

Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico

Jefferson Antônio Gomes

Avaliação comparativa do perfil microbiológico de pacientes antes e após extrações dos dentes e instalação de prótese fixa implantossuportada usando o método DNA *Checkerboard*.

CURITIBA
2015

Jefferson Antônio Gomes

Avaliação comparativa do perfil microbiológico de pacientes, antes e após extrações dos dentes e instalação de prótese fixa implantossuportada usando o método DNA *Checkerboard*.

Dissertação apresentada ao Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ivete A. de Mattias Sartori

Coorientador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

CURITIBA
2015

Jefferson Antônio Gomes

G633a

Avaliação comparativa do perfil microbiológico de pacientes antes e após extrações dos dentes e instalação de prótese fixa implantossuportada usando o método DNA *Checkerboard*. Curitiba, 2015.

91f. : il. ; 31cm

Dissertação (mestrado) – Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico – Programa de Pós- Graduação em Odontologia - Área de Concentração: Implantodontia. Curitiba, 2015

Orientadora: Prof^ª Dr^a Ivete A. de Mattias Sartori

Co-orientador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

Bibliografia

1. Implantes Dentários. 2. Biofilmes. 3. Biologia Molecular. 4. Prótese Dental Implantossuportada. I. Título.

Jefferson Antônio Gomes

Avaliação comparativa do perfil microbiológico de pacientes, antes e após extrações dos dentes e instalação de prótese fixa implantossuportada usando o método DNA *Checkerboard*.

Presidente da banca (Orientadora): Prof^a. Dr^a. Ivete A. de Mattias Sartori

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Tiossi

Prof^a. Dr^a. Ricarda Duarte da Silva

Aprovado em 30/11/2015

Dedicatória

À Deus por proteger minha família e a mim nas minhas inúmeras viagens, abençoando-nos com saúde e sabedoria para que eu pudesse me dedicar a este importante momento da minha vida.

Aos meus pais Nilton Antônio Gomes (*in memoriam*) e Geny Vitalina Gomes, pelo exemplo de vida, íntegros, trabalhadores, simples e extremamente dedicados aos filhos. Minha eterna gratidão por me ensinar o valor da responsabilidade, do compromisso e da dedicação. Sem os ensinamentos de vocês jamais teria chegado até aqui. Não tenho como agradecer por tudo que fizeram por mim.

À minha esposa Raquel Rodrigues Costa Gomes. Minha eterna amada, minha namorada, minha melhor amiga. A você devo tudo, pelo amor, pelo incentivo, por me ajudar nos momentos de dificuldade, por me encher de esperança quando eu mais precisava. Te amo muito, te admiro muito e agradeço pelos inúmeros momentos felizes que passamos juntos. Obrigado por ser essa mãe dedicada e cuidadosa. Isto me trouxe a tranquilidade que eu precisava quando, mesmo longe, sabia que nossos filhos estavam seguros. E mesmo eu estando longe, você sempre esteve nos meus pensamentos. Te conhecer foi uma grande sorte, te conquistar foi meu grande desafio, te amar para sempre é o meu eterno objetivo.

Aos meus filhos Marco Antônio e Pedro Afonso, presentes de Deus, razões do meu viver.

Às minhas irmãs Jucéia e Joelma, ao meu cunhado Fabrício, às minhas sobrinhas Rebecca e Paloma, aos meus sobrinhos Gustavo e Hugo. Vocês são muito importantes para mim.

A vocês dedico este trabalho

Agradecimentos

Aos meus parceiros de trabalho Dr. Élerson, Dr^a Joelma, Dr^a Simone, Dr^a Lais, Dr^a Earlane, Dr^a Juliana. Tenho orgulho de tê-los fazendo parte de minha equipe de trabalho.

A todas as minhas assistentes de trabalho, obrigado pela dedicação e por, em inúmeras situações, me representar junto ao paciente quando estava ausente.

Aos alunos da USP de Ribeirão Preto que contribuíram com o processamento microbiológico das amostras, o meu muito obrigado e o desejo de que vocês se tornem grandes profissionais.

Ao Prof. Dr. Cássio do Nascimento, obrigado pelo apoio, pela direção no trabalho e pela atenção a mim dispensada, mesmo não sendo aluno da instituição que você representa. Seu jeito simples e dedicado de ser justificam as conquistas que você vem alcançando.

Ao Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico – ILAPEO, na pessoa da Dra. Clemilda Thomé, pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado.

A todos os funcionários do ILAPEO que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do ILAPEO, obrigado pelo conhecimento que nos outorgou durante esses dois anos de curso.

Ao Dr. Geninho Thomé o meu agradecimento por nos proporcionar a oportunidade de crescer dentro da implantodontia. Você tem nome e atitude de gênio.

À minha orientadora Dra. Ivete Sartori. Devo este curso a você. Jamais teria conseguido concluir meus trabalhos não fosse pela sua ajuda, seu incentivo e por acreditar em mim. Sua genialidade me impressiona.

À Dra. Francine Able. Obrigado pela ajuda com as coletas e exames dos pacientes. Sua responsabilidade com tudo que faz me impressiona.

A todos os meus amigos e colegas da turma de mestrado, o meu muito obrigado pela convivência e amizade durante o tempo que estivemos juntos.

À minha equipe de cirurgia Alexis e Anne, que um abraço meu, apertado e carinhoso, acompanhe vocês o resto da vida. Obrigado pela amizade.

À bibliotecária Luciana Debiasi e a auxiliar de biblioteca Tânia e à radiologista Keiler a quem não dei um pingo de sossego durante todo o curso. Obrigado pela paciência e grandiosa ajuda.

A todos que contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade, o meu muitíssimo obrigado.

Sumário

Listas

Resumo

1. Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	18
3. Proposição.....	49
4. Materiais e Métodos.....	50
5. Artigo Científico.....	58
6. Referências.....	79
7. Apêndice.....	86
8. Anexos.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros clínicos de T0, T1 e T2.....	86
Tabela 2 - Avaliação clínica em T0.....	87
Tabela 3 - Avaliação clínica em T1 e T2.....	88
Tabela 4 - Profundidade de sondagem da área peri-implantar nos tempos T1 e T2.....	89

Lista de Gráfico

Gráfico 1 – Número de micro-organismos em T0, T1 e T2.....	89
--	----

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Aa – *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

°C – Grau Celsius

CEP – Pacientes completamente edêntulos

C-IS – Sujeitos com implante em função por um período de pelo menos seis meses

CIST – Terapia Cumulativa Interceptativa de Apoio

C-NI – Sujeito sem implante, mas candidato para terapia com implante

CP – Periodontite crônica

CPT – Pilar de titânio usinado

C-RI – Sujeito com implantes instalados a seis meses ou mais

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

DP – Instalação tardia dos implantes

EDTA – Ácido etileno diaminotetracético

HI – Ausência de peri-implantite

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HP – Ausência de periodontite

