MESTRADO EM ODONTOLOGIA

EDUARDO GROISMAN

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DA MUCOSITE E GENGIVITE EXPERIMENTAL EM HUMANOS

Guarulhos

2020

EDUARDO GROISMAN

Dissertação apresentada à Universidade Univeritas UNG
para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de Concentração: Periodontia
Orientadora: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli
Co-orientador: Profª. Dra. Magda Feres

Guarulhos

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

G874a

Groisman, Eduardo
Avaliação preliminar do perfil microbiológico da mucosite e gengivite experimental em humanos. / Eduardo Groisman. -- 2020.
44 f.; 31 cm.

Orientadora: Profº Dr. Jamil Awad Shibli
Co-orientador: Profª. Drª. Magda Feres

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Univeritas/Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2020.

1. Gengivite 2. Peri-implantite 3. Microbiota I. Título II. Feres, Magda (Orientadora). III. Univeritas/Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada “AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DA MUCOSITE E GENGIVITE EXPERIMENTAL EM HUMANOS” em sessão pública realizada em 27 de fevereiro de 2020, considerou o candidato EDUARDO GROISMAN aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UNG)_____

2. Profa. Dra. Daiane Fermiano Brunale (UMC)_____

3. Profa. Dra. Nidia Cristina Castro dos Santos (UNG)_____

Guarulhos, 27 de fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mario e Rachel Groisman, que
no suor do trabalho me criam e orientam diante
dos desafios impostos no cotidiano.
Aos meus irmãos e amigos Vivian e Gabriel, que
me protegem, incentivam e que me servem de
exemplo de integridade e união.
A minha companheira Marina Mendes Farrel,
que sempre ao meu lado, me dá forças e
suporte para que eu vá atrás dos meus objetivos.
Obrigado pelos conselhos,
pela parceria e por todo amor.
Ao meu filho Noah, meu projeto mais incrível,
a força maior que me faz querer ser melhor
todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, prof. Jamil Awad Shibli e sua familia.

À Profa. Magda Feres, minha co-orientadora. Muito obrigado por ter sido um grande exemplo de mestre e pesquisadora; pela preocupação e pelo modelo de pessoa que demonstrou ser.

Ao meu amigo e professor, Victor Clavijo, que desde o início da minha jornada como odontólogo me acolheu. Com sua humildade me ensina, me motiva e me serve de exemplo. Valores faz questão de enaltecer. Disciplina, concentração e persistência para acalcar os objetivos se transformam em hábitos cotidianos. Contagiante Ser Humano índigo que vem para aflorar o que ha de melhor dentro de cada individuo. Obrigado por tudo meu grande amigo

Ao meu professor Eric VanDooren.

Aos amigos Leonardo Bocabella, Cristiano Soares e Willy Clavijo, Thiago Ottoboni.

Ao Dr. Ulisses Dayube, professor e amigo que me abre portas para evolução e conhecimento. Obrigado por todas as conversas e conteúdos que me foram concedidos com sua energia contagiante que me faz querer buscar o melhor de mim. Exemplo de trabalhador, Seu apoio sempre será valioso.

Aos meus amigos João de Bortolli, Thayanne Furtado e Marcio Formiga.

À minha amiga Magda Nagasawa.

À Profa. Dra. Belén Retamal-Valdes.

Ao grupo de professores da UNG e a CAPES pelo apoio e suporte.

Aos meus amigos que estão sempre presentes em minha vida.

RESUMO

A presente dissertação teve como objetivo avaliar o perfil microbiológico durante a instalação e progressão da gengivite e da mucosite peri-implatar experimental em humanos. A gengivite e mucosite experimental foram induzidas em 16 pacientes utilizando placa de acetato para auxiliar na suspensão da higienização dos elementos envolvidos na pesquisa e foram realizadas coletas clínicas e microbiológicas com 0, 7, 14 e 21 dias. Após a última coleta os pacientes receberam uma profilaxia e novas coletas foram realizadas com 60 dias. As amostras de 5 dos 16 pacientes foram analisadas para proporções de 40 espécies bacterianas pelo método do *checkerboard* e foram observadas alterações nos complexos de Socransky entre as amostras de gengivite experimental e as amostras de mucosite peri-implantar experimental, e apesar de observarmos alterações entre as proporções dos complexos, destacando alterações maiores aos 21 dias e 60 dias, não foram observadas diferenças estatísticas. Dentro dos limites dessa avaliação sugere-se que pode haver diferenças nos complexos microbianos como descritos por Socransky *et al.* (1998) entre dentes e implantes após a gengivite/mucosite experimental. Aos 60 dias houve uma tendência a diferenças importantes nos complexos microbianos, sugerindo que o biofilme presente na mucosite peri-implantar experimental é mais resiliente do que o biofilme presente na gengivite experimental em humanos.

Palavras-chave: Gengivite; Peri-implantite; Microbiota

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the microbiological profile during the installation and progression of gingivitis and experimental peri-implant mucositis in humans. Peri-implant mucositis and experimental gingivitis were induced in 16 patients using an acetate plate to assist in suspending the cleaning of the elements involved in the research and clinical and microbiological samples were collected at 0, 7, 14 and 21 days. After the last collection, patients received prophylaxis and new samples were collected after 60 days. Samples from 5 of the 16 patients were analyzed for proportions of 40 bacterial species using the checkerboard method and changes in Socransky complexes were observed between experimental gingivitis and experimental peri-implant mucositis, and although we observed changes between the proportions of the complexes, highlighting major changes at 21 days and 60 days, no statistical differences were observed. Within the limits of mandatory assessment, there may be differences in microbial complexes as described by *Socransky* et al. (1998) between teeth and implants after an experimental gingivitis / mucositis At 60 days there was a tendency for important differences in microbials, suggesting that the biofilm present in the experimental peri-implant mucosite is more resilient than the biofilm present in the experimental gingivitis in humans.

Key-words: Gingivitis; Peri-implant Mucositis; Microbiota.

SUMÁRIO

		Página
1	**INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**	9
1.1	**Etiopatogênese**.....	11
1.2	**Gengivite e mucosite experimental**.....	13
2	**OBJETIVO**	17
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	18
3.1	**Desenho experimental**.....	18
3.2	**Seleção das amostras**.....	18
3.3	**Critérios de inclusão das amostras**.....	19
3.4	**Critérios de exclusão das amostras**.....	19
3.5	**Preparação dos participantes**.....	19
3.6	**Indução da gengivite e mucosite experimental**.....	19
3.7	**Análise Clínica**.....	20
3.8	**Obtenção das amostras**.....	21
3.8.1	Coletas das amostras de biofilme bacteriano.....	21
3.8.2	Monitoramento microbiológico.....	21
3.8.2.1	Extração de ácidos nucleicos totais.....	21
3.8.2.2	Preparo das sondas de 16S rRNA.....	22
3.8.2.3	Deposição das amostras.....	22
3.8.2.4	Hibridização.....	23
3.8.2.5	Detecção dos sinais.....	23
4	**FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**.....	25
5	**RESULTADOS**	26
6	**DISCUSSÃO**	31
7	**CONCLUSÃO**	33

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 34
ANEXO..... 44

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O conceito de osseointegração modificou o paradigma reconstrutivo em odontologia. O protocolo inicial desenvolvido para pacientes totalmente edentulos foi modificado e empregrado em estudos para situações de edentulismo parcial e unitário, além de elementos condenados a exodontia. Embora implantes osseointegrados tenham se tornado o estado de arte" para a reabilitação de pacientes com algum tipo de edentulismo, a técnica apresenta limitações e complicações. (Esposito et al., 1998; Balshi 1996)

Uma das complicações hoje muito relatada é a peri-implantite, que divide a comunidade cientifica. Parte do desacordo esta relacionda à inconsistência da definição da patologia, a que caso são propensos à patologia e à variabilidade de limites do diagnostico da doença (Coli, Cristi, Sennerby e De Bruyn 2017, e Tomasi 2015). Não existem duvidas que a longo prazo um melhor padrão de diagnostico trará melhores planos de tratamento que podem evitar o sobretratamento ou ate mesmo a remoção do implante. (Doornewaard et al., 2018)

Assim como nos dentes naturais, a colonização bacteriana da superfície do implante pode desencadear um processo inflamatório reversível no tecido mole peri-implantar (Salvi et al., 2012), denominado mucosite. Quando não identificado e tratado, este processo inflamatório pode se intensificar e progredir apicalmente, levando a sinais clínicos muito semelhantes aos da periodontite. A peri-implantite leva a perda de suporte ósseo seguida de remodelação do mesmo durante o processo de reparo (American Academy of Periodontology, 2013).

