyces*		*Fusobacterium nucleatum* ss.	
Actinomyces gerencseriae	23860[a]	*nucleatum*	25586[a]
Actinomyces israelii	12102[a]	*Fusobacterium nucleatum* ss.	
Actinomyces naeslundii I	12104[a]	*polymorphum*	10953[a]
Complexo Roxo		*Fusobacterium nucleatum* ss.	
Actinomyces odontolyticus	17929[a]	*vincentii*	49256[a]
Veillonella parvula	10790[a]	*Fusobacterium*	
Complexo Amarelo		*periodonticum*	33693[a]
Streptococcus gordonii	10558[a]	*Micromonas micros*	33270[a]
Streptococcus intermedius	27335[a]	*Prevotella intermédia*	25611[a]
Streptococcus mitis	49456[a]	*Prevotella nigrescens*	33563[a]
Streptococcus oralis	35037[a]	*Streptococcus constellatus*	27823[a]
Streptococcus sanguis	10556[a]	**Complexo Vermelho**	
Complexo Verde[c]		*Tannerella forsythensis*	43037[a]
Actinobacillus	29523[a]	*Porphyromonas gingivalis*	33277[a]
actinomycetemcomitans	43718[a]	*Treponema denticola*	B1[b]
a e b		**Outras Espécies**	
Capnocytophaga gingivalis	33624[a]	*Eubacterium sabureum*	33271[a]
Capnocytophaga sputigena	33612[a]	*Gemella morbillorum*	27824[a]
Eikenella corrodens	51146[a]	*Leptotrichia buccalis*	14201[a]
Complexo Laranja		*Neisseria mucosa*	19696[a]
Campylobacter gracilis	33236[a]	*Prevotella melaninogenica*	25845[a]
Campylobacter rectus	33238[a]	*Propioniobacterium acnes*	11827[a]
Campylobacter showae	33612[a]	*Selenomonas noxia*	43541[a]
Eubacterium nodatum	33099[a]	*Streptococcus anginosus*	33397[a]
		Treponema socranskii	S1[b]

[a] ATCC (*American Type Culture Collection*)

[b] Forsyth Institute

[c] A espécie *Capnocytophaga ochracea* foi excluída do complexo verde.

A membrana foi então removida do *Minislot* (Immunetics) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a 120º C por 20 minutos.

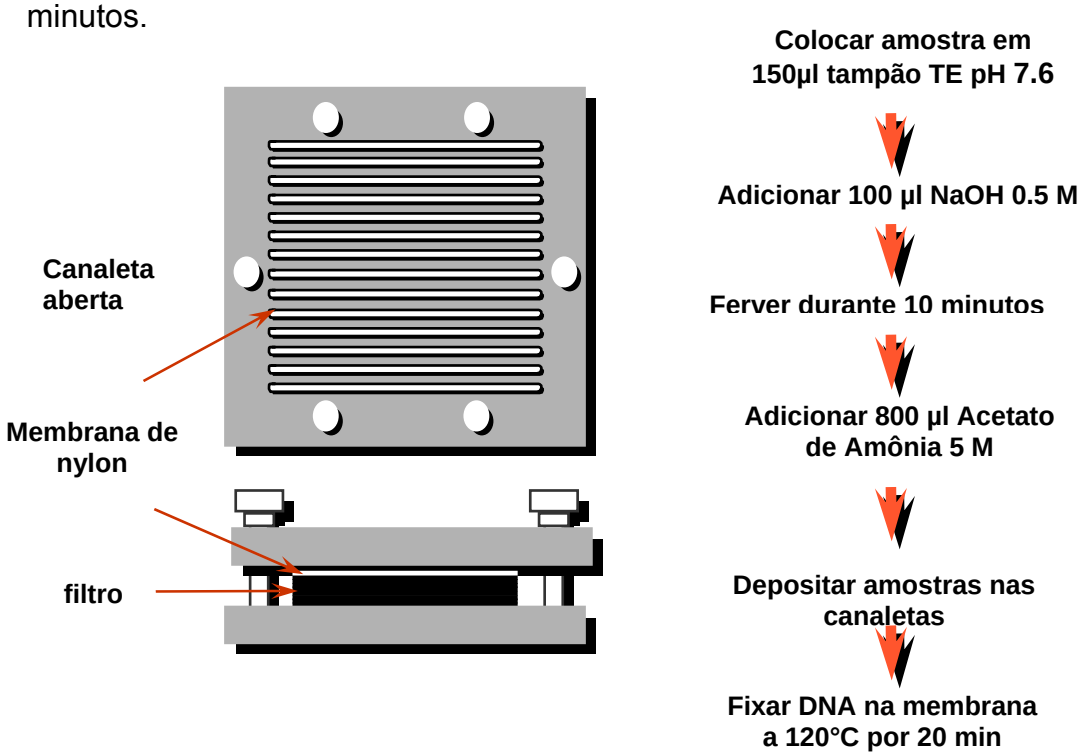


Figura 4. Representação gráfica do *Minislot* (Immunetics, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme bacteriano supra- e subgengival (técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

A membrana foi pré-hibridizada a 42º C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x *standard saline citrate* -SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim).

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* (Immunetics, **Figura 5**) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* (Immunetics) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de

sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42º C.

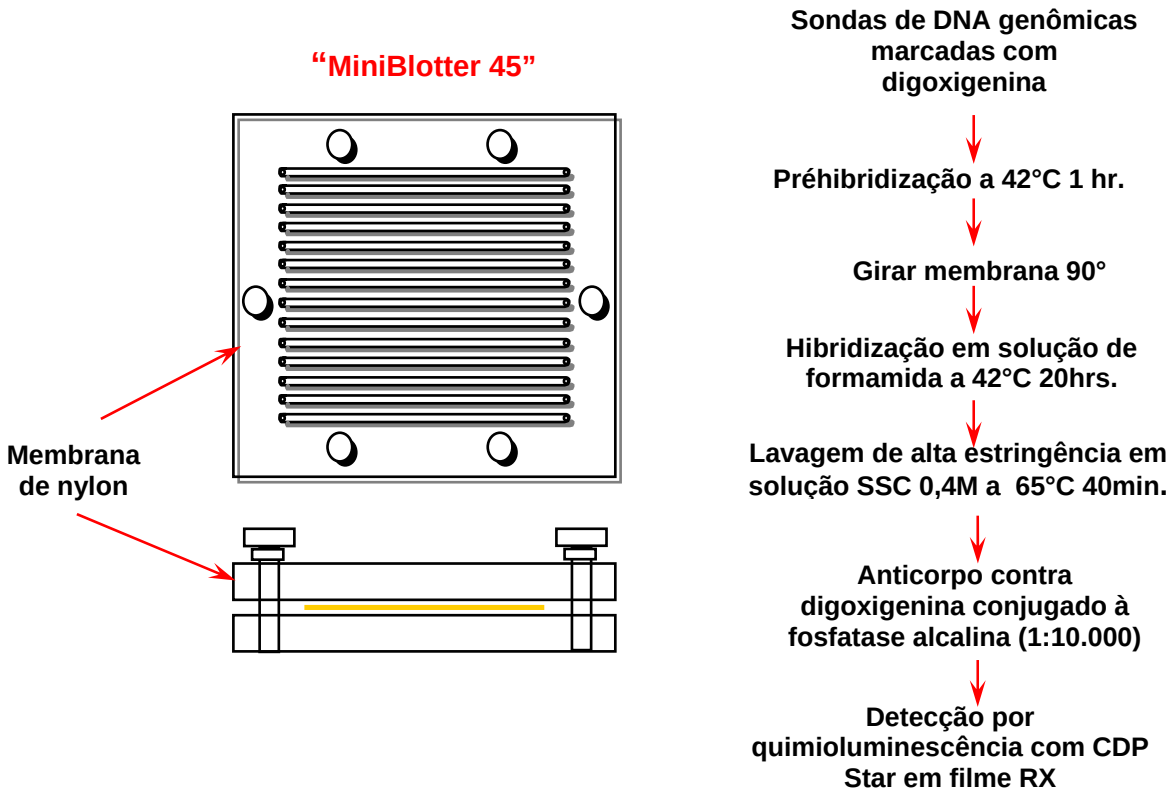


Figura 5. Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunetics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras biofilme bacteriano supra- e subgengival (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

3.7.4.2. *Detecção das espécies*

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* (Immunetics) lavada por 40 minutos, a 65ºC numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na_2HPO_4, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ($C_4H_4O_4$), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi depois lavada 2 vezes, por 20

minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de $MgCl_2$, pH 9,5.

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37ºC em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England,UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfic 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (**Figuras 6 e 7**) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20ºC.