ILAPEO – Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico

IP – Instalação imediata dos implantes

ml – Mililitro

MPT – Pilares fundidos

N.cm – Newton centímetro

P – Valores de “P” dos testes estatísticos

PBL – Carga bacteriana periodontal

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

PEP – Pacientes parcialmente edêntulos

PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado

Pg – *Porphyromonas gingivalis*

PI – Peri-implantite

Pi – *Prevotella intermedia*

% - Porcentagem

SLA – Tratamento de superfície dos implantes Straumann

Td – *Treponema denticola*

Tf – *Tannerella forsythensis*

TE – Triácido clorídrico e etilenodiaminitetracético

T0 – Tempo de avaliação dos dentes remanescentes

T1 – Tempo de avaliação de 4 meses dos implantes em função

T2 – Tempo de avaliação de 8 meses dos implantes em função

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil microbiológico dos pacientes parcialmente desdentados antes da extração dos dentes e após a reabilitação imediata com próteses fixas mandibulares implantossuportada de arco total. Catorze indivíduos com idade entre 46 e 76 anos (média de 60 anos) foram incluídos neste ensaio clínico randomizado controlado. Parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento à sondagem) e microbiológicos (contagem microbiana) foram realizados antes da extração dos dentes (T0 – baseline) e após 4 (T1) e 8 (T2) meses dos implantes em função. Em cada tempo de avaliação, exame periodontal e peri-implantar foi realizado para registrar os parâmetros clínicos em cada sítio (mesial, medial e distal da vestibular e lingual). Amostras do biofilme do sulco periodontal e peri-implantar foram coletados com pontas de papéis estéreis. Cada amostra subgengival foi colhida expondo 6 pontas de papel durante 30 segundos no sulco periodontal e peri-implantar, 3 na vestibular e 3 na lingual, nas posições mesial, medial e distal. Trinta e nove espécies microbianas, incluindo espécies periodontopatogênicas e *Candida* spp. foram avaliadas pelo método DNA *Checkerboard*. Os valores de profundidade de sondagem T0 ($3,05 \pm 1,45$) foram significativamente maiores do que em T1 ($1,81 \pm 0,56$) e T2 ($1,66 \pm 0,53$) ($p < 0,05$). Níveis moderados de espécies patogênicas e não-patogênicas foram encontradas colonizando sítios de dentes e sítios com implantes. Amostras periodontais de T0 ($2,12 \pm 2,02$) e amostras peri-implantares de T2 ($2,20 \pm 1,63$) apresentaram maior contagem microbiana total do que amostras peri-implantares de T1 ($1,96 \pm 1,72$); $p < 0,05$. Os dados dos parâmetros clínicos e microbiológicos foram avaliados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Dunn. Os resultados revelaram diferenças em relação à diversidade microbiana e contagens de micro-organismos nos sítios dentários e relacionados com implantes ao longo do tempo. Resultados microbiológicos após 8 meses de carregamento dos implantes foram semelhantes aos encontrados no início do estudo. Os dados obtidos sugerem que a carga imediata de implantes colocados imediatamente após a extração dos dentes pode ser uma opção viável de tratamento para indivíduos desdentados com história prévia de doença periodontal. Futuros estudos poderão contribuir para elucidar o impacto da colonização microbiana no sucesso a longo prazo deste tipo de tratamento.

Palavras-chave: Implantes Dentários; Biofilmes; Biologia Molecular; Prótese Dental Implantossuportada.

Abstract

The aim of this study was to assess the microbial profile of partially edentulous patients before teeth extraction and after immediate rehabilitation with implant-supported complete fixed mandibular prostheses. Fourteen individuals aged between 46 and 76 years-old (mean 60 years) were enrolled in this randomized controlled clinical trial. Clinical (probing depth, clinical attachment level, and bleeding on probing) and microbiological parameters (microbial counts) were conducted before teeth extraction (T0 – baseline) and after 4 (T1) and 8 (T2) months of implants loading. At each evaluation time point a complete peri-implantar/periodontal examination was conducted to record clinical parameters in each site (mesial, medial and distal in buccal and lingual aspects). Biofilm samples from periodontal and peri-implantar sulci were collected with sterile paper points. Each subgingival sample was a pool of 6 paper points exposed for 30 seconds in the peri-implant or periodontal sulcus, 3 in the buccal and 3 in the lingual aspects, respectively in mesial, medial and distal positions. Thirty-nine microbial species including periodontopathogenic species and *Candida* spp. were evaluated by DNA Checkerboard analysis. Probing depth values from T0 (3.05 ± 1.45) were significantly higher than T1 (1.81 ± 0.56) and T2 (1.66 ± 0.53) ($p < 0.05$). Moderate levels of pathogenic and non-pathogenic species were found colonizing teeth and implant-related sites. Periodontal samples from T0 (2.12 ± 2.02) and peri-implant samples from T2 (2.20 ± 1.63) presented higher total microbial count than peri-implant samples from T1 (1.96 ± 1.72); $p < 0.05$. Data from clinical and microbiological parameters were evaluated by Friedman test followed by the post-test multiple comparison Dunn. The results revealed differences regarding microbial diversity and microorganisms counts from teeth and implant-related sites over time. Microbiological findings after 8 months of loading were similar to those found at baseline. Data obtained suggests that immediate loading of implants placed immediately after extraction may be a viable treatment option for edentulous individuals with previous history of periodontal disease. Further studies on this issue could contribute in elucidating the impact of the microbial colonization on the long-term success of this treatment.

Key-Words: Dental Implants; Biofilms; Molecular Biology; Implant-Supported Dental Prosthesis.

1. Introdução

Os implantes osteointegráveis, inicialmente desenvolvidos como alternativa à reabilitação protética convencional de mandíbulas totalmente edêntulas, passaram a ser opção segura para reposições de todos os tipos de perdas dentárias de maneira bastante confiável. Seu uso tem sido extensivamente descrito e apresenta alto índice de sucesso quando corretamente indicado (BRÅNEMARK, ZARB & ALBREKTSSON 1985; ALBREKTSSON et al., 1988). As melhorias que propicia no índice de satisfação de pacientes em relação às reabilitações também são descritas (THOMASON et al., 2003; MACENTEE, WALTON & GLICK 2005; ZITZMANN & MARINELLO 2001; CORÓ et al., 2011; VIEIRA et al., 2014).

No entanto, a longevidade dos implantes pode ser comprometida por trauma cirúrgico, sobrecarga oclusal e infecção peri-implantar (GALASSI et al., 2012). Após o procedimento cirúrgico, os implantes são expostos à saliva e biofilme que contém um grande número de espécies de microrganismos (CASADO et al., 2011). Estudos têm demonstrado que diversos microrganismos presentes na cavidade oral, em especial os relacionados à doença periodontal, são responsáveis pelos maiores índices de insucesso dos implantes (SBORDONE et al., 1995; ROCCUZZO et al., 2013; COMPARIN, CORÓ & CLAUDINO 2014). A presença de bactérias periodontopatogênicas nos sulcos peri-implantares e a presença de dentes com periodontite próximos a implantes dentais são considerados fatores de risco para o sucesso dos implantes (GOUVOUSSIS, SINDHUSAKE & YEUNG 1997; ROCCUZZO et al., 2013).