Os principais indicadores de risco para o acometimento da mucosite, segundo Lindhe e Meyle (2008), são: má higiene bucal, histórico de periodontite, tabagismo, diabetes, consumo de álcool e fatores genéticos, sendo que os três primeiros citados possuem maior grau de evidência.

Sabe-se que a interface entre tecido mole e implante osseointegrado apresenta diversas similaridades com o tecido ao redor de dentes naturais, mas algumas diferenças devem ser consideradas. A ausência do ligamento periodontal, principal delas, pode limitar o suprimento sanguíneo peri-implantar, principalmente na superfície imediatamente adjacente à superfície do implante (Carranza et al., 2012). Além disso, histologicamente, as fibras colágenas ao redor dos implantes estão

orientadas paralelamente sem inserção em sua superfície, enquanto nos dentes as fibras colágenas são perpendiculares e se inserem no cemento (Hanisch et al., 1997).

A avaliação da formação do biofilme bacteriano dental na superfície de implantes dentais por meio de microscopia eletrônica de varredura indica que os padrões de formação identificados em implantes são muito parecidos com os observados nos dentes (Lang et al., 2000).

Em um estudo clínico Zitzmann et al. (2001) demonstraram que as mudanças que ocorreram na gengiva e na mucosa peri-implantar, durante o período experimental de indução de acúmulo de biofilme, não apresentavam diferenças estatisticamente significativas o que, para os autores, indica que a resposta do hospedeiro à placa dental ou peri-implantar é, em muitos aspectos, comparável.

Embora sejam poucos, os estudos clínicos que compararam as respostas dos tecidos gengivais e peri-implantares diante da formação do biofilme através da análise dos sinais clínicos (índice de placa, índice de sangramento gengival e profundidade de sondagem e sangramento à sondagem) da resposta do hospedeiro chegaram a resultados muito semelhantes (McKenna; Borzabadi-Farahani; Lynch, 2013; Tawse-Smith et al., 2012; Berglundh et al. 1992; Ericsson et al., 1992; Pontoriero et al., 1994; Zitzmann et al., 2001). No entanto, as diferenças na organização do tecido peri-implantar fazem com que o combate à progressão de lesões associadas à placa bacteriana resulte em um infiltrado inflamatório mais amplo, quando comparado ao tecido gengival (Melo, 2009). Como pode ser observado no estudo de Salvi et al. (2012) que além dos sinais clínicos, avaliaram o fluido gengival crevicular de sua amostra e observaram que os tecidos moles ao redor de implantes desenvolveram uma resposta inflamatória mais intensa durante o período experimental de acúmulo de placa, quando comparada com a dos seus homólogos gengivais. Zitzmann et al. (2001) e Ziztimann et al. (2002) encontraram resultados semelhantes em suas através de análises histológicas realizadas ao redor dos tecidos gengivais e peri-implantares.

Recentemente, no entanto, Albrektsson et al. (2014), sugeriram que o mecanismo básico por trás da perda óssea marginal ao redor dos implantes não pode ser comparado ao descrito para as doenças periodontias, mas sim, com uma reação de corpo estranho. Esta suposição fundamentada apenas em algumas especulações oriundas de casos isolados, tem sido amplamente divulgada sem, no entanto, ser questionada.

Poucos estudos que avaliavam os efeitos da formação de biofilme ao redor de implantes (McKenna, Borzabadi-Farahani, Lynch, 2013; Salvi et al., 2011; Zitzmann et al., 2001, 2000; Pontorieiro et al., 1994) compararam a resposta peri-implantar à periodontal frente ao acúmulo de biofilme bacteriano (McKenna, et al., 2013; Salvi et al., 2011; Zitzmann et al., 2001; 2000; Tawse-Smith et al., 2001), mas foram inconclusivos ou não analisaram a resposta imune do hospedeiro frente a este modelo experimental. No entanto, estudos que avaliem a resposta imune do hospedeiro frente a essa colonização ainda são escassos e muitas vezes, inconclusivos. Independentemente da saúde gengival e da microbiota subgengival, as citocinas inflamatórias produzidas dentro dos tecidos peri-implantares podem ser diferentes daqueles presentes nos tecidos periodontais (Nowzari et al., 2012). Portanto, estudos mais específicos correlacionando os achados microbiológicos à análise de citocinas e proteínas ao redor de dentes e implantes utilizando o modelo de gengivite experimental devem ser realizados.

1.1 Etiopatogênese

As doenças periodontais e peri-implantares são caracterizadas como doenças infecto-inflamatorias que ocasionam respostas imunológicas do hospedeiro frente á um fator etiológico (Belén et al. 2018) e são caracterizadas pelas destruições reversíveis (gengivite/mucosite) ou irreversíveis (periodontite/peri-implantite) dos tecidos ao redor de elementos ou implantes dentários. O papel do biofilme dental na etiologia das doenças é consagrado pela periodontia (loe et al 1965; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994, 2002, 2005; Salvi et al 2016; Nagasawa et al 2018). A composição do biofilme bacteriano pode ser considerado um fator relevante para as modificações que acontecem nos tecidos periodontais e perimplantares Os microrganismos considerados patogênicos associados as doenças são, na maioria das vezes, Gram-negativos, anaeróbios, dotados de motilidade e, menos frequentemente, microaerófilos (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002, 2005; Belém et al 2018). O desequilíbrio das espécies bacterianas (benéficas/patogênicas) nos biofilmes e as respostas do hospedeiro ocasionam respostas imuno-inflamatorias que podem acarretar destruição nos tecidos periodontais e peri-implantares

Por mais que sejam encontradas semelhanças nos sinais clínicos das diferentes doenças (gengivite/mucosite; periodontite/peri-implantite), diferenças estruturais nos tecidos ao redor dos diferentes substratos são encontradas. Nos tecidos periodontais são observados uma resistente inserção de desmossomos da camada basal, já na mucosa peri-implantar, devido a ausência de ligamento periodontal, o que encontramos histologicamente, pode ser considerado uma leve adesão do epitélio não-queratinizado por hemi-desmossomos, que permitem a separação dos tecidos periodontais e peri-implantares da cavidade oral (Mayfiel et al 2018) Essas estruturas são caracterizadas como barreiras físicas contra a migração bacteriana para o interior dos tecidos.

Concomitante ao desenvolvimento do biofilme, a migração apical das estruturas do espaço biológico ao redor de dentes e implantes pode ser observada. Essa migração faz com que cada vez mais o meio possibilite a colonização bacteriana de espécies patogênicas devido as baixais concentrações de oxigênio. Estas bactérias estão relacionadas a fatores de virulência mais intensos e acarretam maiores respostas inflamatórias que levam a destruição dos tecidos periodontais e peri-implantares.

A composição do biofilme bacteriano pode ser considerada de extrema importância para o desenvolvimento das doenças periodontais e peri-implantares. Assim como em dentes, biofilmes associados a falha de implantes diferem substancialmente daqueles encontrados em sítios saudáveis. (Mombelli e Mericske-Stern, 1990; Sanz e cols., 1990; Leonhardt e cols., 1999; Hultin et al., 2002; Botero e cols., 2005; Quirynen et al., 2006; Renvert et al., 2007; Shibli et al., 2008; Nagasawa et al 2018). A fim de facilitar o entendimento microbiológico das estruturas do biofilme, na década de 70, estudos propuseram diferentes complexos bacterianos, que variam entre roxo, amarelo, verde, laranja e vermelho. Em humanos, o biofilme subgengival de implantes dentários com tecidos peri-implantares clinicamente saudáveis (Mombelli et al., 1987; Lee et al., 1999; Renvert et al., 2007; Shibli et al., 2008; Max. Et al., 2009) demonstrou uma microbiota dominada por uma alta proporção de células cocóides, uma baixa proporção de espécies anaeróbias e gram-negativas e uma baixa prevalência de bactérias periodontopatogênicas. Em contraste, uma bolsa de peri-implantite parece conter uma microbiota semelhante à encontrada na periodontite,

como *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotelnigrescens, Tannerella forsythia e Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Becker et al., 1990; Mombelli, 1993; Hultin et al 2002; Leonhardt et al 2003; Quirynen et al 2006; Shibli et al 2008; Kumar et al 2012). Portanto, assume-se que o mesmo padrão de colonização que ocorre em tecidos periodontais saudáveis ou na doença periodontal pode ocorrer em torno da superfície subgengival de implantes dentários. Esta informação é importante e tem implicações clínicas diretas, uma vez que o tratamento proposto para a doença peri-implantar foi baseado nesta semelhança microbiana. (Heitz-Mayfield et al. 2018) De qualquer forma e implortante frisar que a gengivite e a mucosite perimplantar são alterações consideradas reversíveis enquanto que perimplantite e periodontite são caracterizadas por sequelas clinicas e histológicas muitas vezes irreversíveis.