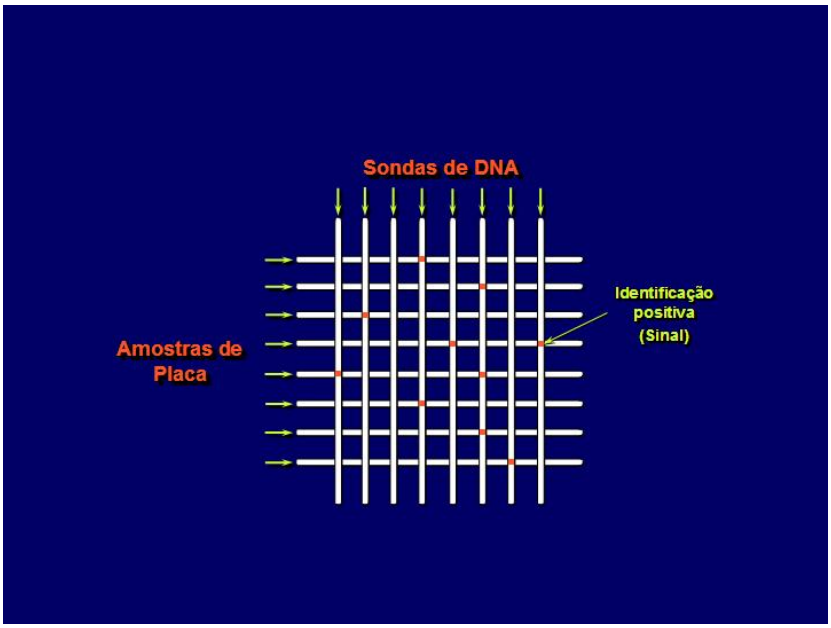


Figura 6. Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de placa e as sondas de DNA (técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

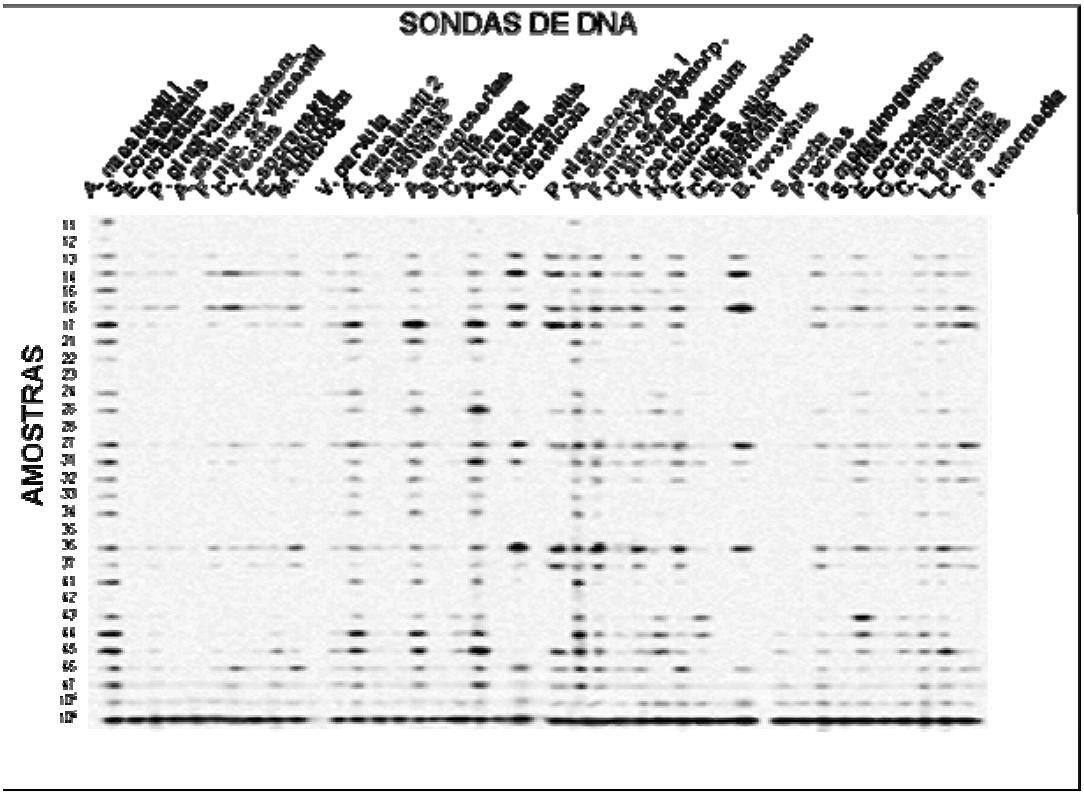


Figura 7. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de placa e as sondas de DNA (técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de biofilme são de todos os dentes de um mesmo indivíduo.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a aproximadamente 10^5 células; 3, entre 10^5 e 10^6 células; 4 aproximadamente 10^6 células e 5, mais de 10^6 células **(Tabela 2)**. Estes registros foram então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios peri-implantares e indivíduos do estudo.

Tabela 2. Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme supra- e subgengivais.

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO
0	Não detectado
1	Menos de 10^5 células
2	Aproximadamente 10^5 células
3	Entre 10^5 e 10^6 células
4	Aproximadamente 10^6 células
5	Mais de 10^6 células

3.8 Análise estatística

3.8.1. *Avaliação clínica*

Parâmetros clínicos foram analisados em 6 sítios por implante, em cada indivíduo. A média das medidas clínicas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento marginal, sangramento à sondagem e supuração foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo (controle e teste). O teste Mann-Whitney foi utilizado para examinar diferenças entre os 2 grupos. Significância estatística foi estabelecida ao nível de 5% ($p<0.05$).

3.8.2. *Avaliação microbiológica*

Os dados microbiológicos foram expressos em nível médio de cada espécie (contagem) em cada paciente. Estes níveis foram computados por indivíduo e depois dentro de cada grupo avaliado. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos dentro de cada grupo foram avaliadas por meio do teste de Mann-Whitney. Para verificar a associação

entre a presença ou ausência de espécies identificadas pelas sondas de DNA nas amostras de biofilme supra- e subgengival no mesmo sítio, tabelas de contingência 2x2 foram construídas para cada grupo em separado e para os grupos somados e avaliados pelo teste do Qui-quadrado ($p<0,05$).

A significância estatística foi estabelecida em 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, como proposto por Socransky *et al.* (1991). Foi aplicada a fórmula $0,05 = 1 – (1-k)^{38}$, onde k é o valor equivalente ao $p<0,05$ quando ajustado para a comparação de 38 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significativas quando $p\leq0,002$.

3.8.3. *Avaliação imunológica*

A média das duas leituras da concetraçào de MMP-8, por sítio, foi utilizada para o cálculo estatístico. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney ($p<0,05$).

3.8.4. *Correlação entre os achados clínicos, microbiológicos e imunológicos*

A correlação entre os dados clínicos, microbiológicos e imunológicos foi verificada utilizando-se o teste de correlação de Pearson, sendo a significância estatística estabelecida ao nível de 5% ($p<0,05$)

4. RESULTADOS

4.1 - Perfil epidemiológico e clínico da população avaliada

Foram examinados 437 indivíduos portadores de próteses implanto-suportadas. Destes, 44 indivíduos (média de idade 49±12 anos) se enquadravam no critério de inclusão deste estudo caso-controle **(Tabela 3)**. Ao todo 44 implantes (22 controle e 22 teste) foram incluídos neste estudo **(Tabela 4)**, sendo quatro indivíduos em cada grupo, desdentados totais.

Tabela 3. Média (±DP) dos parâmetros clínicos nos grupos controle e teste.

	Controle	**Teste (Peri-implantite)**
n (indivíduos)	22	22
Idade (anos)^{ns}	47,59±12,03	51,05±11,92
Número de dentes perdidos/ausentes^{ns}	5,7±7,8	6,4±6,3
Gênero (m:f)^{ns}	8:14	3:19
Profundidade de sondagem (mm)*	3,41±1,18	5,10±2,08
Nível clínico de inserção (mm)**	0,56±1,50	5,14±2,10
Perda óssea vertical (mm)**	1,74±2,98	4,83±2,78
% sítios com:		
Placa^{ns}	37,88±44,0	37,10±41,03
Sangramento marginal*	24,99±36,64	58,26±38,26
Sangramento à sondagem*	49,24±37,26	77,27±38,33
Supuração**	0±0	2,4±0,1

Teste Mann-Whitney; * $p<0,05$; ** $p<0,0001$; *ns*=não-significante

4.2-Resultados microbiológicos

4.2.1 – *Biofilme supragengival*

Os dados microbiológicos das amostras de biofilme supragengival estão apresentados na **Figura 8**. Esta figura demonstra a média da contagem ($x10^6$) das espécies identificadas com as sondas de DNA nos dois grupos. Todas as 38 espécies bacterianas avaliadas foram detectadas em ambos os grupos. *V. parvula*, *F. periodonticum* e *N. mucosa* foram espécies dominantes nas

amostras do biofilme supragengival dos 44 indivíduos. Apenas 5 espécies bacterianas diferiram significativamente entre os grupos teste e controle. Os 3 patógenos periodontais do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*), *P. intermedia* e *A. naeslundii* genoespécie 1 apresentaram médias estatisticamente maiores para os pacientes com peri-implantite (p<0,05). O grupo teste apresentou ainda média mais elevada, embora não significante, para contagem de vários microrganismos do complexo laranja como *E. nodatum*, *F. nucleatum* ss *nucleatum*, *F. nucleatum* ss *polymorphum* e *F. nucleatum* ss *vicentii*, *M. micros, P. nigrescens* e *S. constellatus*. *A. actinomycetemcomitans* também estava em níveis mais altos nas amostras de biofilme supragengival dos sítios com peri-implantite.

Tabela 4: Características clínicas dos implantes avaliados neste estudo de acordo com tipo de restauração protética, material restaurador, tempo em função e localização no arco.

	Prótese Implanto-Suportada		**Média do tempo em função (meses)**	**Localização no arco**
	Total	**Prótese Fixa**		
Controle (n=22)	4	Resina: 5 Cerâmica:13	65,31	Mand.: 13 Max.: 9
Teste (n=22)	4	Resina: 6 Cerâmica:12	63,64	Mand.: 6 Max.: 16

4.2.2 – *Biofilme subgengival*

Os dados microbiológicos das amostras de biofilme subgengival estão apresentados na **Figura 9**. Com exceção de *C. sputigena, E. corrodens* e *L. buccalis*, as demais 35 espécies avaliadas estavam presentes em maior quantidade nos sítios com peri-implantite. Nove espécies bacterianas diferiram significativamente entre os grupo teste e controle: os 3 patógenos do complexo vermelho - *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola* – 3 espécies do

complexo laranja (*C. rectus, E. nodatum* e *F. periodonticum*), além de *C. gingivalis, E. saburreum* e *A. gerencseriae*. Todas essas espécies estavam em níveis estatisticamente mais elevados no biofilme subgengival do grupo teste (p<0,05).

4.2.3 – *Comparação entre o biofilme supra- e subgengival*

As médias das contagens (x10^6) das 38 espécies bacterianas presentes nos biofilmes supra- e subgengivais dos grupos controle e teste estão apresentadas nas **Figuras 10 e 11**, respectivamente.