Sistemas de implantes com intermediários protéticos, embora sejam os mais usados, inevitavelmente apresentam espaços entre o implante e o conector protético, os quais podem servir de abrigo para microrganismos potencialmente capazes de provocar reações inflamatórias nos tecidos peri-implantares. A colonização bacteriana na porção

interna de implantes osseointegrados devido à infiltração foi demonstrada em diversos sistemas (QUIRYNEN, BOLLEN & EYSEN 1994; JANSEN, CONRADS & RICHTER 1997; PIATTELLI et al., 2001), e apesar dos constantes esforços buscando limitar as desadaptações entre os componentes, os espaços vazios, provenientes dessa adaptação, ainda atuam como armadilhas para as bactérias presentes na cavidade oral, podendo causar reações inflamatórias nos tecidos moles peri-implantares. Essas reações inflamatórias, se não controladas, podem levar ao desenvolvimento da peri-implantite, comprometendo o sucesso clínico dos implantes (JANSEN, CONRADS & RICHTER 1997). A conexão do tipo *Cone-Morse* apresenta menor infiltração em comparação aos outros desenhos de implantes devido a maior precisão no contato das paredes dos componentes com os implantes. Este melhor contato diminui os espaços entre o implante e o conector proporcionando diminuição da infiltração, segundo alguns estudos (DIBART et al., 2005; JAWORSKI et al., 2012), não sendo confirmado em outros (TEIXEIRA et al., 2011). Numa comparação entre próteses instaladas diretamente sobre o implante com próteses instaladas sobre um intermediário, as primeiras apresentaram mais complicações (HJALMARSSON et al., 2011).

Na maioria desses sistemas com intermediário protético, a plataforma do implante é posicionada ao nível ou abaixo da crista alveolar, o que expõe o tecido ósseo adjacente ao risco de uma contaminação/infecção microbiana. A união entre a superfície do implante e a mucosa é mais frágil que a união entre o dente e o tecido gengival (BERGLUNDH et al., 1991), assim as diferenças na estrutura do peri-implante e do periodonto juntamente com uma história de higiene oral pobre e edentulismo fazem com que os implantes sejam mais susceptíveis à inflamação e perda óssea que os dentes naturais quando expostos ao acúmulo de biofilme ou à invasão microbiana. Por essa razão, o selamento biológico ao

redor dos implantes é um dos objetivos para manutenção do estado de saúde peri-implantar (ALGRAFFEE, BORUMANDI & CASCARINI 2011).

Segundo estudos, as bactérias encontradas no sulco peri-implantar logo após a instalação do implante são semelhantes às presentes em infecções odontogênicas agudas. Com o decorrer do tempo, as bactérias isoladas do sulco peri-implantar se assemelham às bactérias encontradas em doenças periodontais crônicas e que a microbiota presente na cavidade oral antes da colocação de implantes é determinante para uma nova microbiota após a instalação dos mesmos (APSE et al., 1989; LEONHARDT et al., 1992). Em pacientes parcialmente desdentados, a microbiota dental parece ser uma importante fonte de bactérias. Pacientes com história prévia de doença periodontal podem apresentar uma alta prevalência de patógenos anaeróbios (KOKA et al., 1993; MOMBELLI et al., 1995). A colonização bacteriana em implantes de pacientes desdentados origina-se a partir da superfície da mucosa oral (SMEDBERG, BECK & EMBERY 1993; DANSER et al., 1997).

As técnicas moleculares de diagnóstico foram desenvolvidas durante as duas últimas décadas e têm sido extensivamente usadas na detecção e quantificação de espécies microbianas habitando a cavidade oral (EBADIAN et al., 2012; HALLSTROM et al., 2012; DO NASCIMENTO et al., 2013). Estas técnicas são mais rápidas, sensíveis e específicas quando comparadas às técnicas convencionais de cultura microbiana, que podem falhar ao detectar e identificar várias espécies frequentemente presentes na cavidade oral, microrganismos muitas vezes incultiváveis ou fastidiosos (BARBOSA et al., 2009).

A técnica de hibridização DNA *Checkerboard* (SOCRANSKY et al., 1994) utiliza sondas feitas a partir de DNA genômico, e apresenta como principal vantagem a identificação e quantificação de várias espécies bacterianas em um grande número de

amostras da cavidade oral simultaneamente. Esta técnica tem sido aplicada recentemente em diversas áreas da odontologia para avaliar a composição do biofilme bacteriano em condições de saúde ou doença (TELES et al., 2010; KIM et al., 2010; VETTORE et al., 2010) e na condução de estudos sobre a associação entre o biofilme bacteriano e fatores locais e sistêmicos (BORGES et al., 2009; DEMMER et al., 2010). A técnica também é usada para avaliar a microbiota associada com lesões endodônticas (RÔÇAS & SIQUEIRA 2010), na mudança de composição do biofilme como resultado do tratamento de terapias periodontais (HAFFAJEE et al., 2009), e na identificação e quantificação de espécies bacterianas provenientes do interior de implantes osteointegráveis (BARBOSA et al., 2009, DO NASCIMENTO et al., 2012).

Estudos procuraram determinar e monitorar o tipo de microbiota peri-implantar formada após a instalação imediata de implantes (TRIPODAKIS & NAKOU 2011; VISKIĆ et al., 2011; DEVIDES & FRANCO 2006). Outros (APSE et al., 1989, LINDEBOOM, TJIOOK & KROON 2006) já compararam colonização bacteriana enquanto havia dentes presentes e após a instalação de implantes. Embora estes estudos tenham mostrado resultados considerados satisfatórios em um curto prazo de tempo, este assunto ainda não está completamente compreendido e novas investigações são necessárias para um maior entendimento da colonização microbiana frente ao comportamento clínico dos implantes e próteses. Assim sendo, este estudo objetivou comparar a microbiota presente quando os pacientes ainda possuíam seus dentes com a existente após sua remoção e instalação de prótese implantossuportada.

2 . Revisão de literatura

2.1 Os implantes e a osteointegração

A implantodontia ganhou repercussão mundial a partir dos trabalhos e publicações de Brånemark et al. (1969) que definiram a osseointegração como a conexão direta, estrutural e funcional entre o osso vital e a superfície de titânio do implante, com capacidade de receber carga e sem tecido conjuntivo interposto entre as duas estruturas. Investigando os fatores que controlam o reparo ósseo e a estabilidade a longo prazo de implantes de titânio na restauração da função mastigatória de cães encontraram que a integridade da boa fixação do implante requer: cirurgia com o menor trauma possível dos tecidos mole e duros e limpeza química e mecânica do implante; manutenção do tecido mucoperiosteal cobrindo e isolando o implante da cavidade oral até o estabelecimento de uma barreira biológica e higiene oral, para prevenir a inflamação gengival.

Adell et al. (1981) avaliaram 2768 implantes de 371 pacientes durante um período de 15 anos. Encontraram um índice de sucesso para os implantes de 81% na maxila e de 91% na mandíbula. Foi observado uma reabsorção de 1,2 mm na crista óssea ao redor dos implantes no primeiro ano de função e perda de 0,1 mm nos anos seguintes. Os autores ressaltaram a importância do íntimo contato entre o implante e o osso para o estabelecimento da osteointegração.

Brånemark, Zarb e Albrektsson (1985) determinaram um período de 3 a 6 meses de espera para o carregamento protético dos implantes. Segundo os autores, este seria o tempo necessário para permitir uma adequada formação óssea ao redor dos implantes, evitando as infecções e a migração epitelial. Durante o período sem carga o implante

poderia permanecer estável pelo fato de não receber estímulos que provocassem movimentações, entendendo que essas poderiam comprometer a osteointegração.