1.2 – Gengivite e mucosite experimental

A gengivite experimental tem sido uma ferramenta eficiente, bem documentada e aceita em pesquisas clínicas com diferentes objetivos nos últimos 20 anos, conforme apresentado na tabela 1. Não existem relatos de quaisquer problemas locais e ou sistêmicos associados à sua realização. Sabe-se, no entanto, que uma pequena inflamação local e reversível, compatível com a gengivite (patologia periodontal encontrada em grande parte da população mundial), pode ser observada no final do período de indução, sem que hajam prejuízos permanentes à saúde periodontal e peri-implantar dos voluntários e revertida imediatamente após a retomada dos procedimentos de higienização bucal.

Tabela 1 - Pesquisas que utilizaram a gengivite experimental como metodologia de análise nos últimos 20 anos.

Autores	**Local, ano.**	**Objetivo do Estudo**
McKenna et al.	Reino Unido, 2013	Avaliar o efeito do ozônio subgengival e ou peroxido de hidrogênio no desenvolvimento da mucosite periimplantar.
Salvi et al.	Suiça, 2011	Avaliar os fatores clínicos, microbiológicos, e imunológicos envolvidos na patogênese da inflamação gengival e perrimplantar experimental e comparar a sequencia de resolução da inflamação ao redor do dente e dos implantes após a restituição da remoção mecânica do biofilme.

Zitzmann et al.	Suiça, 2001	Analizar a expressão da adesão de células endoteliais na mucosa alveolar, gengiva e mucosa periimplantar em humanos.
Tawse-Smith et al.	Nova Zelandia, 2001	Comparar a eficácia clínica da escova de dentes manual (Oral-B Squish-grip) e elétrica (Braun Oral-B Plaque Remover 3-D) num grupo de pacientes idosos com overdentures mandibulares implanto-suportadas.
Zitzmann et al.	Suiça, 2000	Para avaliar as reações dos tecidos moles frente ao acúmulo de biofilme em dentes e implantes.
Pontoriero et al.	Suiça, 1994.	Para comparar os parâmetros clínicos e microbiológicos durante o desenvolvimento da gengivite e mucosite experimentais, 6 meses após a instalação do implante em seres humanos.
Branco et al.	Brazil, 2012.	Para avaliar a formação de placa supra e subgengival na área dentogengival por meio do modelo experimental de gengivite e um sistema de placas de pontuação que considera a presença de uma zona livre de biofilme em fumantes e não fumaram.
Keukenmeester et al.	Holanda, 2011	Para testar o efeito de goma de mascar com xilitol ou maltitol em comparação com a utilização de apenas chicletes como controle negativo, no desenvolvimento da placa e da gengivite.
Hallström et al.	Suécia, 2012.	Para avaliar se a administração oral diária de bactérias probióticas podem influenciar a resposta inflamatória e a composição de placa supragengival, num modelo experimental de gengivite.
Slawik et al.	Alemanha, 2011.	Determinar os efeitos de um probiótico consumido durante 28 dias, no que diz respeita à expressão de parâmetros clínicos inflamatórios no tecido gengivaldurante as várias fases de gengivite induzida por biofilme.
Zanatta et al.	Brasil, 2011.	Comparar os efeitos do gluconato de clorexidina 0,12% na coloração e formação de calculo em superfícies com e sem biofilme.
Arweiler et al.	Alemanha, 2010.	Avaliar o efeito clínico de uma nova formulação de dentifrício com extrato de S. *baicalensis* (0,5%).
Pereira et al.	Brasil, 2010.	Avaliar o efeito antiplaca e antigengivite da Copaifera spp (Cp).
Rodrigues et al.	Brasil, 2008.	Avaliar *in vivo* o efeito anti-placa e antigengivite de um gel contendo *Lippia sidoides*.
Baumgartner et al.	Suiça, 2009.	Avaliar a microbiota oral e dados clínicos em indivíduos sem acesso a métodos tradicionais de higiene oral e que comiam uma dieta compatível com a disponivel na Idade da Pedra.
Versteeg et al.	Holanda, 2007.	Testar o potencial de uma escova de dentes filamento afilado (TFTB), em comparação com uma escova de dentes dcontrole, no que diz respeito a abrasão gengival e avaliar a remoção da placa e a melhoria da condição gengival antes do início do tratamento.

Konradsson e van Dijken.	Suécia, 2005.	Avaliar a hipótese de que existem níveis mais altos de IL-1 adjacentes à resina composta, em comparação com o cimento de aluminato de cálcio (CAC) e o esmalte.
Sekino et al.	Suécia, 2005.	Avaliar o efeito da administração sistémica de ibuprofeno na gengivite e na formação de placa bacteriana.
Eberhard et al.	Alemanha, 2004.	Avaliar as capacidades anti-microbianos e anti-inflamatórias do vidro bioactivo 45S5, utilizando o modelo humano de gengivite experimental.
Sekino et al.	Suécia, 2004.	Avaliar o efeito de um regime terapêutico que combina a administração de um gel e um enxaguatório de clorexidina na recolonização de várias espécies microbiológicas no biofilme e na saliva durante um período de 4 dias de formação de placa induzida.
Trombelli et al.	Itália, 2004.	Caracterizar o comportamento clínico da gengivite, em resposta a um regime de limpeza dos dentes com amina e fluoreto estanoso.
Putt et al.	Estados Unidos, 2001.	Comparar a eficácia clínica de três escovas elétricas em reduzir a placa bacteriana e melhorar a condição gengival.
Wright et al.	Inglaterra, 2003.	Investigar alterações nos níveis de TGF-p1 no fluído, soro e plasma gengival durante um período de 21 dias da gengivite experimental.
Claydon et al.	Inglaterra, 2001.	Determinar se a PVP pode ser adicionado a enxaguantes a base de clorexidina mantendo sua eficácia e reduzizindo sua coloração.
Weidlich et al.	Brasil; 2001.	Analisar o padrão de formação de placa supragengival na região dentogengival durante um período de 4 dias e avaliar clinicamente a resposta inflamatória gengival neste período.
Brägger et al.	Suiça, 1998.	Avaliar *in vivo* os erros de método quando se utilizam imagens CADIA de subtração digital, em pacientes periodntalmente saudáveis, e para determinar um limiar que pode ser utilizado para excluir os falsos positivos de mudanças na densidade.

Estas pesquisas dividem-se quanto a metodologia empregada na indução à gengivite/mucosite. Alguns autores interromperam ***completamente os meios mecânicos de higienização oral*** (Branco et al., 2012; Keukenmeester et al., 2011; Li et al., 2012; Kumar et al., 2012; Slawik et al., 2011; Zanatta et al., Baumgartner et al., 2009; Versteeg et al., 2007; Lorenz et al., 2006; Versteeg et al.,2005; Rosema et al., 2005; Sekino, Ramberg; 2005; Konradsson, van Dijken, 2005; Eberhard et al., 2004; Sekino et al., 2004; Tsalikis et al., 2002; Putt et al., 2001; Nogueira-Filho et al., 2002; Rüdiger et al., 2002; Zitzmann et al., 2001; Lang et al., 2002; Quirynen et al., 2001; Claydon et al., 2001; Weidlich, Lopes de Souza, Oppermann, 2001; Weidlich, Lopes de Souza, Oppermann, 2001; Gonzáles et al., 2011; Zitzmann et al., 2000; Nogueira-

Filho, Toledo, Cury, 2000; Gründemann et al., 2000; Fransson et al., 1999; van Dijken, Sjöström, 1998; Deinzer et al., 1999; Brägger et al., 1998; Campan, Planchand, Duran, 1997; Johnson et al., 1997; Fransson, Berglund, Lindhe, 1996; Ramberg et al., 1996) enquanto outros utilizaram placas acrílicas que evitavam a desorganização acidental do biofilme nos dentes analisados durante a higienização dos elementos não inclusos na pesquisa e permitiam assim que o paciente não permanecesse sem realizar higiene bucal (Hallström et al., 2012; Arweiler et al., 2010 Pereira et al., 2010; Rodrigues et al., 2008; Gleissner et al., 2006; Salgado et al., 2006; Witt et al., 2005; Shearer et al., 2004; Rosin et al., 2004; Trombelli et al., 2004; Wright et al., 2003; Yates et al., 2003; Eberhard et al., 2002; Kobayashi et al., 1998; Daly, Highfield, 1996).