Dez espécies bacterianas diferiram significativamente entre os ambientes supra- e subgengivais no grupo controle. *A. gerencseriae*, *V. parvula*, *S. mitis, S. oralis, S. sanguis, A. actinomycetemcomitans, E. nodatum, F. periodonticum, G. saburreum* e *T. socranskii* estavam presentes em níveis mais altos nas amostras supragengivais **(Figura 10)**.

Nos sítios com peri-implantite apenas *T. socranskii* diferiu significativamente, em níveis, entre os biofilmes supra- e subgengivais. As demais 37 espécies avaliadas mostraram contagens semelhantes nos dois ambientes avaliados. Observou-se também uma tendência a níveis mais altos das espécies do complexo laranja no biofilme subgengival **(Figura 11).**

Foram realizadas análises de contingência (tabela 2x2) para avaliar a presença ou ausência de cada uma das 38 espécies bacterianas avaliadas no biofilme supra- e subgengivais para o mesmo implante (dados não apresentados). Esta avaliação mostrou que algumas espécies bacterianas foram encontradas somente nas amostras supra- ou subgengivais, em ambas ou em nenhuma delas. Enquanto a presença ou ausência de *P. intermedia* (p=0,046; OR=6,87) e *P. gingivalis* (p=0,019; OR=10,0) no biofilme supragengival foi significantemente associada a sua presença ou ausência no biofilme subgengival dos implantes do grupo teste, a presença ou ausência de *C. rectus* no biofilme supragengival foi estatisticamente associada à sua presença ou ausência no biofilme subgengival tanto no grupo teste como no grupo controle (p=0,039; OR=3,643).

4.2.4.- *Proporções microbianas nos biofilmes supra- e subgengival*

A **Figura 12** mostra as proporções dos complexos microbianos e a contagem total de bactérias (área dos gráficos setoriais) nas amostras de placa supra- e subgengivais dos indivíduos de ambos os grupos. As 38 espécies microbianas identificadas por meio das sondas de DNA foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos (Socransky *et al.*, 1998).

O grupo controle apresentou menor quantidade total de microrganismos em relação ao grupo de pacientes portadores de peri-implantite, tanto no ambiente supragengival ($19x10^6$; $26x10^6$ respectivamente) quanto no ambiente subgengival ($11x10^6$; $32x10^6$, respectivamente).

Diferenças substanciais foram notadas nas proporções dos complexos microbianos entre os grupos. As proporções do complexo vermelho foram estatisticamente maiores no grupo teste do que no grupo controle, tanto no ambiente supra- (11,7% e 0,4% respectivamente) quanto no subgengival (9,2% e 1,7%, respectivamente). As quatro espécies pertencentes ao complexo verde estavam em proporções estatisticamente diminuídas no biofilme subgengival do grupo teste em relação ao grupo controle.

O complexo laranja foi encontrado em menores proporções no ambiente supragengival dos implantes saudáveis (22%), seguido dos implantes doentes (33,4%), e em maiores proporções no ambiente subgengival dos 2 grupos (43.9% e 38,2%, respectivamente).

As proporções dos complexos que abrigam espécies bacterianas consideradas benéficas, roxo, amarelo, verde e espécies de *Actinomyces* estavam maiores no ambiente supragengival do grupo controle (40%) e teste (32,6%) do que no ambiente subgengival (28,5% e 29,8%, respectivamente).

4.2.5 - *Relação entre os parâmetros clínicos e o complexo vermelho*

Os parâmetros clínicos de placa visível, sangramento marginal, sangramento à sondagem, nível clínico de inserção e perda óssea não mostraram associação estatisticamente significativa com os níveis das

bactérias do complexo vermelho quando os dois grupos (teste e controle) foram avaliados em conjunto. Entretanto, houve uma aumento significante dessas espécies, individuais ou em grupo, nos sulcos/bolsas peri-implantares com profundidade de sondagem ≥4mm, quando comparados com os sítios <4mm **(Figura 13).**

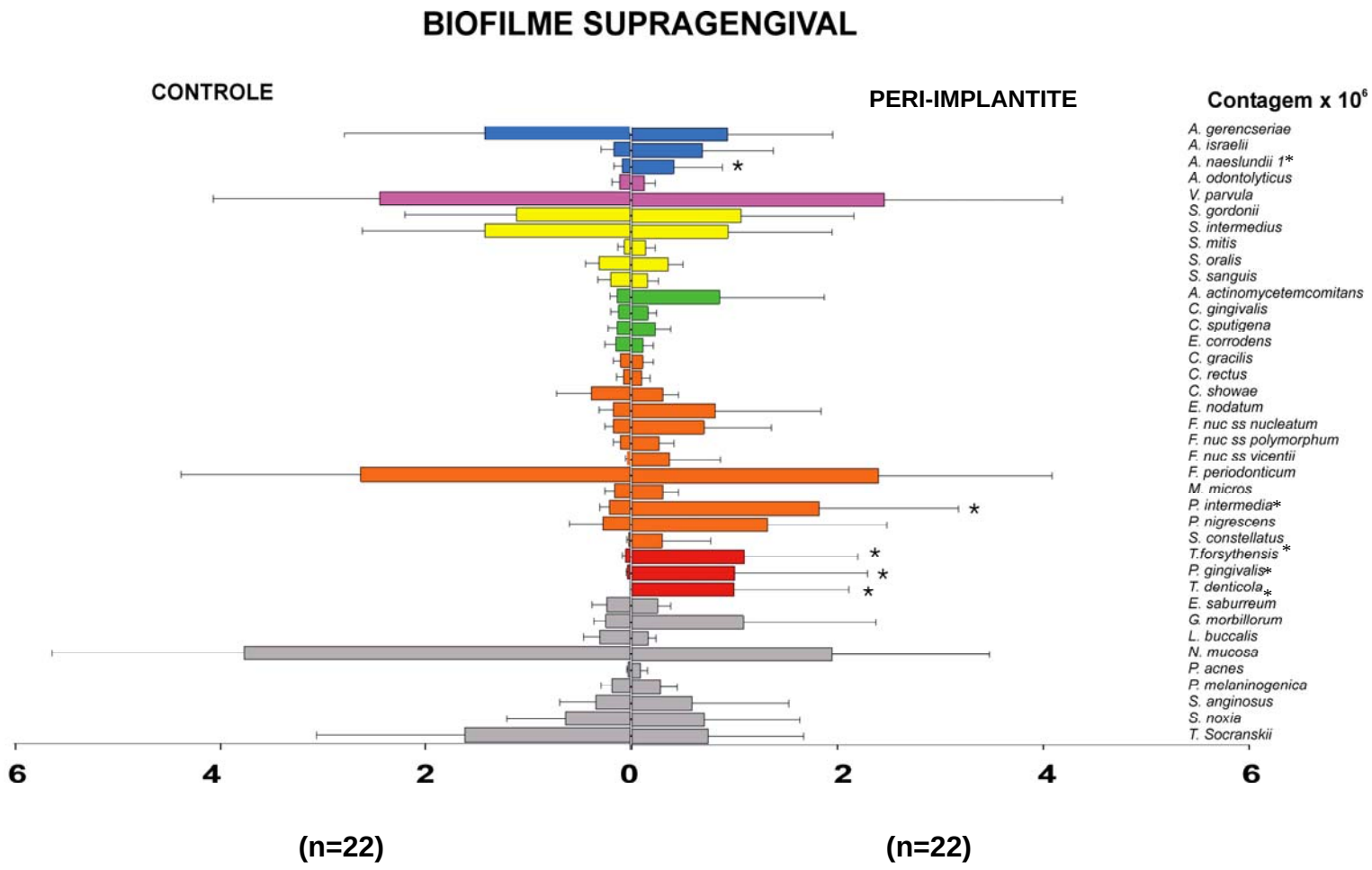


Figura 8. Gráfico de barras das médias de contagem (x 10^6 ±dp) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme supragengival nos indivíduos do grupo controle e teste. Teste Mann-Whitney: diferenças entre os grupos, *p<0,05. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: ■ *Actinomyces*, ■ roxo, ■ verde, ■ amarelo, ■ laranja, ■ vermelho, ■ outros microrganismos.