Albrektsson et al. (1988) apresentaram os dados de um estudo retrospectivo multicêntrico de acompanhamento de 8.139 implantes inseridos em 14 clínicas com equipes suecas com pelo menos três anos de experiência. Concluíram que os implantes osteointegrados resultam em grau de sucesso muito elevado, cumprindo os critérios de implantes orais.

Smith e Zarb (1989) descreveram alguns critérios para a avaliação do tratamento com implantes, baseados em investigações científicas. Segundo a revisão da literatura e análise dos resultados de pesquisas os autores consideram que seis critérios devem ser observados para que o tratamento com implantes possa ser considerado sucesso clínico: 1) ausência de mobilidade do implante quando avaliado individualmente; 2) ausência de radiolusência ao redor do implante; 3) perda óssea média vertical anual não maior que 0,2 mm após o primeiro ano de função; 4) ausência de dor, desconforto ou infecção frequente na região do implante; 5) ausência de comprometimentos estéticos; 6) taxa de sucesso de 85% após 5 anos e 80% para dez anos de observação. Esses foram considerados os níveis mínimos aceitáveis para o tratamento com implantes osteointegrados.

Buser et al. (1997) avaliaram o sucesso do tratamento reabilitador com implantes durante um período de oito anos através de avaliação clínica e radiográfica em pacientes parcial ou totalmente desdentados. Foram acompanhados 1003 pacientes que receberam um total de 2359 implantes e reabilitação com próteses fixas ou removíveis. Os pacientes foram avaliados clínica e radiograficamente e os implantes classificados em osteointegrados ou com falha precoce. Treze implantes foram perdidos durante o período de cicatrização e 127 durante os oito anos seguintes de acompanhamento clínico e radiográfico. A taxa de sucesso de 90%, encontrada após 8 anos da instalação das próteses

implantossuportadas, permitiu considerar essa modalidade de tratamento viável a longo prazo.

Lindeboom, Tjiook e Kroon (2006) fizeram um estudo prospectivo e randomizado para avaliar a instalação imediata de implantes em substituição a dentes com lesões periapicais crônicas. O estudo foi conduzido no departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial do Centro Médico Acadêmico de Amsterdã. Todos os dentes tratados demonstraram sinais radiográficos de lesão periapical crônica e os pacientes foram selecionados aleatoriamente para a instalação imediata (IP) ou tardia (DP) dos implantes. Uma hora antes do procedimento cirúrgico os pacientes fizeram profilaxia antibiótica com 600 mg de clindamicina. No grupo que foi realizado implante imediato, degranulação completa da área afetada foi feita e coletada para análise microbiológica. Pontas de papel estéril foram inseridas no defeito apical e deixado por 10 segundos e encaminhado para teste bacteriano. No grupo tardio a instalação do implante foi realizada após 12 semanas. Perda da tábua óssea vestibular foi tratada com enxerto autógeno do triângulo retromolar ou região do mento e adaptação do retalho livre de tensão sobre uma membrana reabsorvível de colágeno. Após o procedimento cirúrgico bochecho com clorexidina foi utilizado durante 7 dias e os pacientes foram avaliados semanalmente durante 4 semanas. Após o período de 6 meses de cicatrização o segundo estágio foi feito com instalação de pilares protéticos. Avaliação por ressonância determinou a estabilidade dos implantes. Duas semanas após o segundo estágio a reabilitação foi realizada e as próteses cimentadas com cimento temporário. Acompanhamento e avaliação durante um ano foram realizadas com radiografias para determinar alterações no nível ósseo. Trinta e dois implantes foram colocados na região anterior da maxila (64%) e 18 implantes (36%) na região de pré-molar. Dezesete implantes (34%) foram instalados na região anterior da maxila do grupo IP e 15 (30%) implantes no grupo DP. Dois implantes no grupo de instalação imediata

mostraram mobilidade na segunda etapa cirúrgica e foram removidos sendo a taxa cumulativa de sucesso após 6 meses de 92% para o grupo IP e 100% para DP. Dentro dos limites do presente estudo, colocação imediata de implante para substituição de um único dente com lesão periapical foi um tratamento previsível. Entretanto, os autores consideram que nos casos onde a zona estética está envolvida o protocolo tardio deve ser considerado.

Crespi et al. (2007) avaliaram clínica e radiograficamente, por 18 meses, implantes com junção hexagonal externa instalados de forma imediata em alvéolos de dentes recém extraídos ou em alvéolos cicatrizados tendo todos recebido próteses provisórias imediatas. Vinte e sete pacientes receberam 150 implantes imediatos com carga imediata e 10 em alvéolos cicatrizados. Coroas provisórias foram instaladas imediatamente após a cirurgia e as próteses definitivas foram instaladas após 5 meses. Havia 9 casos de reposição unitárias, 15 próteses parciais fixas e 35 reabilitações de arcos totais, localizadas em maxilas ou mandíbulas. Com base nos dados, os autores consideraram que a técnica de carga imediata pode ser considerada procedimento de sucesso tanto em alvéolos frescos quanto cicatrizados, não havendo diferença entre esplintados ou não. No entanto, chamaram a atenção para a necessidade de condução de mais estudos.

Schwarz et al. (2010) avaliaram prospectivamente o sucesso a longo prazo de implantes carregados imediatamente na área entre os forames da mandíbula desdentada e a taxa de sucesso das próteses fixas instaladas. Cento e oitenta e cinco implantes foram instalados em 37 pacientes, sendo cinco em cada paciente. Durante o período de observação de 1 a 8 anos um total de 32 implantes apresentaram problemas e foram excluídos do estudo. Dezenove implantes foram perdidos perfazendo uma taxa de 89,7% de sobrevida. Nove implantes não osteointegraram baixando a taxa de sobrevida para 84,9%. Quatro implantes apresentaram sinais clínicos de peri-implantite. Uma única prótese fixa precisou ser removida devido a falha dos 5 implantes. Dez fraturas de estrutura

protética ocorreram e tiveram de ser modificadas. Os autores concluíram que a carga imediata funcionou bem para a maioria dos pacientes, mas apresentaram um número maior de complicações quando comparados a estudos investigando a carga tardia.

Coró et al. (2011) fizeram uma avaliação da mastigação e do índice de satisfação de 15 pacientes edentulos que receberam 5 implantes entre os forames mentuais e próteses fixas implantossuportadas de forma imediata. Os testes de performance mastigatória foram executados em quatro momentos: pré (inicial) e pós-reabilitação (dez dias, quatro e oito meses). Os autores encontraram aumento estatisticamente significativo da performance mastigatória nos momentos pós-reabilitação dez dias, quatro meses e oito meses, quando comparado aos valores iniciais. Os valores não foram significativos quando os dados dos períodos de quatro e oito meses pós reabilitação foram comparados. A habilidade mastigatória e o índice de satisfação dos pacientes apresentaram aumento estatístico para a maioria dos itens abordados quando comparados os momentos pós-reabilitação e inicial.

Vieira et al. (2014) compararam o índice de satisfação e função mastigatória de pacientes desdentados antes e após a reabilitação e avaliaram se a percepção da melhora nas condições de saúde bucal dos pacientes estavam de acordo com os testes de desempenho mastigatório. Concluíram que a reabilitação oral implantossuportada mandibular em substituição à reabilitação mucossuportada leva a uma melhora da função mastigatória e que não há coincidência entre a percepção do paciente e a melhora real na função mastigatória.