A presente pesquisa utilizou placas de acetados confeccionadas individualmente para cada paciente e para cada elemento (dente e implante) incluídos no estudo, permitindo assim que o paciente pudesse higienizar a cavidade bucal.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil microbiológico durante a instalação e progressão da gengivite e da mucosite experimental em humanos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Este estudo prospectivo, controlado induziu a gengivite e mucosite experimental em humanos utilizando a suspensão da higienização dos elementos envolvidos na pesquisa: um dente e uma prótese sobre implante ou reabilitação implantossuportada. O modelo utilizado foi aquele no qual apenas os dentes envolvidos na pesquisa não eram submetidos à higiene oral enquanto toda a cavidade bucal do paciente foi higienizada. Para tanto, os pacientes foram moldados e receberam uma placa de acetato que cobria os dentes envolvidos na pesquisa, protegendo-os da escova dental. Os pacientes selecionados para o estudo assinaram o CTLE após uma explicação verbal e por escrito do projeto. Os indivíduos receberam instruções de higiene oral e profilaxia profissional nos tempos -21, -14 e -7 dias antes do início do estudo. Nestas 3 consultas, os pacientes receberam reforços das instruções dadas no dia -21 e profilaxia profissional.

No tempo 0, ou seja, ao final das 3 profilaxias profissionais, os pacientes receberam as placas de acetato, e as coletas clínicas e microbiológicas foram obtidas nos tempos 0, 3, 7, 14 e 21 dias. Ao final do tempo de acúmulo de biofilme do estudo, os pacientes receberam uma nova profilaxia profissional e controle do biofilme bucal e novas coletas foram realizadas nos dias 42 e 60.

3.2 Seleção das amostras

Este estudo clínico foi submetido à aprovação do Comitê de Ética da Universidade Guarulhos (CEP-UnG: 58719716.7.0000.5506). Os 16 indivíduos que apresentavam pelo menos 1 implante em função a pelo menos 1 ano e seus respectivos dentes contralaterais presentes foram recrutados e avaliados na clínica de Implantodontia da Universidade Guarulhos.

3.3 Critérios de inclusão das amostras

Foram inclusos na amostra 16 pacientes saudáveis que apresentavam pelo menos uma restauração implantossuportada há pelo menos com 1 ano em função mastigatória; mais de 15 elementos dentais na cavidade bucal; não ser fumante ou ex-fumante; não ter realizado tratamento periodontal há no mínimo 12 meses prévios ao início do estudo; não ser diabético, lactante ou apresentar doenças renais; ser portador de hepatite B ou C; e aceitar assinar o CLTE.

3.4 Critérios de exclusão da amostra

Foram excluídos pacientes com restaurações dentais extensas; com doença periodontal crônica generalizada ou avançada e periodontite agressiva; pacientes com peri-implantite e/ou mucosite (Shibli et al. 2015); pacientes com aspectos clínicos de trauma oclusal sobre as restaurações implantossuportadas e pacientes que não aceitaram assinar o CLTE.

3.5 Preparação dos participantes

Os pacientes selecionados receberam instrução de higiene, foram submetidos a terapia periodontal e peri-implantar uma vez por semana, durante as três semanas anteriores a coleta das amostras iniciais. Também foram moldados para que placas de acetato individualizadas, que foram utilizadas durante o período de indução de placa bacteriana, pudessem ser confeccionadas. Ao final do período de preparação, os pacientes deveriam apresentar parâmetros clínicos compatíveis com os estabelecidos para a condição de saúde. Na etapa de preparação, os pacientes também receberam instruções sobre como deveriam realizar a higienização da cavidade oral durante o período de indução.

3.6 Indução da gengivite e mucosite experimental

Os pacientes foram instruídos a utilizarem uma placa individualizada de acetato, por um período de 21 dias. A placa de acetato cobria os sítios

selecionados (tanto o dente quanto o implante selecionado), evitando que o biofilme acumulado fosse desorganizado acidentalmente durante a higienização da cavidade oral. Esta placa não atrapalhou ou evitou que que os demais dentes e implantes da cavidade oral dos pacientes fossem higienizados.

Durante o período de indução de acúmulo de biofilme bacteriano, os indivíduos (Hallström et al., 2012; Arweiler et al., 2010 Pereira et al., 2010) foram avaliados e acompanhados semanalmente, a fim de garantir as condições necessárias para a viabilidade da pesquisa e a integridade do paciente. Caso houvesse reações exacerbadas, que pudessem representar risco à saúde do paciente, a amostra final foi coletada neste momento e o paciente recebeu a terapia necessária imediatamente e foi removido do estudo.

Após a coleta final das amostras, os pacientes foram submetidos as terapias periodontais e peri-implantares necessárias para restabelecer as condições de saúde da cavidade oral. Qualquer intercorrência causada durante o período de indução foi sanada nesta fase.

3.7 Análise clínica

Foram realizadas radiografias periapicais iniciais e finais para análise da presença de perda óssea ao redor dos dentes e implantes.

Os sítios selecionados também tiveram o índice de placa visível (presença ou ausência), o índice de sangramento gengival (presença ou ausência de sangramento gengival após a remoção da placa visível), a profundidade de sondagem (distância entre a margem gengival e fundo do sulco/bolsa em milímetros) e a presença de sangramento à sondagem (presença ou ausência de sangramento após a sondagem do sulco/bolsa), avaliados no início e no final do período de indução. Estes dados foram obtidos por um examinador treinado e calibrado para a realização dos exames clínicos (Shibli et al. 2008)

3.8 Obtenção das amostras

Amostras de biofilme bacteriano foram coletadas no baseline, aos 7, 14 e 21 dias, e 60 dias após a restituição da HO.

3.8.1 Coletas das amostras de biofilme bacteriano

As amostras de biofilme supra- e subgengival foram retiradas dos sulcos/bolsas mesiais com Curetas de *Gracey*, tipo *minifive* 11-12 estéreis. Elas foram posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único movimento de raspagem no sentido ápico-coronal foram coletadas. As amostras foram depositadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo 100µl de solução TE RNAse-free (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). O material coletado foi armazenado à temperatura de -80ºC.

3.8.2. Monitoramento microbiológico

3.8.2.1.Extração de Ácidos Nucleicos Totais

O ANT das amostras foi extraído utilizando o kit *Epicentre Masterpure DNA & RNA Purification* (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as superfícies das bancadas e aparatos foram tratadas com substância inibidoras de ribonucleases (RNaseAWAY® – Invitrogen, San Diego, CA, USA) para minimizar o risco de degradação dos ácidos nucleicos. O tubo contendo a amostra foi retirado do freezer -80ºC e mantido em gelo por 10 minutos para descongelamento. O tubo coletor foi agitado no vortex por 1 minuto e a solução foi transferida para um novo tubo. Para a lise do material coletado, foi adicionado 1,0µL de solução de proteinase K (50µg/µL) aos 100µL da solução de TE da amostra, e posteriormente foram incubados a 65ºC, por 15 minutos. As amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos, foi adicionado 175µL MCP reagente para precipitação de proteínas e centrifugação por 10 minutos a 12°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foram adicionados 500 µL de isopropanol, os tubos foram agitados por 2 minutos e submetidos a nova centrifugação por 10 minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado e os pellets foram lavados duas vezes com

ethanol 70%. Os pellets foram secos por 10 minutos e posteriormente foram ressuspensos em 25 µL TE e armazenados à -80ºC.

3.8.2.2 Preparo das sondas de 16S rRNA

As sondas de oligonucleotídeos para as espécies ainda não cultivadas (Tabela X) deveriam possuir cerca 18-22 nucleotídeos e mínimas estruturas secundárias nas regiões conservadas do gene *16S* rRNA para organismos procariontes. A sequência das sondas foi gentilmente cedida pelo Prof. Bruce Paster e publicadas (PREZA et al., 2009). Todas as sondas foram conferidas no sistema do *Ribosomal Database Project* (http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp) e posteriormente sintetizadas (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Os controles foram constituídos de seqüências complementares às sondas. As sondas foram marcadas com digoxigenina utilizando um kit específico para oligonucleotídeos, segundo as especificações do fabricante na concentração final de 4,5ρM/µL (DIG Oligonucleotide 3´- End labeling kit, 2nd Generation – Roche, Indianápolis, IN, USA). De uma forma geral, em um tubo estéril de 200µL foram adicionado 100 ρM da sonda para um volume final de 10µL. Posteriormente, 4µL de uma solução tampão, 4µL de uma solução 5mM de $CoCL_2$, 1µL de uma solução 0,05mM de DIG-ddUTP e 1µL da enzima transferase (20U/µL) foram adicionados. Esta solução foi incubada à 37ºC por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi retirada e colocada em gelo por 5 minutos e 2µL de uma solução 0,2mM EDTA (pH 8.0) foi adicionada para interromper a reação.