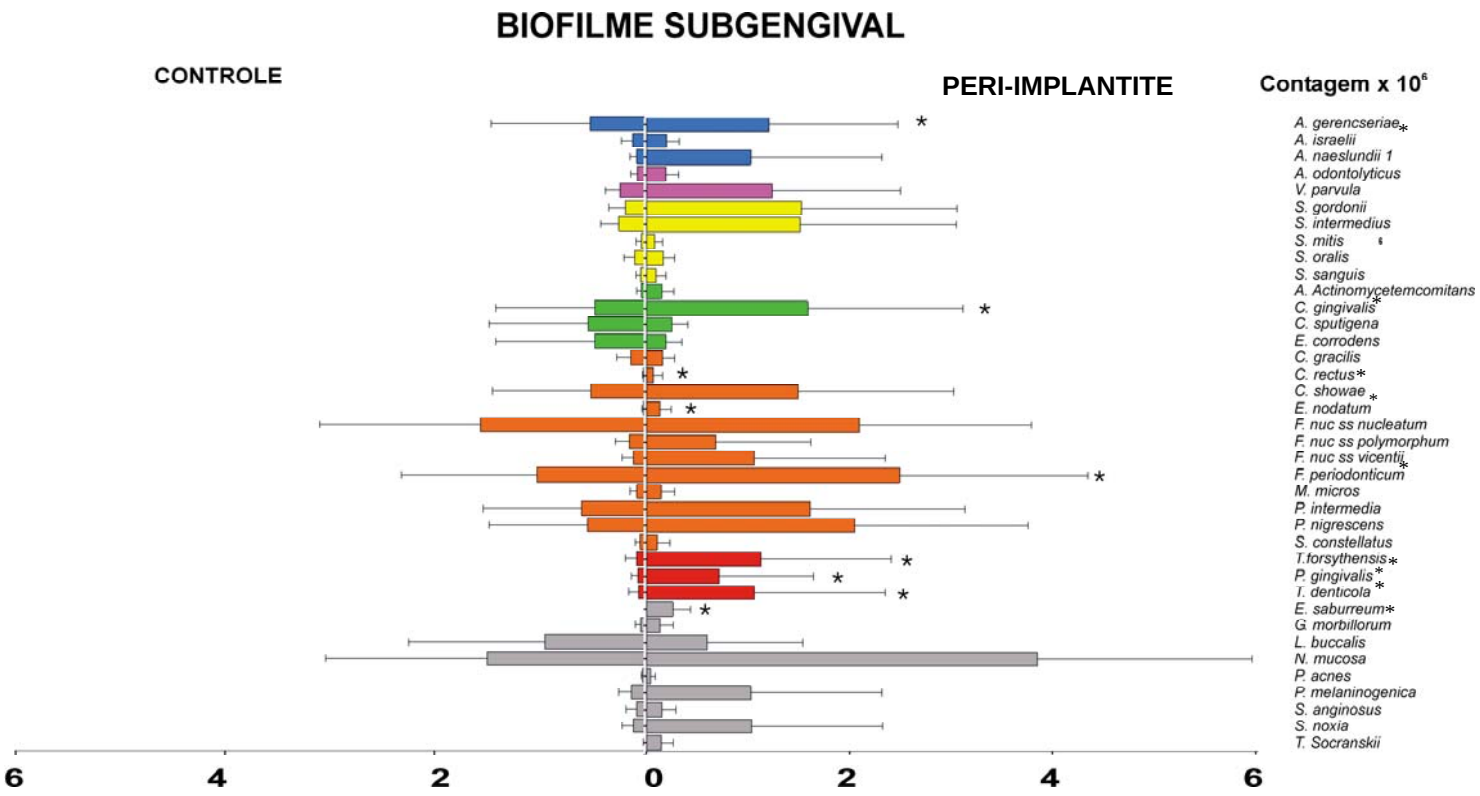


Figura 9. Gráfico de barras das médias de contagem (x 10^6 ±dp) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos indivíduos do grupo controle e teste. Teste Mann-Whitney: diferenças entre os grupos, *p<0,05. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: ■ *Actinomyces*, ■ roxo, ■ verde, ■ amarelo, ■ laranja, ■ vermelho, ■ outros microrganismos.

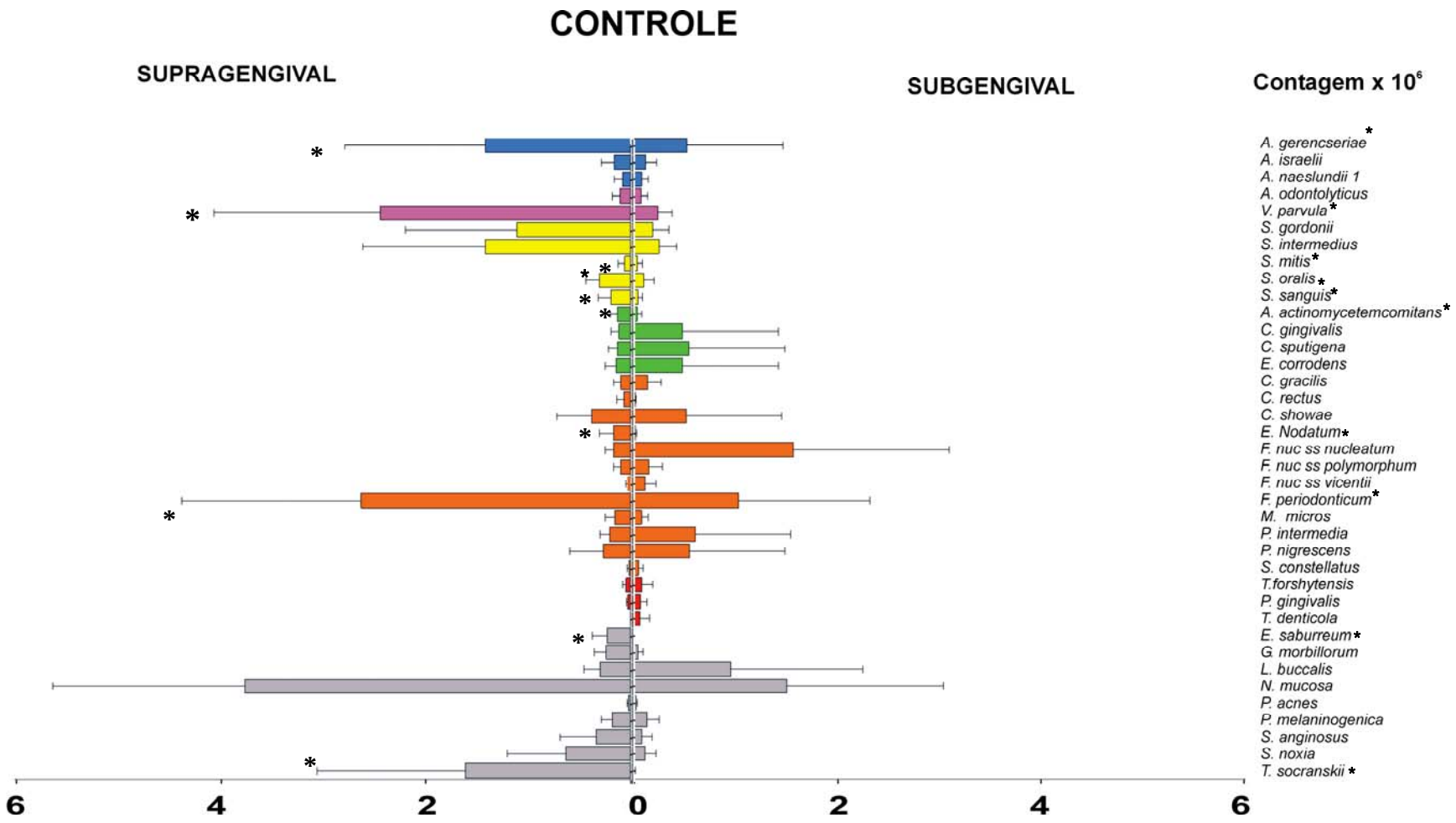


Figura 10. Gráfico de barras das médias de contagem (x 10^6 ±dp) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme sub- e supragengival nos indivíduos do grupo controle. Teste Mann-Whitney: diferenças entre os grupos, *p<0,05. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: ■ *Actinomyces*, ■ roxo, ■ verde, ■ amarelo, ■ laranja, ■ vermelho, ■ outros microrganismos.

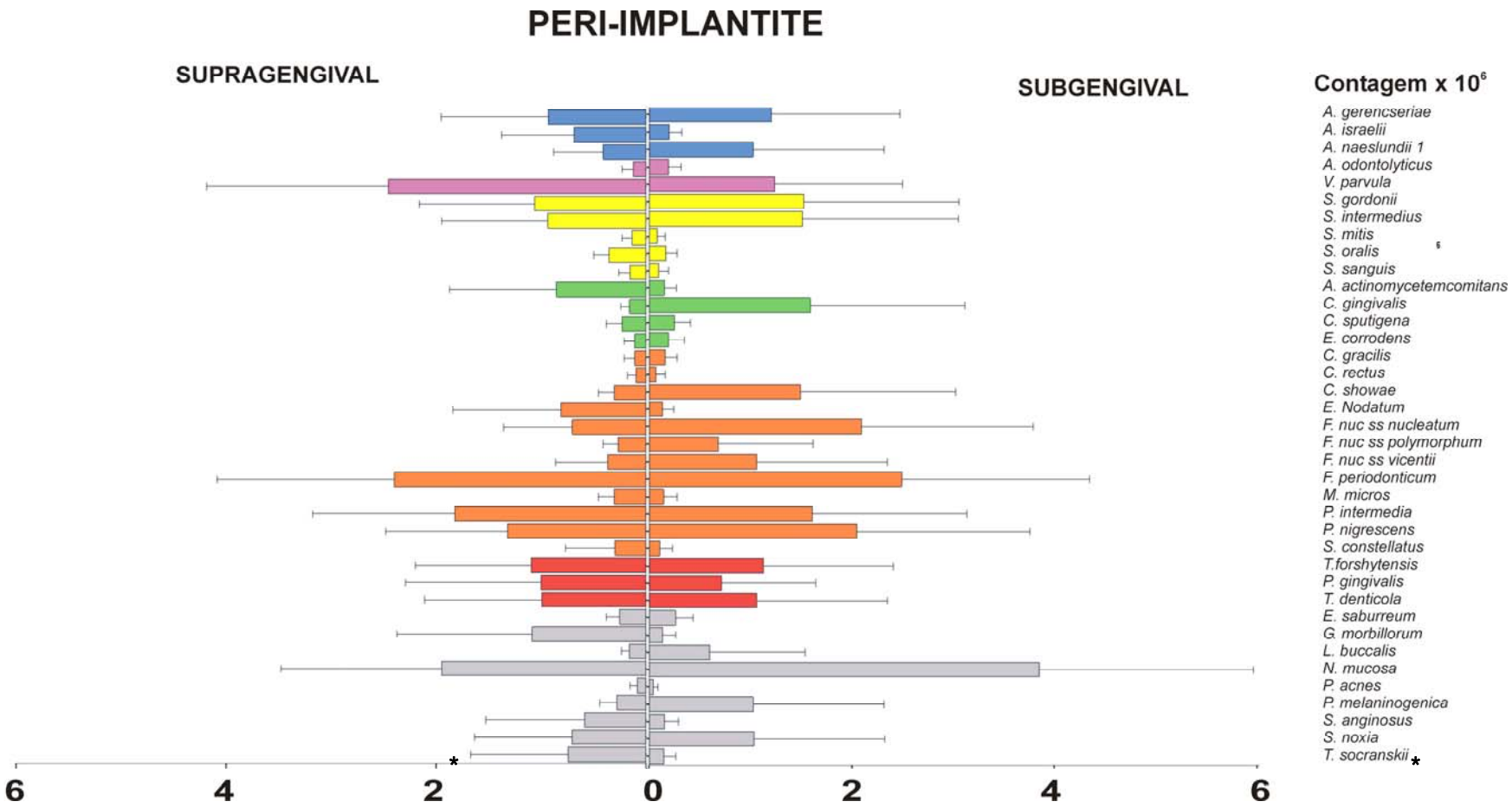


Figura 11. Gráfico de barras das médias de contagem (x 10^6 ±dp) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme sub- e supragengival nos indivíduos do grupo teste (peri-implantite). Teste Mann-Whitney: diferenças entre os grupos, *p<0,05. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: ■ *Actinomyces*, ■ roxo, ■ verde, ■ amarelo, ■ laranja, ■ vermelho, ■ outros microrganismos.