Thomé et al. (2015) realizaram um estudo randomizado controlado comparando o efeito do tipo de prótese fixa mandibular implantossuportada (com ou sem barra rígida) na estabilidade dos implantes. Vinte e nove pacientes receberam 145 implantes, 5 em cada paciente e foram divididos nos dois grupos. As estabilidades dos implantes foram analisadas por análise de frequência de ressonância nos tempos 0, 4 e 8 meses. O índice de

sucesso encontrado para os implantes e próteses foi de 100% e o tipo de prótese não mostrou ter influência nos índices de estabilidade dos implantes durante o período de observação.

2.2 Os implantes e a colonização bacteriana

Apse et al. (1989) avaliaram os tecidos moles adjacentes aos implantes osteointegrados usando métodos clínicos, bioquímicos e microbiológicos. O sulco de dentes e implantes foram comparados em 15 pacientes parcialmente edêntulos, examinando 28 sítios peri-implantares e 19 sítios periodontais e 6 pacientes edêntulos, examinando 13 sítios peri-implantares. Não foram encontradas diferenças significativas entre a microbiota dos sulcos dos implantes e dos dentes, indicando que o sulco ao redor dos dentes pode atuar como reservatório de bactérias para colonizar os implantes.

Koka et al. (1993) fizeram um estudo para avaliar a colonização de implantes dentários por bactérias periodontopatogênicas em quatro pacientes parcialmente desdentados num total de 10 implantes. Amostra de placa supragengival e subgengival foram colhidas dos implantes 14 e 28 dias após o segundo estágio cirúrgico e comparados com a placa de três dentes próximos aos implantes colhidas antes da cirurgia. Ensaios foram feitos para determinar a presença ou ausência de antígenos bacterianos para seis microrganismos periodontopatogênicos diferentes. Em geral a colonização da placa marginal dos implantes ocorreu dentro de 14 dias, ao passo que a subgengival ocorreu dentro de 28 dias. O estudo sugeriu que implantes colocados em pacientes parcialmente desdentados podem ser colonizados por bactérias associadas a doença no prazo de 14 dias após o segundo estágio cirúrgico.

Smedberg, Beck e Embery (1993) avaliaram a presença de glicosaminoglicanas no fluido do sulco peri-implantar de implantes suportando próteses fixas e removíveis. O

estudo foi realizado em 2 grupos de 10 pacientes em cada grupo. O primeiro grupo usava prótese removível e o segundo grupo prótese fixa. Tanto o índice de biofilme como o sangramento gengival foram mais frequentes em pacientes com próteses removíveis onde foram encontrados altos valores de glicosaminoglicanas. A diferença nas propriedades biomecânicas de prótese fixa e removíveis sobre implantes não parece ter reflexo na estrutura óssea medida pela presença de glicosaminoglicanas.

Danser et al. (1994) tiveram como objetivo investigar se a mucosa oral é um habitat primário para patógenos periodontais, em particular após a terapia periodontal e na ausência de biofilme. Considerando que a terapia periodontal tradicional promove melhora da condição periodontal, mas não resolve todos os casos de periodontite. Os autores propuseram usar a extração dentária como método mais previsível para eliminação de doenças periodontais. Foram incluídos no estudo oito pacientes voluntários (5 homens e 3 mulheres). Todos possuíam periodontite extremamente severa, o que já indicava a extração de todos os remanescentes dentários como única alternativa de tratamento. Em cada paciente todos os remanescentes dentários foram extraídos numa única sessão, com exceção de um paciente no qual elas foram executadas em duas sessões. Após as extrações, em todos os pacientes foram instaladas próteses totais. Não foram usados antibióticos no pós-operatório. Os pacientes foram examinados microbiologicamente em 4 ocasiões, duas antes e duas após a extração de todos os dentes. Amostras para investigação bacteriana foram obtidas com cotonetes das seguintes localizações: mucosa vestibular direita e esquerda, gengiva vestibular da maxila de primeiro pré-molar a primeiro pré-molar, mucosa do palato, dorso da língua e tonsila palatina. Além disso, 2 ml de saliva foram coletadas. Antes da extração na mucosa oral foram encontrados *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em 2 pacientes, *Porphyromonas gingivalis* em 6 pacientes e *Prevotella intermedia* e outras espécies de *Prevotella spp* em todos os pacientes. Um a três

meses após as extrações, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* não pode ser encontrada em nenhum dos pacientes, enquanto *P. intermedia* e outras espécies de *Prevotella spp* puderam ser isoladas. Segundo os autores, os resultados indicam que o habitat preferencial de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* é o biofilme subgengival. Assim, consideram parecer improvável que pacientes desdentados possuam fonte de reserva para infecção por *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*.

Mombelli et al. (1995) fizeram um estudo para determinar a presença de patógenos periodontais na microflora peri-implantar de implantes osteointegrados exposto de 3 a 6 meses no ambiente oral de pacientes previamente tratados de doença periodontal. Amostras bacterianas foram coletadas da porção mais profunda de bolsas residuais de cada quadrante em 10 pacientes antes da instalação dos implantes e em 10 pacientes antes da instalação do pilar. As amostras foram cultivadas usando técnicas anaeróbicas contínuas. Quatro pacientes foram positivos para *P. gingivalis*, 13 para *P. intermedia*, 2 para *A. actinomycetemcomitans*, 16 para *Fusobacterium spp*, 7 para *C. rectus* e 12 mostraram evidências microscópicas de espiroquetas. Após a exposição de 3 e 6 meses dos implantes no ambiente oral uma amostra foi obtida a partir do sulco peri-implantar em cada paciente. Concluíram que, em comparação com indivíduos totalmente desdentados e adultos saudáveis, os pacientes do estudo mostraram uma prevalência alta de patógenos periodontais anaeróbios na região peri-implantar após sua exposição com o meio ambiente oral.

Papaioannou et al. (1995) fizeram um estudo para examinar a relação entre a flora subgengival ao redor dos implantes e seus parâmetros periodontais. Amostras de placa de 561 implantes em 297 pacientes foram analisadas e comparadas com amostras de sítios de bolsas profundas de dentes. Em pacientes parcialmente desdentados houve uma tendência para aumento da proporção de espiroquetas e organismos móveis. Entretanto, um período

de maturação da placa pode ser necessário antes destes microrganismos serem encontrados na placa subgengival, principalmente em implantes com bolsas pouco profundas e tecido circundante saudável. Concluíram que, inicialmente a microflora subgengival dos tecidos peri-implantares é composta predominantemente por cocos, porém, com o tempo, microrganismos móveis e espiroquetas podem ser encontrados. Dos parâmetros periodontais examinados, somente a profundidade de sondagem teve relação com a composição proporcional da microflora ao redor dos implantes. Estas observações enfatizam a importância da saúde periodontal nos dentes remanescentes em pacientes reabilitados por meio de implantes e indicam a importância da manutenção de bolsas rasas ao redor dos implantes.

Sbordone et al. (1995) examinaram a microflora subgengival associada com a falha de implantes e determinaram a susceptibilidade das bactérias aos antibióticos comumente utilizados na terapia periodontal e prática odontológica. Encontraram que a atividade antibacteriana de penicilina G, amoxicilina, amoxicilina com clavulanato e a combinação de amoxicilina com metronidazol foram significativamente maiores do que os outros antibióticos testados e que estes antibióticos são eficazes para controlar infecções nos tecidos ao redor dos implantes.