3.8.2.3 Deposição das amostras

Após a quantificação da concentração dos ANT das amostras (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) as alíquotas de 25µl contendo todo o ANT obtido de cada amostra foram adicionadas a 90µL de glutaraldeído 2% (Ted Pella, Redding, CA, USA) e 910µL de 6X de tampão salina citrato (SSC) totalizando o volume de aproximadamente 1.025µL que foi depositado diretamente em membrana de nitrocelulose (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA) de 15 x 15 cm posicionada no aparato MiniSlot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, USA). Nas últimas duas canaletas do sistema

foram adicionados os controles da reação (oligonucleotídeos complementares às sondas, Tabela 3). Os controles de todas as sondas foram aliquotados em um mesmo tubo para obtenção de uma concentração final de 0,004ρM e 0,04ρM de cada seqüência, correspondendo a 10^5 e 10^6 células, respectivamente (GONÇALVES, FERES, FAVERI et al. 2012). Foram adicionados aos controles alíquotas de 90μL de glutaraldeído 2% (Ted Pella, Redding, CA, USA) e 910μL de 6X de tampão salina citrato (SSC) para obtenção de um volume de aproximadamente 1000µl, e estes foram depositados diretamente na membrana. A membrana foi removida do aparato e os ANT depositados foram então fixados por aquecimento em forno a 120°C por 20 min.

3.8.2.4 Hibridização

Após fixação do ATN, as membranas foram lavadas durante 5 minutos em 2X SSC e posteriormente pré-hibridizadas a 42°C por 90 minutos e uma solução de formamida 50%, 5X SSC, caseína 1% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 5X reagente de Denhardt (Sigma, St. Louis, MO, USA), 25mM fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL RNA de levedura (Boehringer Mannheim) em volume final de 50ml. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immunetics, Cambridge, MA, USA) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às 45 canaletas do “Miniblotter”. Cada sonda na concentração inicial de 4,5 ρM/ µL foi diluída na solução de hibridização (UltraHyb™ Oligo hybridization Buffer- Ambion, Austin, TX, USA) para obtenção de concentração final de 2ρM a 60 ρM, e estas foram adicionadas individualmente em cada canaleta do Miniblotter 45. O dispositivo foi colocado num envelope plástico vedado, seguindo-se hibridização a 42ºC por 90 minutos.

3.8.2.5 Detecção dos sinais

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “Miniblotter” e lavadas durante 1 hora em 250ml de solução estringente (2X SSC 0,5% SDS) a 37ºC para remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 5 minutos

numa solução contendo 0,1M de ácido maleico. Posteriormente, as membranas foram submetidas à lavagem em solução bloqueadora (270ml de 0,1M ácido maleico e 30ml de caseína) durante 1 hora. Para detecção das sondas marcadas, a membrana foi depositada em solução contendo 50ml de solução bloqueadora acrescida de 8µl de anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim) (Engler-Blum et al. 1993) durante 30 minutos. As membranas foram lavadas com uma solução de 0,1M ácido maléico; 3M NaCl; 0,2M NaOH; 0,3% Tween 20; pH 8,0; 3X/15 minutos, e 1X / 5 minutos em 200ml de uma solução contendo $MgCl_2$ a 0,04% e 2,1% dietanolamina (pH 9,5). Em seguida, as membranas foram incubadas com solução de detecção, CDP Star™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), por 5 minutos a 37°C. Finalmente, as membranas foram colocadas num cassete sob um filme radiográfico (IBF-Medix AGFA; Rio de Janeiro; RJ - Brasil) por aproximadamente 40 minutos, e os filmes revelados logo em seguida.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada 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. Para isto, o filme radiográfico foi digitalizado (HP-M1132, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente analisado pelo software TotalLab (Nonlinear Dynamics, Durham, EUA) que tem a capacidade de medir a intensidade de pixels de cada sinal e compará-lo com os sinais controles.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram avaliados quanto à sua normalidade utilizando-se o teste D'Agostino e, então, foram aplicados testes paramétricos ou não paramétricos para a comparação das médias/medianas obtidas entre os grupos teste e controle nos diferentes períodos do estudo. Caso os dados não fossem inseridos na curva de normalidade, os dados foram avaliados utilizando-se o teste de Mann-Whitney para variáveis independentes e teste de Wilcoxon, nos casos das variáveis dependentes. Caso os dados seguissem a normalidade, foi utilizado o teste t não pareado (amostras não dependentes) e teste t pareado (amostras dependentes) para testar a interação entre os grupos do estudo. Também foram realizadas regressões lineares e teste de correlação de Pearson para verificação da associação entre as variáveis do estudo. O nível de significância foi de 95% (α=0.05) para todos os testes utilizados.

5. RESULTADOS

Para a defesa da dissertação, foram analisadas amostras de biofilme de dentes e implantes de 5 dos 16 voluntários submetidos à gengivite e à mucosite experimental. As amostras foram analisadas para proporções de 40 espécies bacterianas pelo checkerboard DNA-DNA hybridization.

No *baseline* houve maior proporção de espécies do complexo azul em dentes (31,9%) do que em implantes (25,0%), sem significância estatística entre elas (p=0,391).

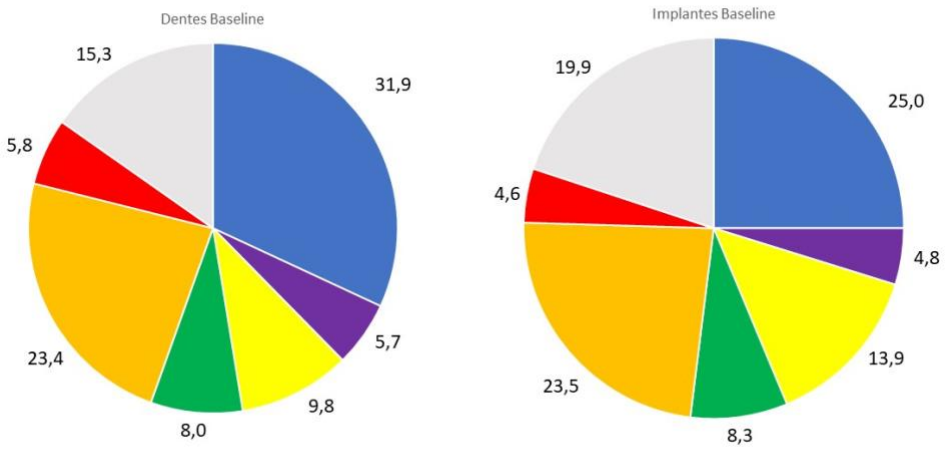

Figura 1 - Proporções dos complexos bacterianos em dentes e implantes no *baseline*. As cores representam os diferentes complexos microbianos descritos por Socransky et al. 1998. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn post-hoc.

Aos 7 dias houve maior proporção dos complexos azul em dentes (56,1%) em relação a implantes (45,4%), sem significância estatística (p=0,429). Para o complexo roxo houve maior proporção em implantes (18,2%) do que em dentes (4,2%), sem significância estatística (p=0,678). Em relação ao complexo amarelo, houve maior proporção em dentes (9,0%) do que em implantes (4,6%), sem significância estatística (p=0,800).

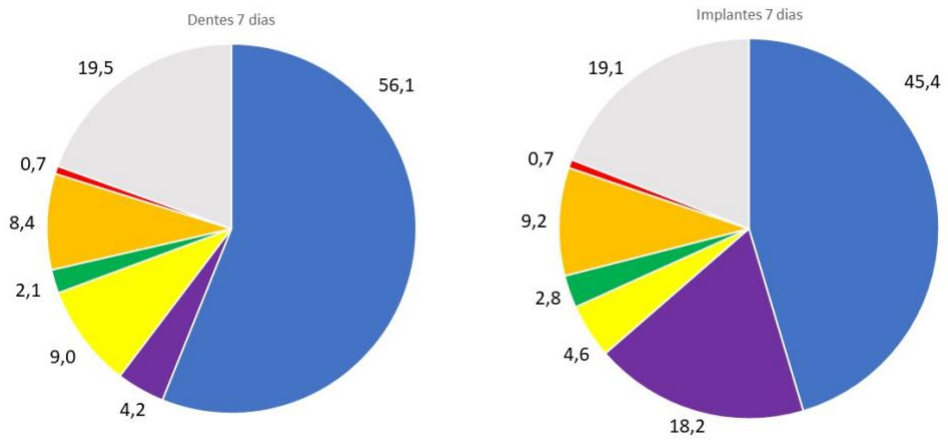

Figura 2 - Proporções dos complexos bacterianos em dentes e implantes aos 7 dias. As cores representam os diferentes complexos microbianos descritos por Socransky et al. 1998. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn post-hoc.

Aos 14 dias o complexo roxo apresentou maior proporção em dentes (8,4%) do que em implantes (3,9%), sem significância estatística (p=0,511). O complexo amarelo apresentou maior proporção em implantes (23,0%) do que em dentes (11,6%), sem significância estatística (p=0,742). Já o complexo cinza apresentou maior proporção em dentes (17,8%) do que em implantes (11,6%), sem significância estatística (p=0,728).