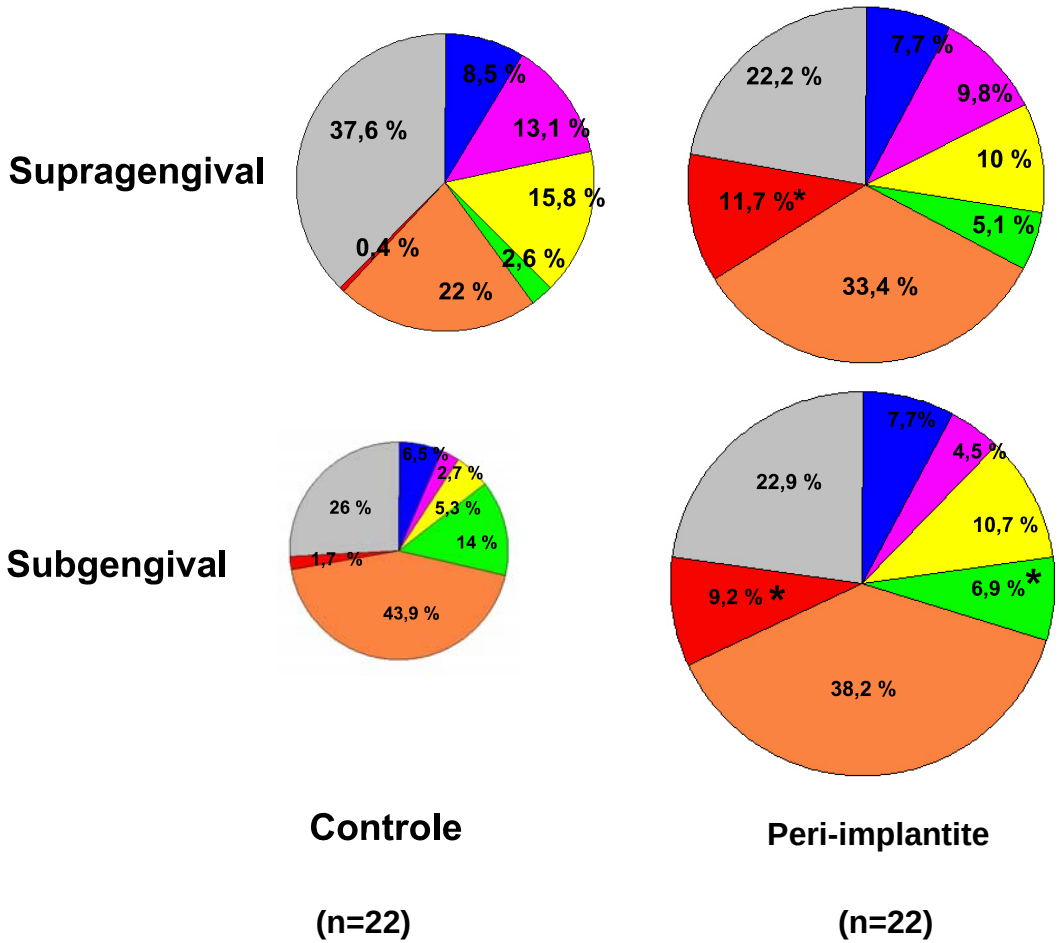


Figura 12- Média das proporções dos complexos microbianos descritos por Socranky *et al.* (1998), presentes nas amostras de biofilme supra- e subgengivais de ambos os grupos. O grupo azul é constituído por 3 espécies de *Actinomyces*. A área dos gráficos foi ajustada para refletir as proporções da contagem total de bactérias entre as amostras microbianas e grupos. Teste Mann-Whitney: *p<0,05.

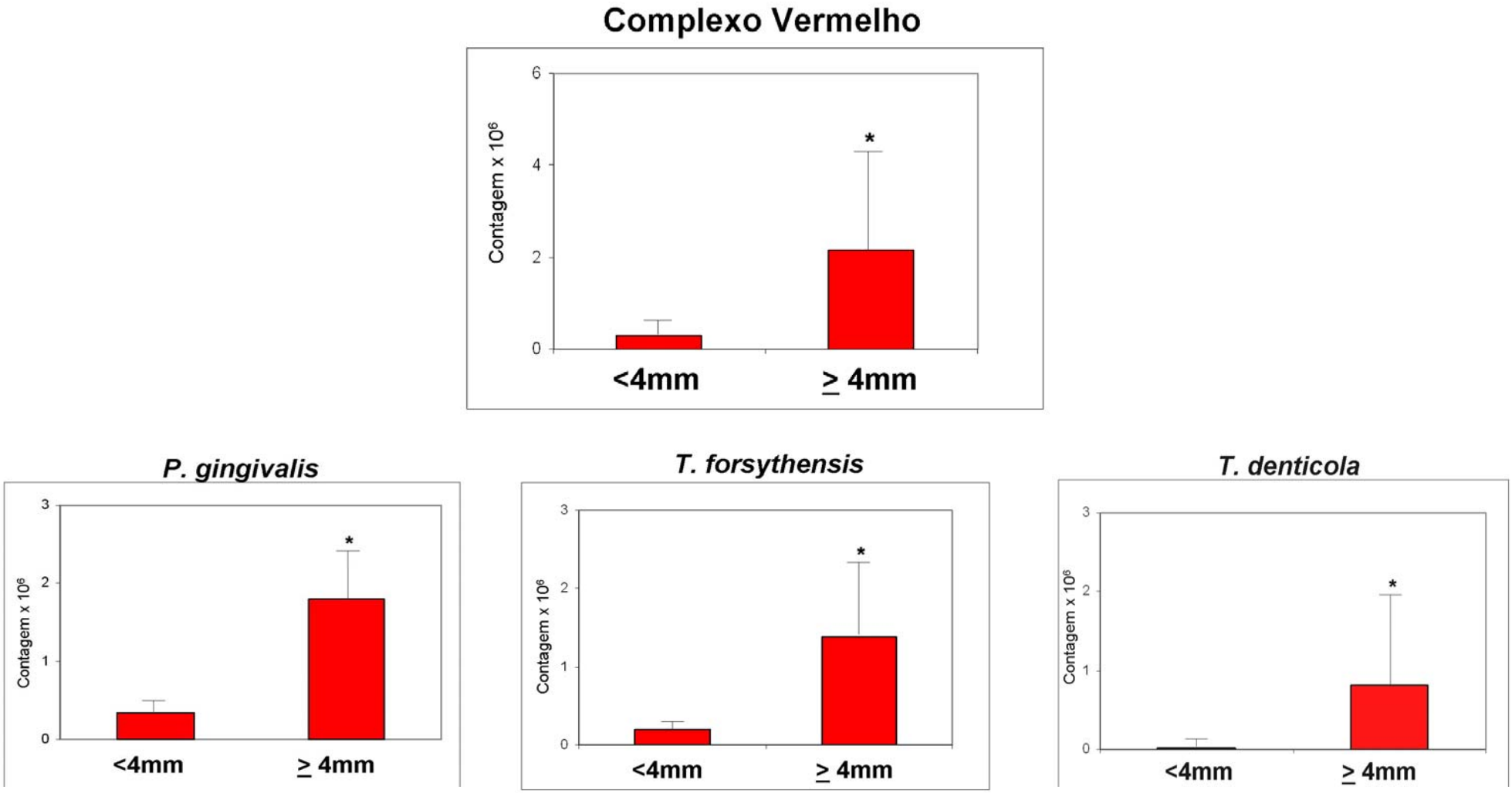


Figura 13 – Profundidade de sondagem e níveis ($x10^6$) das bactérias do complexo vermelho, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola* individuais ou em conjunto de todos os sítios peri-implantares (controle + teste). Teste Mann-Whitney. *p<0,05

4.3-Resultados imunológicos

A concentração de MMP-8 (pg/ml) foi estatisticamente maior no fluído crevicular dos indivíduos do grupo teste (*p*<0,001) **Figura 14.**

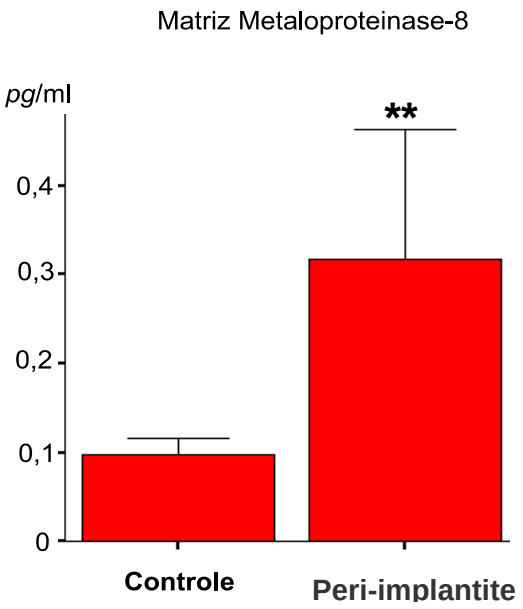


Figura 14 – Medias (±DP) de MMP-8 (pg/ml) para os grupos controle e teste. Mann-Whitney,**p<0,0001.