Danser, Winkelhoff e Van der Velden (1997) investigaram a prevalência da microbiota sobre a superfície da mucosa oral e na bolsa peri-implantar em indivíduos desdentados com histórico prévio de doença periodontal. Usaram como parâmetros clínicos o biofilme, a presença de vermelhidão, inchaço, profundidade de sondagem da região peri-implantar e presença de sangramento à sondagem. Encontraram uma correlação entre a profundidade de sondagem e os outros parâmetros clínicos analisados. Os resultados corroboram com a sugestão de que a fonte primária de colonização dos implantes dentais em pacientes edêntulos é a membrana mucosa oral. Sugeriram que a

eliminação do ambiente subgengival pela eliminação de todos os dentes naturais provavelmente inicia o desaparecimento das duas bactérias associadas à doença periodontal, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*.

Gouvoussis, Sindhusake e Yeung (1997) investigaram a presença de organismos periodontopatogênicos em vinte e cinco sítios de dentes e implantes de nove pacientes usando as sondas de DNA para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* e *Campylobacter recta*. Cinco dos nove pacientes mostraram uma probabilidade de transmissão de dentes para sítios de implantes. Estes pacientes também mostraram um elevado número de organismos periodontopatogênicos nos sítios dos dentes avaliados. Os autores encontraram um risco significativo de transmissão para sítios de implantes na mesma boca. Um protocolo clínico adequado precisa ser desenvolvido para eliminar essa possibilidade de transmissão.

Takanashi et al. (2004) investigaram a colonização por bactérias anaeróbicas que ocorre entre a instalação do implante e a fixação das superestruturas em casos desdentados parciais. A placa dental foi coletada ao redor dos dentes naturais e implantes em 12 pacientes e *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* foram detectados utilizando a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Um mês após a instalação do pilar, a taxa de detecção de *P. gingivalis* ao redor dos implantes foi de 63,7%, e a de *P. intermedia* foi de 50,8%. Seis meses após ajuste na superestrutura, a taxa de detecção de *P. gingivalis* de ao redor dos implantes foi de 56,8%, e a de *P. intermedia* foi de 41,1%. Os padrões de segmentação do DNA cromossômico isoladas de *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram comparados através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), e os padrões nos dentes naturais estavam em conformidade com as dos implantes em 3 de 4 casos (75,0%) para *P. gingivalis* e todos os casos para *P. intermedia*. Esta constatação sugeriu que a

colonização bacteriana ao redor de implantes ocorreu logo após o mesmo ser exposto à cavidade intra-oral e às bactérias que estavam em torno dos dentes naturais.

Quirynem et al. (2005) avaliaram clínica e radiograficamente 37 pacientes edentados após 10 anos da instalação de prótese implantossuportada. Os pacientes foram divididos em dois grupos, sendo que o primeiro grupo recebeu próteses removíveis do tipo *overdenture* e o segundo grupo recebeu próteses totais fixas. Um mesmo periodontista analisou o biofilme bacteriano em quatro sítios dos implantes dentais, presença de sangramento, profundidade de sondagem e nível de recessão tecidual. Amostras bacterianas foram colhidas da região subgengival de dois implantes de cada paciente e analisadas pela técnica de hibridização DNA *Checkerboard*. Após 10 anos de carga, a microbiota de ambos os grupos apresentaram alta prevalência de *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis*, bactérias potencialmente causadoras de doença peri-implantar. Concluíram que ambos os tratamentos reabilitadores apresentam viabilidade da manutenção dos implantes.

Agerback, Lang e Persson (2006) fizeram um estudo comparando o padrão bacteriano presente em sítio de implantes e dentes em indivíduos mantidos na terapia de suporte periodontal. Tiveram como objetivo comparar a microflora oral em locais de implantes e dentes em indivíduos participantes de um programa de manutenção periodontal e testar se existe algum impacto do tabagismo e gênero na microflora nos sítios de implantes e dentes. A população do presente estudo consistiu de 56 indivíduos que contabilizaram um total de 127 implantes identificados entre os 224 indivíduos participantes de um programa de terapia periodontal de suporte. Estes indivíduos apresentaram história prévia de periodontite e participavam do programa há mais de 4 anos. Os dados foram analisados considerando o sexo, tabagismo (fumante ou não fumante), sangramento à sondagem, profundidade de sondagem de bolsa e identificação

dos microrganismos pelo método de DNA-DNA hibridação *checkerboard*. Amostras foram coletadas da região mesio-vestibular de todos os dentes e implantes usando uma cureta estéril para cada amostra. As amostras foram colocadas em tubos individuais contendo 0,15 ml de TE (10 mM de Tri-Ácido Clorídrico, 1 mM de EDTA, pH 7.6). As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Oral da Escola Dental da Universidade de Beme onde foi analisada pelo processo de hibridação *Checkerboard*. Desconsiderando a profundidade de sondagem, a análise estatística não demonstrou diferença estatística na carga bacteriana total das 40 espécies estudadas entre os sítios de implantes e dentes. Os autores concluíram que sangramento à sondagem e tabagismo não tiveram impacto na microflora bacteriana em locais de implante, mas influenciaram a carga bacteriana nos locais de dente. Na sondagem da profundidade de bolsa os sítios dentários abrigaram mais bactérias que os sítios de implantes. Bolsas de 4 mm influenciaram a distribuição e os valores das cargas bacterianas o que explica a presença tanto em dentes quanto em implantes.

Devides e Franco (2006) tiveram como objetivo analisar a presença das bactérias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* por meio da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em pacientes totalmente desdentado antes e após a instalação de próteses fixas mandibulares implanto-suportadas submetidos a carga imediata. A amostra foi constituída de 15 indivíduos, sendo 8 do gênero feminino e 7 do gênero masculino com idade média de 59,9 anos a partir dos seguintes critérios de inclusão: edentulismo completo, intenção de reposição dos dentes com próteses implanto-suportadas e consentimento em participar do estudo. Foi instalado em cada indivíduo cinco implantes Titamax entre os forames mentuais. Foram instalados Mini-pilares Cônicos os quais foram submetidos a carga imediata. Não foram administrados antibióticos ou anti-sépticos bucais nos 3 meses que antecederam a coleta da amostra, e todos os indivíduos