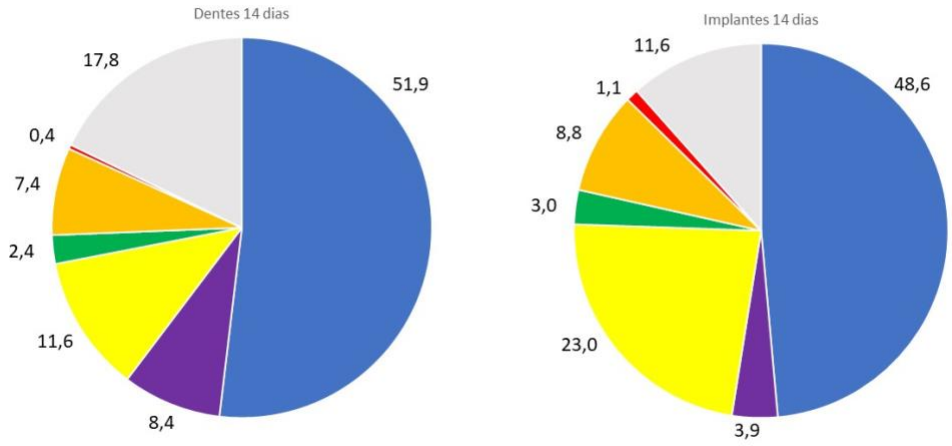

Figura 3 - Proporções dos complexos bacterianos em dentes e implantes aos 14 dias. As cores representam os diferentes complexos microbianos descritos por Socransky et al. 1998. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn post-hoc.

Aos 21 dias a proporção do complexo roxo foi maior em dentes (5,4%) do que em implantes (1,9%), sem significância estatística (p=0,354). O mesmo ocorreu para os complexos amarelo (18,8% vs. 10,9%, p=0,366) e verde (7,2% vs. 4,2%, p=0,288). Para o complexo laranja, houve maior proporção em implantes (16,6%) do que em dentes (12,5%), sem significância estatística (p=0,491). O mesmo ocorreu para os complexos vermelho (1,3% vs. 0,9%, p=0,862) e cinza (37,3% vs. 19,9%, p=0,486).

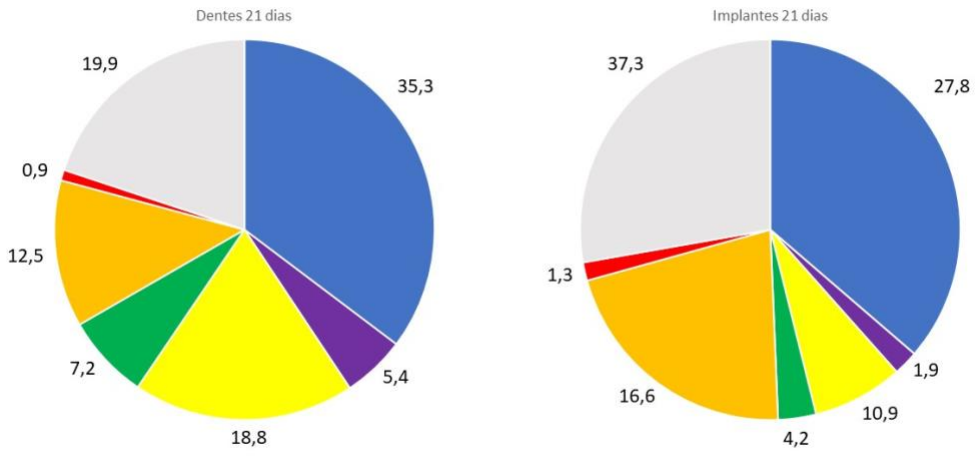

Figura 4 - Proporções dos complexos bacterianos em dentes e implantes aos 21 dias. As cores representam os diferentes complexos microbianos descritos por Socransky et al. 1998. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn post-hoc.

Sessenta dias após a restituição da HO houve maior proporção de espécies do complexo azul em dentes (43,3%) em relação a implantes (14,2%), sem significância estatística (p=0,517). O mesmo ocorreu para o complexo roxo (12,8% vs. 4,0%, p=0,563). Para o complexo laranja houve maior proporção em implantes (31,6%) do que em dentes (12,0%), sem significância estatística (p=0,509). O mesmo ocorreu para os complexos vermelho (4,3% vs. 1,1%, p=0,355) e cinza (33,3% vs. 22,1%, p=0,445).

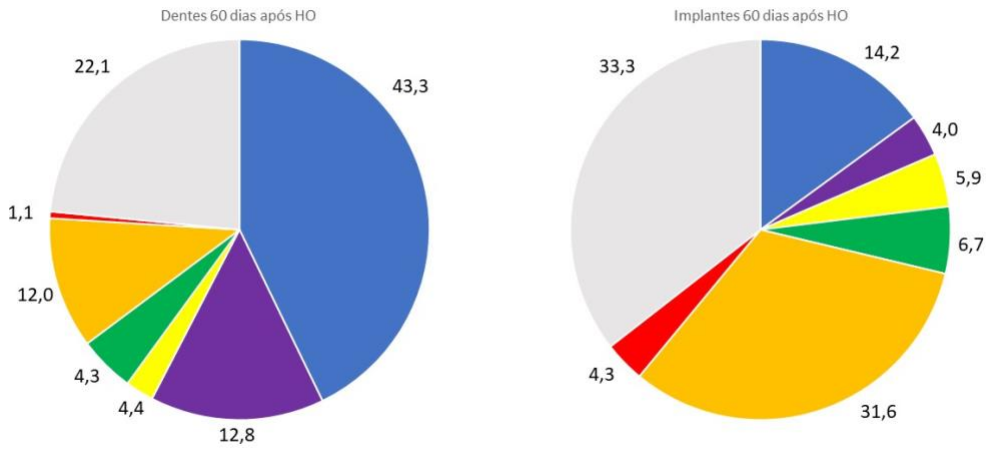

Figura 5 - Proporções dos complexos bacterianos em dentes e implantes 60 dias após a restituição da HO. As cores representam os diferentes complexos microbianos descritos por Socransky et al. 1998. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn post-hoc.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo preliminar demostraram que houve uma tendência a diferenças em proporções nos complexos microbianos descritos por Socransky et al. (1998) entre dentes e implantes após a gengivite/mucosite peri-implantar. Muito embora discretas diferenças entre as proporções dos complexos microbianos tenham sido observadas ao baseline e aos 7 e 14 dias após a gengivite/mucosite experimental, importantes tendências a discrepâncias entre complexos associados a saúde e a doença periodontal/peri-implantar foram observadas aos 21 dias e aos 60 dias após a restituição da HO.

Salvi et al. (2011) realizaram um estudo para analisar parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos associados à mucosite peri-implantar e à sua reversibilidade em humanos. Os autores avaliaram dentes e implantes de 15 voluntários submetidos a um período de 3 semanas de gengivite/mucosite experimental e mais 3 semanas após a restituição de controle de biofilme, totalizando 42 dias de acompanhamento. Os resultados mostraram que os tecidos moles ao redor de implantes apresentaram uma reposta inflamatória mais exacerbada ao acúmulo de biofilme do que os tecidos moles gengivais de acordo com a concentrações dos níveis de metaloproteinase de matriz (MMP-8) no fluido crevicular gengival/peri-implantar. A MMP-8 é um biomarcador que indica a ativação de neutrófilos na resposta inflamatória (Teronen et al. 1997, Kivelä-Rajamäki et al. 2003a, 2003b). Este achado demonstrou que o desafio microbiano elicitou uma resposta inflamatória mais exacerbada em implantes do que em dentes (Salvi et al. 2011). Em relação às avaliações microbiológicas, não houve diferença entre dentes e implantes em nenhum dos tempos avaliados. No entanto, muito embora os autores não tenham observado diferenças significantes entre dentes e implantes, o acompanhamento do estudo se encerrou aos 42 dias. No presente estudo houve um acompanhamento mais longo após a restituição da higiene oral, e observou-se que aos 60 dias houve uma maior tendência a diferenças entre os complexos microbianos presentes no biofilme de dentes e

implantes do que nos períodos anteriores. Este resultado preliminar sugere que o biofilme associado à mucosite peri-implantar é mais resiliente do que o biofilme associado à gengivite.