4.4 - Correlação entre os resultados clínicos, microbiológicos e imunológicos

As correlações entre as prevalências das espécies identificadas pela sondas de DNA, os complexos e as proporções bacterianas assim com as variáveis clínicas e imunológica estão apresentadas na **Tabela 5**. Das 38 espécies bacterianas avaliadas apenas 8 espécies (*A.actinomycetemcomitans, C. rectus, F. nucleatum* ss *vicentii, F. periodonticum, M. micros, P. gingivalis, T. forsythensis, T. denticola*) e dois complexos (vermelho e laranja) demonstraram correlação com algum parâmetro clínico e/ou concentração de MMP-8.

A única espécie que mostrou correlação positiva significante com todos os parâmetros clínicos foi *P. gingivalis*. Os níveis de MMP-8 apresentaram correlação positiva apenas com as 3 espécies do complexo vermelho analisadas individualmente ou em conjunto.

Tabela 5. Correlação entre a contagem média (10^6) das espécies identificadas pelas sondas de DNA e a média das variáveis clínicas e imunológica para os pacientes avaliados.

Espécies/Complexos	Sangramento Marginal		Prof. de Sondagem		Sangramento à sondagem		Supuração		Nível Clín. de Inserção		Perda Óssea		MMP-8 (pg/mL)	
	r	***p***	**r**	***p***	**r**	***p***	**r**	***p***	**r**	***p***	**r**	***p***	**r**	***p***
A. actinomycetemcomitans	0,386	ns	0,386	ns	0,010	ns	0,020	ns	0,496	0,040	0,368	0,014	0,046	ns
C. rectus	0,359	ns	0,436	0,043	0,533	0,011	0,369	ns	0,468	0,028	0,162	ns	0,066	ns
F. nuc. ss vicentii	0,347	ns	0,324	0,044	0,497	0,019	0,487	0,037	0,432	0,040	0,072	ns	0,028	ns
F. periodonticum	0,079	ns	0,434	0,021	0,506	0,016	0,284	ns	0,673	0,009	0,302	0,046	0,171	ns
M. micros	0,020	ns	0,499	0,001	0,392	0,040	0,020	ns	0,371	0,013	0,459	0,002	0,034	ns
P. gingivalis	0,488	0,036	0,544	0,009	0,466	0,029	0,496	0,033	0,571	0,049	0,433	0,003	0,785	0,001
T. forsythensis	0,433	0,044	-0,066	ns	0,162	ns	0,020	ns	-0,015	ns	0,165	ns	0,317	0,036
T. denticola	0,389	0,047	0,457	0,043	0,234	ns	0,023	ns	0,241	ns	0,360	0,016	0,768	0,004
Complexo Vermelho	0,469	0,028	0,193	ns	0,670	0,037	0,409	0,049	0,300	0,048	0,381	0,011	0,389	0,029
Complexo Laranja	0,445	0,038	0,406	ns	0,550	0,008	0,013	ns	0,432	0,045	0,310	0,040	0,107	ns

r= Coeficiente de Correlação de Pearson; ns=Não-significante (p>0,05).

5 - DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo caso-controle demonstraram diferenças significativas entre implantes osseointegrados saudáveis e implantes acometidos pela peri-implantite para os parâmetros microbiológicos, clínicos e imunológico.

Os parâmetros clínicos como profundidade de sondagem e sangramento à sondagem são utilizados para o diagnóstico das doenças periodontais, embora estes métodos sejam bastante controversos para o diagnóstico das peri-implantites (Mombelli, 1999; Apse *et al.,* 1989; Quirynen *et al.,* 1991; Schou *et al.,* 2002; Shibli *et al.*, 2003a,b,c). No presente estudo todos os parâmetros clínicos avaliados, com exceção do índice de placa visível, demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados, ratificando estudos prévios (Mombelli *et al.,* 1987; Hultin, 2001; Leonhardt *et al.,* 1999; Mombelli *et al.,* 2001; Shibli, 2003).

O sangramento à sondagem foi prevalente em 77,27% dos sítios com peri-implantite. Embora o sangramento à sondagem, na doença periodontal, possa não significar a presença de doença (Baderstein *et al.*, 1985; Lang *et al.*, 1986), a ausência deste sinal clínico é considerado estado de saúde (Lang *et al.,* 1990). Neste estudo, o sangramento à sondagem apresentou-se estatisticamente prevalente no grupo peri-implantite (p<0,024), indicando que esse parâmetro pode ser um indicador de doença peri-implantar (Mombelli *et al.,* 1988; Leonhardt *et al.,* 1993; Leonhardt *et al.* 1999; Hultin, 2001; Plagnat *et al*., 2002; Shibli 2003; Shibli *et al*., 2003b; Martins *et al.,*2004)

Alguns estudos, utilizando modelos animais, (Ericsson & Lindhe, 1993; Lang *et al.,* 1994; Isidor 1997; Schou *et al.*,2002; Shibli *et al.,* 2003b; Martins *et al.,* 2004), avaliaram a influência da profundidade de sondagem nas condições de saúde e doença peri-implantar, concluindo que a configuração e a orientação das fibras colágenas nos tecidos moles peri-implantares poderiam influenciar a tenacidade dos tecidos moles peri-implantares, aumentando assim a presença de sangramento à sondagem e da profundidade de sondagem (Schou *et al.,* 2002; Shibli *et al.,* 2003b; Martins *et al.,* 2004). No presente estudo, a profundidade de sondagem encontrada no grupo controle foi em

média de 3,41mm enquanto que no grupo teste foi de 5,10mm, em concordância com estudos prévios (Quirynen *et al.,* 1991; Hultin, 2001; Mombelli *et al.,* 2002; Shibli, 2003). Entretanto, cumpre salientar que a profundidade de sondagem em implantes osseointegrados também é influenciada pelos fatores inerentes à sondagem (inclinação da sonda, pressão de sondagem, presença de cálculo, tipo de macroestrutura, estado inflamatório do tecido) e pela espessura da mucosa peri-implantar e a altura do componente protético (Quirynen *et al.,* 1991; Hultin, 2001; Shibli, 2003).

A avaliação da microbiota presente nos biofilmes supra- e subgengivais apresentou diferenças significativas entre os grupos controle e teste. Os resultados microbiológicos obtidos no presente estudo foram apresentados de acordo com os complexos bacterianos descritos por Socransky *et al.* (1998). Estes grupos bacterianos além de classificados pelo grau de virulência, foram também descritos de acordo com uma possível seqüência na colonização, entre eles. Vários estudos (Lai *et al.,* 1987, Gmur *et al.,* 1989, Asikainen *et al.,* 1991) encontraram bactérias relacionadas com a progressão da doença periodontal, em regiões supragengivais de dentes sadios, como *A. actinomycetemcomitans, T. forsythenses,* e *C. rectus*. Entretanto, a detecção destas espécies no biofilme supragengival tem sido considerada por outros autores como um fenômeno esporádico e transitório (Cao *et al.,* 1990; Zee *et al.,*1996). Considerando a forte semelhança da composição do biofilme peri-implantar a doença ou saúde periodontal (Mombelli *et al.* 1995; Listgarten & Lai, 1999; Shibli 2003) e também o ineditismo deste estudo, que avalia concomitantemente a microbiota supra- e subgengivais do biofilme de implantes sadios e acometidos pela peri-implantite, os achados microbiológicos também foram comparados aos encontrados na saúde e doença periodontal.

Os resultados do presente estudo indicaram que, embora haja diferenças das médias de contagem e nas proporções entre as espécies e os complexos bacterianos nos ambientes supra- e subgengivais, todas as espécies detectadas nas amostras de biofilme subgengival estavam presentes também no biofilme supragengival (Figuras 10 e 11). Esses resultados sugerem uma interação entre os ecossistemas que não meramente

esporádicos ou transitórios como sugerido por estudos prévios em doença periodontal (Ximenez-Fyvie *et al.,* 2000 a e b). A presença de espécies anaeróbias estritas, assim como *T. forsythensis* e *T. denticola* no biofilme supragengival sugere que estas espécies bacterianas são capazes de colonizar ambientes aeróbios provavelmente por permanecerem protegidas pela estrutura do biofilme (Costerton *et al.,* 1994; Socransky & Haffajee, 2002).

Os indivíduos do grupo teste apresentaram uma contagem significantemente maior de patógenos periodontais do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*) e de diversos possíveis patógenos do complexo laranja no biofilme supragengival em comparação com o grupo controle. A presença em níveis altos destas bactérias na região supragengival dos implantes doentes sugere que essas áreas podem funcionar como reservatórios de patógenos.

Diferenças microbiológicas entre as condições de saúde e doença peri-implantar foram também observadas no biofilme subgengival (Figura 9). Espécies patogênicas do complexo vermelho (*T. forsythensis, P. gingivalis* e *T. denticola*) e do complexo laranja (*C. recuts, E. nodatum* e *F. periodonticum*) foram detectadas em níveis mais altos nas amostras subgengivais dos indivíduos com peri-implantite em relação ao grupo saudável. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios (Mombelli *et al.*,1987; Mombelli *et al.,* 1995; Leonhardt *et al.,* 1993, Leonhardt *et al.,* 1999; Listgarten & Lai, 1999; Mombelli *et al.,* 2001; Hultin, 2001; Plagnat *et al.,* 2002; Shibli, 2003).

Foi interessante observar, considerando o ineditismo do presente estudo, a semelhança na composição da microbiota do biofilme supra- e subgengivais em implantes acometidos pela peri-implantite (Figuras 10 e 11). Ao se comparar a contagem total de microrganismos, observou-se que o grupo saudável seguiu o padrão encontrado em dentes saudáveis, ou seja, contagens aumentadas no biofilme supragengival (Ximenez-Fyvie *et al.,* 2000 a). Já o grupo das peri-implantites mostrou quantidades semelhantes de microrganismos nos biofilmes supra- e subgengivais (Figura 12).