foram submetidos a radiografias de acompanhamento durante o estudo. Três amostras de filme bacteriano foram recolhidas a partir de três locais selecionados nos rebordos mandibulares edêntulos antes da colocação dos implantes. Durante a obtenção das amostras, os locais foram isolados com gaze estéril que cobriram as superfícies da mucosa oral sobre a crista alveolar mandibular. As amostras foram coletadas, esfregando a mucosa em 3 pontos padronizados com pontas de papel estéreis com identificação do paciente e área coletada. Os implantes foram numerados de 1 a 5 da direita para esquerda para permitir a padronização clínica e radiográfica. Quatro e seis meses após a instalação dos implantes e fixação das próteses avaliação clínica da higiene oral e sondagem periodontal foram feitas. A placa bacteriana e o cálculo supragengival foram removidos com curetas plásticas. Em cada paciente 3 sítios do sulco peri-implantar tiveram suas amostras de biofilme coletadas e colocados em tubos plásticos a -20°C . Noventa amostras da cavidade oral de 15 indivíduos foram analisadas, durante o pré-tratamento e 4 e 6 meses após a instalação das próteses implanto-suportadas. Nos 5 pacientes que perderam seus dentes por causa da periodontite, *P. gingivalis* foi a bactéria mais frequentemente encontrada no sulco peri-implantar após 4 e 6 meses da instalação dos implantes, *A. actinomycetemcomitans* foi encontrada em 3 dos 5 indivíduos 6 meses após a instalação dos implantes, sendo o microorganismo predominante no sulco perimplantar. Para *P. intermedia* não houve diferenças significantes antes e após 4 e 6 meses após a instalação dos implantes. Nas amostras dos pacientes completamente edêntulos, antes da instalação dos implantes, 13,3% apresentaram *A. actinomycetemcomitans* e 46,7% com *P. Intermedia*, *P. gingivalis* não foi encontrada. Após a instalação dos implantes e aplicação de carga imediata, *A. Actinomycetemcomintans* foi encontrado em 60% das amostras após 4 meses e 73,3% das amostras após 6 meses; *P. gingivalis* foi detectada em 46,7% e 53,3%; e *P. intermedia* em 46,7% e 53,3% respectivamente. Os autores concluíram que

não houve evidência clínica e radiográfica de doença perimplantar nos pacientes reabilitados com próteses implanto-suportadas.

Kocar, Seme e Hren (2010) caracterizaram a flora bacteriana normal e avaliaram a presença de bactérias periopatogênicas ao redor de implantes e sua correlação com a flora periodontal de pacientes completamente edêntulos. Cinquenta e três pacientes foram tratados com implantes usando o sistema de dois estágios e não apresentavam sinais clínicos e radiográficos de peri-implantite. Todos os pacientes tinham sido reabilitados proteticamente nos últimos 12 meses. Nenhum paciente recebeu profilaxia periodontal após a instalação dos implantes e nenhum antibiótico foi usado nos dois meses que antecederam o estudo. Os pacientes foram divididos em dois grupos baseados na presença de dentes naturais: Pacientes completamente edêntulos (CEP) $n=19$ e pacientes parcialmente edêntulos (PEP) $n= 34$. Os pacientes parcialmente edêntulos foram divididos em dois subgrupos baseados em sua condição periodontal: o primeiro subgrupo consistia de 19 pacientes que tinha bolsa periodontal menor ou igual a 4 mm e o segundo subgrupo com 15 pacientes apresentando profundidade de bolsa acima de 4 mm. Amostras para determinação das bactérias predominantes foram feitas em todos os pacientes examinados. No caso de múltiplos implantes num mesmo paciente, cultura do fluído do sulco foram realizados para implantes com sulco peri-implantar de até 4 mm, sendo o principal critério de exclusão da amostra devido a sinais clínicos de peri-implantite. Nos PEP que apresentavam dentes com bolsas profundas e sangramento gengival positivo os implantes adjacentes eram eliminados do estudo. Nos CEP amostras foram colhidas da gengiva alveolar e sítios peri-implantares e examinadas pela reação da polimerase em cadeia. As amostras foram colhidas com duas pontas de papel estéreis inseridas no sulco por 10 segundos, sendo uma usada para cultura e outra para PCR. As amostras foram processadas em laboratório e os resultados mostraram que no sulco peri-implantar normal a flora

bacteriana consiste predominantemente de estreptococos oral. A presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* são comuns em sulcos peri-implantares saudáveis de pacientes parcialmente edêntulos. Este estudo encontrou que estas bactérias estavam ausentes do sulco peri-implantar de pacientes completamente edêntulos e peri-implantite em pacientes completamente edêntulos não pode ser iniciada por estas bactérias.

Vettore et al. (2010) identificaram uma medida clínica periodontal que se correlacionou com a presença de bactérias do complexo vermelho, geralmente associadas com a doença periodontal. Parâmetros clínicos foram gravados em 116 mulheres pós-parto em seis sítios de todos os dentes, excluindo os terceiros molares. Duas amostras de placa subgengival por indivíduo foram coletadas e analisadas para 39 espécies bacterianas usando a técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. A carga bacteriana periodontal (PBL) foi calculada como a soma de todas as medidas de profundidade de bolsa de 4mm e sítios com nível de inserção clínico de 4mm. A associação dos resultados clínicos e bacterianos foi analisada usando o coeficiente de correlação de Spearman e teste de Kruskal-Wallis. Concluíram que a carga bacteriana periodontal (PBL) parece ser uma medida confiável do estado periodontal em mulheres pós-parto.

Casado et al. (2011) avaliaram a presença de periopatógenos em sítios subgengivais de peri-implante em pacientes parcialmente desdentados usando procedimentos de reação da polimerase em cadeia, em relação a áreas com sinais clínicos e radiográficos de saúde e áreas que apresentavam peri-implantite. Trinta pacientes desdentados não fumantes com idades entre 30 e 76 anos foram incluídos neste estudo e divididos em três grupos de acordo com suas características clínicas e radiográficas. O grupo A foi constituído por pacientes com saúde do peri-implante, o grupo B por pacientes que apresentavam mucosite do peri-implante e o grupo C por pacientes com peri-implantite. Em cada grupo havia de

10 participantes. Os tecidos do peri-implante foram analisados no que concerne à cor das mucosas, presença de placa bacteriana, profundidade e sangramento na sondagem e supuração. O histórico de doença periodontal também foi considerado. A análise radiográfica avaliou a presença de perda óssea em torno do implante. Amostras de fluido crevicular peri-implante foram coletadas a fim de analisar a presença de patógenos periodontais, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*. Os resultados mostraram que o histórico de doença periodontal está associado à peri-implantite. As bactérias *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Td* e *Tf* estavam presentes em locais de peri-implante clínica e radiograficamente caracterizados, como tecidos de peri-implante saudáveis, mucosite e peri-implantite. Os autores concluíram que *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Td* e *Tf* estão presentes em condições saudáveis e doentes. Portanto, esses patógenos periodontais não estão rigorosamente relacionados a locais de peri-implantite.

Sato et al. (2011) estudaram a taxa de detecção e o número de bactérias periopatogênicas encontradas em diferentes níveis de lesões tratadas pela Terapia Cumulativa Interceptativa de Apoio (CIST) com o objetivo de caracterizar a peri-implantite sob o ponto de vista bacteriológico. O estudo foi realizado no Departamento de Periodontia e Implantodontia Oral e Maxilofacial do Hospital Dental da Universidade Tsurumi no Japão. Um total de 105 indivíduos (42 homens e 63 mulheres com média de idade de 53,7 anos) que tinham tanto dentes naturais residuais como implantes com peri-implantite foram selecionados. Os pacientes não possuíam doenças sistêmicas e não fizeram uso de antibióticos nos 6 meses que antecederam o estudo. Nenhum dos participantes tinha recebido tratamento periodontal, com exceção de raspagem, nos últimos 4 anos. Foram feitas sondagens da profundidade de bolsa peri-implantar, avaliação do índice de placa, presença de pus e mobilidade dentária. Defeitos ósseos foram avaliados