Zitzmann et al. (2001) realizaram um estudo para avaliar as reações da gengiva e da mucosa peri-implantar ao acúmulo de biofilme em humanos. Doze voluntários parcialmente edêntulos foram selecionados e submetidos a um programa de controle prévio de biofilme por três semanas e, então, à indução de gengivite e mucosite experimentais a partir do acúmulo de biofilme *de novo*. Foram coletadas biópsias de tecidos moles ao redor de dentes naturais e de implantes no baseline e após 3 semanas de acúmulo de biofilme. Os autores relataram que houve um aumento da área do infiltrado inflamatório em gengiva (0,26mm^2) e mucosa (0,14mm^2), e que a inflamação induziu a um aumento nas proporções de células T e B em gengiva e mucosa. Apesar das diferenças numéricas em relação às áreas com infiltrados inflamatórios e nas proporções celulares, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. No entanto, os autores ressaltaram que a amostra do estudo não oferecia poder estatístico suficiente para que se observasse diferenças significantes nas proporções celulares. Portanto, outros estudos devem investigar de forma direta ou indireta o conteúdo inflamatório presente em gengiva e na mucosa peri-implantar submetidas ao acúmulo de biofilme.

A principal limitação do presente estudo é o número amostral reduzido. No entanto, este é um estudo piloto para avaliar se há possíveis diferenças microbianas em gengiva e mucosa peri-implantar submetidas à gengivite/mucosite experimental. A partir destes achados, novas análises serão realizadas considerando o cálculo amostral já realizado para o estudo.

7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites desta avaliação parcial, sugere-se que pode haver diferenças nos complexos microbianos como descritos por Socransky et al. (1998) entre dentes e implantes após a gengivite/mucosite experimental. Aos 60 dias após a restituição da HO houve uma tendência a diferenças importantes nos complexos microbianos, sugerindo que o biofilme presente na mucosite peri-implantar experimental é mais resiliente do que o biofilme presente na gengivite experimental em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? Clin Implant Dent Relat Res. 2014 Apr;16(2):155-65. doi: 10.1111/cid.12142. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24004092.

American Academy of Periodontology in January 2013. Task force members: Dr. Paul Rosen, chair; Drs. Donald Clem, David Cochran, Stuart Froum, Bradley McAllister, Stefan Renvert, Hom-Lay Wang.

Arweiler NB, Pergola G, Kuenz J, Hellwig E, Sculean A, Auschill TM. Clinical and antibacterial effect of an anti-inflammatory toothpaste formulation with Scutellaria baicalensis extract on experimental gingivitis. Clin Oral Investig. 2011 Dec;15(6):909-13.

Baumgartner S, Imfeld T, Schicht O, Rath C, Persson RE, Persson GR. The impact of the stone age diet on gingival conditions in the absence of oral hygiene. J Periodontol. 2009 May;80(5):759-68.

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 Mar;3(1):1-8.

Brägger U, Bürgin W, Fourmousis I, Schmid G, Schild U, Lang NP. Computer-assisted densitometric image analysis of digital subtraction images: in vivo error of the method and effect of thresholding. J Periodontol. 1998 Sep;69(9):967-74.

Branco P, Weidlich P, Oppermann RV, Rösing CK. Early supra- and subgingival plaque formation in experimental gingivitis in smokers and never-smokers. Oral Health Prev Dent. 2015; 13(1):13-20.

Campan P, Planchand PO, Duran D. Pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. J Clin Periodontol. 1997 Dec;24(12):907-13.

Claydon N, Manning CM, Darby-Dowman A, Ridge D, Smith S, Addy M. The effect of polyvinyl pyrrolidone on the clinical activity of 0.09% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses. J Clin Periodontol. 2001 Nov;28(11):1037-44.

Deinzer R, Förster P, Fuck L, Herforth A, Stiller-Winkler R, Idel H. Increase of crevicular interleukin 1beta under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. J Clin Periodontol. 1999 Jan;26(1):1-8.

Eberhard J, Heilmann F, Açil Y, Albers HK, Jepsen S. Local application of n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. J Clin Periodontol. 2002 Apr;29(4):364-9.

Eberhard J, Reimers N, Dommisch H, Hacker J, Freitag S, Acil Y, et al. The effect of the topical administration of bioactive glass on inflammatory markers of human experimental gingivitis. Biomaterials. 2005 May;26(13):1545-51.

Ericsson, T. Berglundh, C. Marinello, B. Liljenberg, J. Lindhe. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog I. Clin Oral Implants Res. 1992 Sep;3(3):99-103.

Fransson C, Mooney J, Kinane DF, Berglundh T. Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. J Clin Periodontol. 1999 Jul;26(7):453-60.

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

Gleissner C, Kempski O, Peylo S, Glatzel JH, Willershausen B. Local gingival blood flow at healthy and inflamed sites measured by laser Doppler flowmetry. J Periodontol. 2006 Oct;77(10):1762-71.

Gonzáles JR, Herrmann JM, Boedeker RH, Francz PI, Biesalski H, Meyle J. Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. J Clin Periodontol. 2001 Jun;28(6):544-9.

Gründemann LJ, Timmerman MF, Ijzerman Y, van der Weijden GA, van der Weijden GA. Stain, plaque and gingivitis reduction by combining chlorhexidine and peroxyborate. J Clin Periodontol. 2000 Jan;27(1):9-15.

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

Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. Periodontol 2000. 2005; 38:9-12.

Hallström H, Lindgren S, Yucel-Lindberg T, Dahlén G, Renvert S, Twetman S. Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis. Acta Odontol Scand. 2013 May-Jul; 71(3-4):828-33.

Hanisch O, Cortella CA, Boskovic MM, James RS, Slots J, Wikesjö UM. Experimental peri-iImplant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. J Periodontol. 1997; 68: 59-66.

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

Keukenmeester RS, Slot DE, Rosema NA, Van Loveren C, Van der Weijden GA. Effects of sugar-free chewing gum sweetened with xylitol or maltitol on the development of gingivitis and plaque: a randomized clinical trial. Int J Dent Hyg. 2014 Nov; 12(4):238-44.

Kobayashi K, Kobayashi K, Soeda W, Watanabe T. Gingival crevicular pH in experimental gingivitis and occlusal trauma in man. J Periodontol. 1998 Sep;69(9):1036-43.

Konradsson K, van Dijken JW. Interleukin-1 levels in gingival crevicular fluid adjacent to restorations of calcium aluminate cement and resin composite. J Clin Periodontol. 2005 May;32(5):462-6.

Kumar S, Patel S, Tadakamadla J, Tibdewal H, Duraiswamy P, Kulkarni S. Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and triclosan compared with chlorhexidine and triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining. Int J Dent Hyg. 2013 Feb;11(1):35-40.

Lang NP, Sander L, Barlow A, Brennan K, White DJ, Bacca L, et al. Experimental gingivitis studies: effects of triclosan and triclosan-containing dentifrices on dental plaque and gingivitis in three-week randomized controlled clinical trials. J Clin Dent. 2002;13(4):158-66.

Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental, implants: their prevention, diagnosis and treatment. Clin Oral Impl Res 2000: 11 (Suppl.): 146–55.

Li W, Wang RE, Finger M, Lang NP. Evaluation of the antigingivitis effect of a chlorhexidine mouthwash with or without an antidiscoloration system compared to placebo during experimental gingivitis. J Investig Clin Dent. 2014 Feb; 5(1):15-22.

Lindhe J, Meyle J; Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol 2008; 35(8 Suppl): 282-5.

Lorenz K, Bruhn G, Heumann C, Netuschil L, Brecx M, Hoffmann T. Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque,

gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study. J Clin Periodontol. 2006 Aug;33(8):561-7.

McKenna DF, Borzabadi-Farahani A, Lynch E. The effect of subgingival ozone and/or hydrogen peroxide on the development of peri-implant mucositis: a double-blind randomized controlled trial. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. Volume 28, Number 6, 2013; 1483-9

Melo L, Vitussi TRC, Andrade JA, Walter KG, Ferrari DS, Shibli JA. Microbiology of peri-implant diseases: literature review. Rev Odontol UNESP. 2007; 36(1):61-9.

Melo, RF. Avaliação clínica, microbiológica, imunológica e genética em pacientes com implantes osseointegrados. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, UNESP Araraquara, 2009.

Meyer S, Giannopoulou C, Courvoisier D, Schimmel M, Müller F, Mombelli A. Experimental mucositis and experimental gingivitis in persons aged 70 or over. Clinical and biological responses. Clin Oral Implants Res. 2016 Jun 23. doi: 10.1111/clr.12912

Nogueira-Filho GR, Duarte PM, Toledo S, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of triclosan dentifrices on mouth volatile sulphur compounds and dental plaque trypsin-like activity during experimental gingivitis development. J Clin Periodontol. 2002 Dec;29(12):1059-64.

Nogueira-Filho GR, Toledo S, Cury JA. Effect of 3 dentifrices containing triclosan and various additives. An experimental gingivitis study. J Clin Periodontol. 2000 Jul;27(7):494-8.

Nowzari H, Phamduong S, Botero JE, Villacres MC, Rich SK. The profile of inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid around healthy osseointegrated implants. Clin Implant Dent Relat Res 2012; 14:546–52.