O perfil microbiano encontrado nos indivíduos desta pesquisa diferiu em certa extensão ao observado em alguns estudos de periodontite em

populações estrangeiras (Feres *et al.*, 2001; Ximenez-Fyvie *et al.,* 2000 a, b). Aparentemente, a população brasileira apresenta proporções reduzidas de *Actinomyces* e aumentadas do complexo vermelho (Carvalho *et al.,* 2005; Haffajee *et al.,* 2004). Este mesmo perfil de colonização foi observado nas superfícies peri-implantares.

Complementarmente, foi encontrada também uma relação diretamente proporcional entre o aumento da profundidade de sondagem e os níveis das 3 espécies do complexo vermelho. Estes achados são similares aos observados na doença periodontal crônica (Cugini *et al*., 1997; Ximénez-Fyvie *et al.,* 2000(a); Ximénez-Fyvie *et al.,* 2000b). Correlações significativas foram observadas entre as contagens de espécies dos complexos laranja (*C. rectus, F. nuc. ss vicentii, F. periodonticum*) e vermelho (*P. gingivalis* e *T. denticola*) e o aumento de profundidade de sondagem (Tabela 5). A presença de patógenos em sulcos peri-implantares profundos leva a uma situação semelhante a observada na patogênese da doença periodontal, no qual a produção de mediadores químicos leva a destruição óssea provocada pelo desequilíbrio hospedeiro/parasita.

A resposta do hospedeiro à presença de microrganismos patogênicos, inclui a produção de mediadores químicos inflamatórios, sendo a IL-1ß e PGE_2 os mais importantes no processo da periodontite (Page,1991). IL-1ß induz a degranulação de neutrófilos, síntese, liberação e ativação de MMP-8 derivada de células mesenquimais (Sorsa *et al*., 1999). MMP-8 apresentou concentrações significantemente maiores no fluido crevicular peri-implantar nos pacientes do grupo peri-implantite. Os lipopolisacarídeos (LPS) da parede celular e produtos derivados de patógenos periodontais potencializam a estimulação de IL-1ß e IL-1α nos tecidos peri-implantares. Associados ao LPS da *P. gingivalis* essas interleucinas podem ativar osteoblastos diretamente e causar a liberação de PGE_2 e IL-1ß dos macrófagos, monócitos e fibroblastos (Lamont & Jenkison, 1998; Sorsa *et al.,*1999; Shibli, 2003). Como conseqüência há o aumento da liberação de MMP-8, confirmando a forte correlação encontrada no presente estudo entre a concentração de MMP-8 e espécies patogênicas como *P. gingivalis, T. forsythensis* e *T. denticola*.

Esses resultados ratificam achados anteriores que sugeriram que o aumento desta colagenase poderia ser utilizado como um marcador bioquímico de destruição tecidual durante o curso da deonça peri-implantar (Teronen *et al.,* 1997; Sorsa *et al.* 1999; Kivela-Rajamaki *et al.,* 2003). Outros estudos (Teronen *et al.,* 1997; Kiili *et al.,* 2002) sugerem ainda que existe uma provável ligação entre a presença de MMPs, principalmente a MMP-8, durante a fase ativa das doenças periodontal e peri-implantar. Entretanto, a detecção de MMP-8 no fluido crevicular peri-implantar não significa necessariamente, a presença de atividade de doença naquele momento, uma vez que o teste imunológico utilizado neste estudo detecta tanto colagenases ativas como inativas (Engebreston *et al.*, 2002).

6-CONCLUSÃO

Com base nos resultados, concluímos que:

a) A diferença mais consistente entre a microbiota do grupo teste e controle foi o aumento nos níveis e nas proporções do complexo vermelho na peri-implantite, tanto no biofilme supra- quanto no subgengival.

b) Os perfis microbianos dos biofilmes supra- e subgengivais na peri-implantite foram semelhantes.

c) Espécies do complexo vermelho e laranja foram correlacionadas ao aumento da profundidade de sondagem.

d) A MMP-8 apresentou uma elevada concentração no fluido crevicular de implantes doentes que foi fortemente correlacionada ao complexo vermelho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

Aboyoussef H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos F. Detection of prostaglandin E_2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid***. Int J Oral Maxillofac Implants*** 1998;13(5):689-96.

Adonogianaki E. *et al.* Acute-phase proteins and immunoglobulin G against *Porphyromonas gingivalis* in peri-implant crevicular fluid: a comparison with gingival crevicular fluid. ***Clin Oral Implants Res.*** 1995;6(1):14-23.

Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. ***J Periodontol.*** 1992; 63: 540-47.

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 Periodont Res.*** 1989;24(2):96-105.

Araújo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter-and intraexaminer variability. ***J Periodontol.*** 2003;74(12):1736-40

Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. Recovery of A. actinomycetemcomitans from teeth, tongue, and saliva. ***J Periodontol.*** 1991;62(3): 203-6.

Aughthum M, Conrads G. Microbial findings of peri-implant bone defects. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 1997;12(1):106-12.

---

[1] Baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Badersten, A, Nilveus, R, Egelberg, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. ***J Clin Periodontol.*** 1985;12(6):432-40.

Becker W, Becker BE, Newman, MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 1990;5: 31-3.

Bollen CM, Papaioannou W, van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. ***Clin Oral Implants Res.*** 1996, 7:201-11.

Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. ***J Clin Periodontol.*** 1987; 14: 161-64.

Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. ***Clin Oral Implants Res.*** 1992; 3(1):1-8.

Booth V, Lehner T. Characterization of thr *Porphyromonas gingivalis* antigen recognized by a monoclonal antibody which prevents colonization by the organism. ***J Periodont Res.*** 1997; 32: 54-6.

Cao CF, Aeppli DM, Liljemark WF, Bloomquist CG, Band CL, Wolff LF. Comparison of plaque microflora between Chinese and Caucasian population groups. ***J Clin Periodontol.*** 1990;17:115-8.

Carvalho LH, D'Ávila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. II. Microbiological results. ***J CiIn Periodontol.*** 2005 *in press*.

Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. ***J Bacteriol.*** 1994;8:2137-42.

Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr. RL, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal disease: 12-month results*.* ***J Clin Periodontol.*** 2000; 27: 30-6.

Dahan M, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U: The effect of periodontal treatment on the salivary bacterial load and early plaque formation. ***J Clin Periodontol.*** 2004; 31: 972–77.

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

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. ***J Clin Periodontol.*** 1988; 15: 316-23.

Eke PI, Braswell LD, Fritz ME. Microbiota associated with experimental peri-implantitis and periodontitis in adult Macaca mulatta monkeys. ***J Periodontol.*** 1998; 69(2):190-4.

Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1β profiles in periodontal diseases. ***J Clin Periodontol.*** 2002; 29(1):48-53.

Engler-Blum G, Meier M, Frank J & Muller GA. Reduction of backgroud problens in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. ***Anal Biochem.*** 1993, 210(2): 235-44.

Ericsson I, Lekholm U. Evaluation of clinical function and marginal tissue reactions at tooth tissue-integrated reconstructions. In: van Steenberghe E, Albrektsson T, Bränemark PI, Henry PJ, Holt R, Liden G. (Eds). ***Tissue Integration in Oral and Maxillo-Facial Reconstruction.*** Current Clinical Practice Series 29. Amsterdam: Excerpta Medica, 1986. p. 350.

Ericsson, I., Lindhe, J. Probing depth at implants and teeth. An experimental study in the dog. ***J Clin Periodontol.*** 1993 v.20(9): p.623-7.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. II. Etiopathogenesis. ***European J Oral Sciences*** 1998;106:721-764.

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

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. ***Anal Biochem.*** 1983, 132(1):6-13.

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C,Allard K, Som S, Smith C, Goodson M, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. ***J Clin Periodontol.*** 1999; 26: 775-83.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. ***J Clin Periodontol.*** 2001; 28(7):597-609.

Furuichi Y, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. Short-term effects of triclosan on healing following subgingival scaling. ***J Clin Periodontol.*** 1997; 24: 777-82.

Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. ***Clin Oral Implants Res.*** 1993; 4:53-64.

Gmur R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* on subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. ***J Periodont Res.*** 1989; 24: 113-20.

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

Gräber HG, Wilharm J, Conrads G. Monoclonal antibodies against integrin subunits α6 and β1 inhibit migration of gingival epithelium in organ culture. ***J Periodontol.*** 1999; 70: 388-93.

Gustafsson A, Asman B, Bergstron K. Lower protein concentration in GCF from patients with periodontitis: an indicator of host-specific inflammatory reaction. ***J Clin Periodontol.*** 1995,22(3):225-8.

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

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. ***J Clin Periodontol*.** 1997; 24: 324-34. (a)

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. ***J Clin Periodontol*.** 1997; 24: 767-76. (b)

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. ***J Clin Periodontol***. 2004; 31(11):996-1002.

Hanisch O, Cortella CA, Boskovic MM, James RA, Slots J, Wikesjo UME. Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. ***J Periodontol.*** 1997; 68(1):59-66.

Hart P, Watson CJ, Pollard M, Ogden AR. The microflora and ph of peri-implant fluid in peri-implantitis: a pilot study. ***J Dent Res.*** 1996; 75(Abstract 306):1168.

Hultin M. ***Factors affecting peri-implant tissue reactions***. PhD Thesis, Institute of Odontology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden 2001. 74p.

Hinrichs JE, Wolff LF, Pihlstrom BL, Schaffer EM, Liljemark WF, Bandt CL. Effects of scaling and root planing on subgingival microbial proportions standardized in terms of their naturally occurring distribution. ***J Periodontol.*** 1985; 56(4): 187-94.

Holt R, Newman N. The clinical and microbial characterization of peri-implant environment. ***J Dental Res.*** 1986;65:257-62.

Isidor F. Histological evaluation of peri-implant bone at implants subjected to occlusal overload or plaque accumulation. ***Clin Oral Implants Res.*** 1997;8(1):1-9.

Johnson TC, Reihardt RA, Payne JB, Dyer JK, Patil KD. Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. ***J Clin Periodontol.*** 1997; 24(9Pt 1):618-25.

Kamyia I, Okuda K, Hara K. Flow-cytometric identification and detection of *Porphyromons gingivalis* by a LPS specific monoclonal antibody. ***J Periodontol.*** 1994; 65: 309-15.

Kao R, Curtis D, Richards D, Preble J. Increased interleukin-1β in the crevicular fluid of diseased implants. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 1995; 10(6): 696-701.

Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival fluid and immunolocalisation in gingival tissue. ***J Clin Periodontol.*** 2002;29(3):224-32.

Kivela-Rajamaki MJ, Teronen OP, Maisi P, Husa V, Tervahartiala TI, Pirila EM, Salo TA, Mellanen L, Sorsa TA. Laminin-5 gamma2-chain and collagenase-2(MMP-8) in human peri-implant sulcular fluid. ***Clin Oral Implants Res.*** 2003; 14(2):158-65.

Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M, Slots J. *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. ***Oral Microbiol Immunol.*** 1987; 2: 152-7.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below th gum line: pthogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. ***Microbiol Mol Biol Rev.*** 1998;62(4):1244-63.

Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? ***J. Clin. Periodontol.*** 1986, v.13(6), p.590-6.

Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. ***J. Clin. Periodontol.*** 1990, v.17(10), p.714-21.

Lang NP, Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Histologic probe penetration in healthy and inflamed peri-implant tissues. ***Clin Oral Implants Res.*** 1994, v.5(4):p.191-201.

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

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

Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. *Clin* ***Oral Implants Res.*** 1999; 10(5):339-45.

Lie MA, Danser MM, van der Weijden GA, Timmerman MF, de Graaf J, van der Velden U. Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis.***J Clin Periodontol.*** 1995; 22: 642-47.

Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. ***Clin Oral Implants Res.*** 1992 ; 3(1):9-16.

Listgarten MA, Lindhe J, Helldén L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. ***J Clin Periodontol.*** 1978; 5: 246-71.

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

Loesche W, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. ***J Periodontol.*** 1985; 56(8): 447-56.

Martins MC, Abi-Rached RS, Shibli JA, Araujo MW, Marcantonio Jr. E. Experimental peri-implant tissue breakdown around different dental implant surfaces: clinic and radiogrpahic evaluation in dogs. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 2004; 19(6):839-48.

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

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

Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with 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.

Mombelli A. Prevention and therapy of peri-implant infections. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J, *ed.* ***Proceedings of the 3rd European Worshop on Periodontology****. Berlin:* Quintessenz Verlag*,* 1999 :281-303.

Mombelli A, Feloutzis A, Brägger U, Lang NP. Treatment of peri-implantitis by local delivery of tretracycline: clinical, microbiological and radiological results. ***Clin Oral Implants Res.*** 2001 ;12(4): 287-94.

Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. ***J Periodont Res.*** 1997; 22: 335-41.

Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. ***Infection and Immunity*** 1983; 42: 510-15.

Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. ***Infection and Immunity*** 1982; 38: 1137-48.

Müller HP, Hartmann J, Flores-de-Jacoby L. Clinical alterations in relation to the morphological composition of the subgingival microflora following scaling and root planing. ***J Clin Periodontol.*** 1986; 13:825-32.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. ***J Periodont Res.*** 1977; 120-28.

Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P. Interleulin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. ***Lymphokine Cytokine Res.*** 1991; 10(1-2):15-21.

Nociti JR. FH, Toledo RC, Machado MAN, Stefani CM, Line SRP, Gonçalves RB. Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. ***Clin Oral Implants Res.*** 2001;12(4):295-300.

Ong ES, Newman HN, Wilson M, Bulman JS. The occurrence of periodontitis related microorganisms in relation to titanium implants. ***J Periodontol.*** 1992;63:200-5.

Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. ***J Clin Periodontol.*** 2001; 28(6): 576-82.

Omar AA, Newman HN, Bulman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. ***J Clin Periodontol.*** 1990;17:364-70.

Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. ***J Periodont Res.*** 1991; 26(3Pt 2):230-42

Palmisano D, Mayo JA, Block MS, Lancaster DM. Subgingival bacteria associated with hydroxylapatite-coated dental implants: morphotypes and trypsin-like enzyme activity. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 1991;6(3):313-8.

Papaioannou W, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. ***Clin Oral Implants Res.*** 1996; 7(4):405-9.

Plagnat D, Giannopoulou C, Carrel A, Bernard JP, Mombelli A, Belser UC. Elastase, α2-macroglobulin and alkaline phosphatase in crevicular fluid from implants with and without periimplantitis. ***Clin Oral Implants Res.*** 2002; 13(3): 227-33.

Quirynen, M., *et al.* The reability of pocket probing around screw-type implants. ***Clin Oral Implants Res.*** 1991, v.2(4): p.186-28

Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CML, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra-and-subgingival plaque. ***J Dent Res.*** 1993;72(9):1304-9.

Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CM, et al. The influence of surface-free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An in vivo study on implants. ***J Periodontol.*** 1994;65(2):162-7.

Rams TE, Link CC. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. ***J Oral Implantol.*** 1983;11(1):93-100.

Rams TE, Roberts TW, Tatum H, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. ***J Prosthetic Dent.*** 1984; 51:529-34.

Rasmussen L, Hanstrom L, Lerner UH. Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. ***J Clin Periodontol.*** 2000; 27(1):41-52.

Rosenberg E, Evian CI, Listgarten MA. The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. ***J Periodontol.*** 1981; 52: 435-41.

Rosenberg ES, Torosoian JP, Slots J. Microbial differences in two clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. ***Clin Oral Implants Res.*** 1991; 2(3): 135-44.

Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF, et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 1997; 12(1):32-42.

Sanz M, Newman MG, Nachnami S, Holt R, Stewart R, Flemmig T. Characterization of the subgingival microbial flora around endosteal sapphire dental implants in partially edentulous patients. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 1990;5(3):247-53.

Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. ***J Periodontol.*** 1990; 61(9): 579-84.

Schou S, Holmstrup P, Keiding N, Fiehn NE. Microbiology of ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). ***Clin Oral Implants Res.*** 1996;7(3):190-200.

Schou, S. Holmstrup P, Keiding N, Fiehn NE. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva. A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). ***Clin Oral Implants Res.*** 2002;13(2):113-26.

Schubert U, Kleber BM, Strietzel FP, Dorfling P. Crosslaps and β-glucuronidase in peri-implant and gingival crevicular fluid. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 2001; 16(2):252-8.

Shibli JA. ***Análise microbiológica da peri-implantite induzida por ligaduras em diferentes superfícies de implantes osseointegrados. Estudo em cães.*** Dissertação Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. 2000. 180p.

Shibli JA, Martins MC, Nociti Jr. FH, Garcia VG, Marcantonio Jr. E. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. ***J Periodontol.*** 2003a;74(3):338-45.

Shibli JA, Martins MC, Lotufo RFM, Marcantonio Jr. E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 2003b,18(3):383-90

Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RFM, Garcia VG, Marcantonio Jr. E. Lethal photosensitization in microbiological treatment of peri-implantitis: a preliminary study in dogs. ***J Oral Science*** 2003c,45(1):17-23.

Shibli JA. ***Etiologia, tratamento e progressão das peri-implantites*****.** Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. 2003. 309p.

Siegrist BE, Brecx MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP. In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. ***Clin Oral Implants Res.*** 1991; 2(1): 38-46.

Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. ***Scand J Dent Res.*** 1977; 85: 114-21.

Smith GLF, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. ***Oral Microbiol Immunol*****.** 1989; 4: 47-51.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. “Checkerboard” DNA-DNA hybridization. ***Biotechniques*** 1994;17(4):788-92.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. ***J Clin Periodontol.*** 1991; 8: 766-75.

Socransky SS & Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective***. Periodontol 2000*** 1994, 5: 7-25

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. ***J Clin Periodontol.*** 1998; 25:134-44.

Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. ***Oral Dis.*** 2004; 10(6):311-18.

Sorsa T, Mantyla P, Ronka H, et al. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. ***Ann N Y Acad Sci.*** 1999; 878:130-40.

Talarico GM *et al*. Phenotypic characterization of mononuclear cells from gingiva associated with periodontitis and peri-implantitis. ***J Oral Implantol***. 1997;23(1-2):5-11.

Tanner ACR, Haffer C, Brathall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. ***J Clin Periodontol.*** 1979; 6: 278-307.

Teronen O, Konttinen YT, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, Ding Y, Santavirta S, Sorsa T. Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. ***J Dent Res.*** 1997;76(9):1529-37.

Tillmanns HWS, Hermann JS, Tiffee JC, Burgess AV, Meffert RM. Evaluation of three different dental implants in ligature-induced peri-implantitis in the beagle dog. Part II. Histology and microbiology. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 1998;13(1):59-68.

Toijanic JA, Ward CB, Gewerth ME, Banakis ML. A longitudinal clinical comparison of plaque-induced inflammation between gingival and peri-implant soft tissues in the maxilla. ***J Periodontol.*** 2001; 72(9):1139-45.

van Steenberghe, D., Quirynen, M. & Naert I. Survival and success rates with oral endosseous implants. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J. eds. ***Proccedings of the 3rd European Worshop on Periodontology.*** Berlin: Quintessence Books,1999; 242-54.

van Winkelhoff AJ, Goene RJ, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. ***Clin Oral Implants Res.*** *2000*; 11(6):511-20.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgengival plaque in health and periodontitis. ***J Clin Periodontol.*** 2000a; 27(9): 648-57.

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

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

Zee KY, Samaranayake LP, Attstrom R. Predominant cultivalble supragengival plaque in Chinese “rapid” and “slow” plaque formers. ***J Clin Periodontol.*** 1996;23:1025-31.