Pereira SL, Barros CS, Salgado TD, Filho VP, Costa FN. Limited benefit of copaifera oil on gingivitis progression in humans. J Contemp Dent Pract. 2010 Jan 1;11(1):E057-64.

Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. Clin Oral Implants Res. 1994 Dec; 5(4):254-9.

Putt MS, Milleman JL, Davidson KR, Kleber CJ, Cugini M. A split-mouth comparison of a three-dimensional-action electric toothbrush and a high-frequency electric toothbrush for reducing plaque and gingivitis. J Int Acad Periodontol. 2001 Oct;3(4):95-103.

Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, van Steenberghe D. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. J Clin Periodontol. 2001 Dec;28(12):1127-36.

Rodrigues IS, Tavares VN, Pereira SL, Costa FN. Antiplaque and antigingivitis effect of Lippia Sidoides: a double-blind clinical study in humans. J Appl Oral Sci. 2009 Sep-Oct;17(5):404-7.

Rosema NA, Timmerman MF, Piscaer M, Strate J, Warren PR, Van der Velden U, et al. An oscillating/pulsating electric toothbrush versus a high-frequency electric toothbrush in the treatment of gingivitis. J Dent. 2005 Jun;33 Suppl 1:29-36.

Rosin M, Kähler ST, Hessler M, Schwahn Ch, Kuhr A, Kocher T. The effect of a dexibuprofen mouth rinse on experimental gingivitis in humans. J Clin Periodontol. 2005 Jun;32(6):617-21.

Rüdiger SG, Carlén A, Meurman JH, Kari K, Olsson J. Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. J Clin Periodontol. 2002 Jun;29(6):524-30.

Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF, Smith FW, Collins JG, Socransky SS, et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. Int J Oral Maxillofac Implants 1997; 12: 32-42.

Salgado AD, Maia JL, Pereira SL, de Lemos TL, Mota OM. Antiplaque and antigingivitis effects of a gel containing Punica granatum Linn extract: a double-blind clinical study in humans. J Appl Oral Sci. 2006 Jun;14(3):162-6.

Salvi GE, Aglietta M, Eick S, Sculean A, Lang NP, Ramseier CA. Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. Clin Oral Implants Res. 2012 Feb; 23(2):182-90.

Schincaglia GP, Hong BY, Rosania A, Barasz J, Thompson A, SobueT, et al. Clinical, Immune, and Microbiome Traitsof Gingivitis and Peri-implant Mucositis. J Dent Res. 2017 Jan;96(1):47-55.

Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J. Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide). A case series. J Clin Periodontol 2006; 33: 491-9.

Sekino S, Ramberg P, Lindhe J. The effect of systemic administration of ibuprofen in the experimental gingivitis model. J Clin Periodontol. 2005 Feb;32(2):182-7.

Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. The effect of a chlorhexidine regimen on de novo plaque formation. J Clin Periodontol. 2004 Aug;31(8):609-14.

Sekino S, Ramberg P. The effect of a mouth rinse containing phenolic compounds on plaque formation and developing gingivitis. J Clin Periodontol. 2005 Oct;32(10):1083-8.

Severino VO, Beghini M, de Araújo MF, de Melo ML, Miguel CB, Rodrigues WF, et al. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-33 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant mucositis and peri-implantitis. Arch Oral Biol. 2016 Dec;72:194-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.021. Epub 2016 Aug 24.

Shearer B, Hall P, Clarke P, Marshall G, Kinane DF. Reducing variability and choosing ideal subjects for experimental gingivitis studies. J Clin Periodontol. 2005 Jul;32(7):784-8.

Shibli J, Ivanovski S, Park YB, Alarcon M, Cheung KM, Duncan W, et al. Group D. Consensus report. Implants--peri-implant (hard and soft tissue) interactions in health and disease: the impact of explosion of implant manufacturers. J Int Acad Periodontol. 2015 Jan;17(1 Suppl):71-3.

Slawik S, Staufenbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stiesch M, Eberhard J. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. Eur J Clin Nutr. 2011 Jul;65(7):857-63.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. Oral Microbiol Immunol. 1989 Mar;4(1):47-51.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C., Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998 Feb;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28:12-55.

Tawse-Smith A, Duncan WJ, Payne AG, Thomson WM, Wennström JL. Relative effectiveness of powered and manual toothbrushes in elderly patients with implant-supported mandibular overdentures. J Clin Periodontol. 2002 Apr; 29(4):275-80.

Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of "high responders" and "low responders" to therapy. J Clin Periodontol. 2004 Apr;31(4):253-9.

Tsalikis L, Parapanisiou E, Bata-Kyrkou A, Polymenides Z, Konstantinidis A. Crevicular fluid levels of interleukin-1alpha and interleukin-1beta during experimental gingivitis in young and old adults. J Int Acad Periodontol. 2002 Jan;4(1):5-11.

van Dijken JW, Sjöström S. Development of gingivitis around aged restorations of resin-modified glass ionomer cement, polyacid-modified resin composite (compomer) and resin composite. Clin Oral Investig. 1998 Dec;2(4):180-3.

Versteeg PA, Piscaer M, Rosema NA, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Tapered toothbrush filaments in relation to gingival abrasion, removal of plaque and treatment of gingivitis. Int J Dent Hyg. 2008 Aug; 6(3):174-82.

Versteeg PA, Timmerman MF, Rosema NA, Warren PR, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Sonic-powered toothbrushes and reversal of experimental gingivitis. J Clin Periodontol. 2005 Dec;32(12):1236-41.

Weidlich P, Lopes de Souza MA, Oppermann RV. Evaluation of the dentogingival area during early plaque formation. J Periodontol. 2001 Jul;72(7):901-10.

Witt JJ, Walters P, Bsoul S, Gibb R, Dunavent J, Putt M. Comparative clinical trial of two antigingivitis mouthrinses. Am J Dent. 2005 Jul;18 Spec No:15A-17A.

Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB. Levels of TGFbeta1 in gingival crevicular fluid during a 21-day experimental model of gingivitis. Oral Dis. 2003 Mar;9(2):88-94.

Yates RJ, Shearer BH, Morgan R, Addy M. A modification to the experimental gingivitis protocol to compare the antiplaque properties of two toothpastes. J Clin Periodontol. 2003 Feb;30(2):119-24.

Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: a randomized trial. J Appl Oral Sci. 2010 Sep-Oct; 18(5):515-21.

Zani SR, Moss K, Shibli JA, Teixeira ER, de Oliveira Mairink R, Onuma T, Feres M, Teles RP. Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease. J Clin Periodontol. 2016 Oct;43(10):825-32. doi: 10.1111/jcpe.12586. Epub 2016 Aug 10.

Zitzmann NU, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J. Experimental peri-implant mucositis in man. J Clin Periodontol. 2001 Jun; 28(6):517-23.

Zitzmann NU, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J. Expression of endothelial adhesion molecules in the alveolar ridge mucosa, gingiva and periimplant mucosa. J Clin Periodontol. 2002 Jun; 29(6):490-5.

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. J Clin Periodontol 2008; 35(8 Suppl): 286-91.

ANEXO

UNG - UNIVERSIDADE GUARULHOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil imunológico e microbiológico da mucosite e gengivite experimentais em humanos.

Pesquisador: Magda Aline Nagasawa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58719716.7.0000.5506

Instituição Proponente: Universidade Guarulhos - UNG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.736.912

Apresentação do Projeto:

A gengivite e a mucosite peri-implantar são processos inflamatórios reversíveis que tem como etiologia, o biofilme bacteriano dental. Embora vários estudos tenham apresentados subsídios para a fundamentação teórica do biofilme dental (Zitzmann; Berglundh, 2008; Schwarz et al., 2003; Salcetti et al., 1997; Shibli et al. 2008) recentemente pesquisadores suécos (Albrektsson et al. 2014), sugeriram que o processo de perda dos implantes osseointegrados seja oriundo de um processo inflamatório do tipo corpo estranho, ou antígeno-anticorpo. Após a reação imunológica de corpo estranho, há um desequilíbrio hospedeiro-microbiota, que levaria à perda óssea e consequentemente a perda do implante. Neste ínterim, o presente projeto avaliará os perfis microbiano e imunológico da gengivite e mucosite experimental em humanos, visando comparar as similaridades ou diferenças entre os processos. Os resultados serão comparados por meio de testes não paramétricos e testes de correlação poderão fornecer possíveis interações entre os parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos. Frente aos resultados aqui obtidos, uma melhor compreensão da etiologia das doenças periodontais e peri-implantares será sine-qua-non para futuras estratégias terapêutica.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar o padrão de resposta imunológica e sua correlação com com

Endereço: Praça Tereza Cristina, 229
Bairro: Centro **CEP:** 07.023-070
UF: SP **Município:** GUARULHOS
Telefone: (11)2464-1664 **E-mail:** comite.etica@ung.br