com radiografias e não foi considerada oclusão traumática nos implantes examinados. Seguindo os resultados desta avaliação 105 implantes foram classificados em A, B, C e D de acordo com a classificação CIST. A distribuição dos implantes ficou como segue: 21 implantes em CIST-A; 38 implantes em CIST-B; 17 implantes em CIST-C e 29 implantes em CIST-D. As coletas de bactérias foram feitas inserindo uma ponta de papel estéril no fundo da bolsa por 30 segundos e após colocado num tubo e armazenado a -20 C. As análises foram usadas para detectar 4 espécies periopatogênicas: *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis* e *A. actinomycetemcomitans*. A taxa de bactérias das amostras foi identificada pela reação da polimerase em cadeia. As taxas de *P. gingivalis* nos grupos CIST-A, CIST-B, CIST-C e CIST-D foram de 4,8%, 30,9%, 25,0% e 86,2% e os de *T. denticola* foram de 9,5%, 36,3%, 33,3% e 75,9% respectivamente. O grupo CIST-D apresentou maiores taxas de detecção de *P. gingivalis* e *T. denticola* em comparação com os outros, enquanto nos CIST-B e CIST-C nenhuma diferença significativa foi observada. Por outro lado, a taxa de detecção de *T. forsythensis* aumenta com a gravidade da doença peri-implantar: 9,5%, 27,2%, 40,0% e 75,9% nos CIST-A, CIST-B, CIST-C e CIST-D, respectivamente. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado apenas no grupo CIST-D, a uma taxa de 13,8%. A taxa de detecção e o número de bactérias periodontopatogênicas foram associados aos níveis CIST. O aumento quantitativo dos patógenos periodontais foram fortemente associados com a transição da mucosite peri-implantar para peri-implantite. Por outro lado, CIST-D mostrou uma maior taxa de detecção de bactérias periopatogênicas. Os resultados deste estudo demonstram fortes relações entre patógenos periodontais e doença peri-implantar.

Tripodakis e Nakon (2011) estudaram as mudanças na microflora subgingival antes da extração dos dentes severamente comprometidos pela periodontite e um ano após a instalação de implante imediato e provisório, sem elevação de retalho. A melhoria clínica

dos tecidos moles encontrada foi compatível com uma microflora menos patogênica. As concentrações de periodontopatógenos nos sítios periodontais foram fortemente reduzidos quando transformados em peri-implantes, ao passo que a contagem de microrganismos benéficos foi aumentada.

Viskić et al. (2011) avaliaram a instalação imediata de implantes em sítios de dentes infectados. Instalaram dois implantes num paciente que necessitou de extração dos dentes inferiores e confecção de prótese total superior e inferior. A análise de seis meses após a instalação dos implantes não mostrou alterações significativas e a reabsorção estava dentro dos valores normais. Embora controverso, os autores sugerem que a implantação imediata em locais infectados pode ser um procedimento seguro e previsível se protocolos cirúrgicos forem seguidos.

Ebadian et al. (2012) fizeram uma análise microbiológica com o objetivo de comparar a prevalência de 10 espécies de bactérias associadas a periodontites em indivíduos iranianos com casos de periodontite crônica e peri-implantite, através do método de hibridização DNA-DNA *checkerboard*. Periodontite crônica e peri-implantite são doenças multifatoriais de dentes, implantes e seus componentes. Invasão bacteriana e consequente resposta imune parece desempenhar um papel relevante na patogênese. As diferenças estruturais entre dentes e implantes propõe preferência da colonização do biofilme. Entre os 363 selecionados para tratamento especializado, 294 foram excluídos pelos seguintes critérios: Presença de doenças bucais, exceto periodontite, em simultâneo tratamento ortodôntico, presença de doenças sistêmicas, doenças que conduziam a uma alteração do sistema imune, diabetes *mellitus*, hepatite, HIV positivo, pacientes sob tratamento quimioterápico, gravidez, lactação, implantes com diferentes superfícies, exceto a SLA, implante utilizados para sobredentaduras (overdenture), implantes inseridos com tratamentos suplementares (elevação do seio maxilar) ou por profissional inexperiente e

pacientes em uso de anti-inflamatórios e antibióticos. Foram feitos os exames clínicos e radiográficos em 69 indivíduos e esses foram divididos em quatro grupos: Periodontite crônica CP(n=22), ausência de Periodontite HP (n=21), peri-implantite PI (n=13) e ausência de peri-implantite HI (n=13). A média de idade foi de 45,6 anos, sendo 55% do sexo feminino e 45% do masculino. Amostras bacterianas foram coletadas por pontas de papel e enviadas para o Instituto de Odontologia da Universidade de Gothenburg (Suécia) para teste de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Testes *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* foram usados para comparar a distribuição das bactérias nos quatro grupos. Diferenças significantes foram observadas para *T. forsythia*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *P. endodontic*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *P. tannerae*. A maior prevalência em CP e PI foram *T. forsythia* e *P. gingivalis* respectivamente. Concluindo, a prevalência bacteriana difere significativamente entre dente e implante. A maior prevalência bacteriana na subpopulação Iraniana não necessariamente tem semelhanças com outras populações. O tipo de superfície do implante pode influenciar no biofilme. Outros estudos devem ser conduzidos para confirmar esses achados.

Aoki et al. (2012) investigaram a associação entre a colonização de bactérias periodontopatogênicas no sulco gengival de dentes naturais e no sulco de implantes para esclarecer a origem da colonização bacteriana nos sulcos peri-implantares. Vinte e um pacientes (5 homens e 16 mulheres) que receberam implantes dentários no Colégio Dental de Tóquio foram incluídos neste estudo. Em todos os casos a perda dental tinha sido por fatores congênitos ou periodontite. Todos os pacientes receberam terapia periodontal antes da instalação dos implantes, incluindo dos dentes adjacentes e os que ocluíam com os dentes implantados. A profundidade de sondagem dos dentes naturais foi inferior a 4 mm. Nenhum paciente apresentou peri-implantite durante o período experimental. Amostras de placa bacteriana subgengival dos dentes naturais foram coletadas antes da cirurgia de

segundo estágio. Considerando que em estudo anterior (TAKANASHI et al.) já haviam encontrado *Porphyromonas gingivalis*(Pg) em taxa de 63,7% no sulco peri-implantar um mês após a cirurgia de segundo estágio e que a recolonização da área subgengival por microorganismos dentro de 2-8 semanas após o tratamento, traçaram a metodologia. Assim, amostras dos sulcos implantares foram obtidas duas semanas após a cirurgia de segundo estágio e armazenadas a – 20° C para análise com *primers* específicos através da Reação da Polimerase em Cadeia. A taxa de detecção para *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *F. nucleatum* nas amostras subgengivais dos dentes naturais foram de 36,5%, 47,6%, 39,7%, 28,6%, 34,9% e 68,3%, respectivamente; e nos sítios com implantes foram 28,5%, 61,9%, 33,3%, 23,8% 47,6% e 76,1% respectivamente. A relação entre a detecção de bactérias periodontopatogênicas em torno dos dentes naturais e dos implantes foram analisadas pela análise de regressão logística múltipla. Os resultados revelaram a detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *F. nucleatum* detectada no sulco implantar foi correlacionada com a detecção no sulco gengival de dentes adjacentes. Detecção de *Tannerella forsythia* no sulco peri-implantar não mostrou associação com a do sulco gengival de dentes naturais. Os achados sugerem que a colonização no sulco peri-implantar foi afetada pelos microorganismos presentes no sulco gengival de dentes adjacentes.

Galassi et al. (2012) compararam a viabilidade prática do substrato fluorogênico específico de *P. gingivalis* com métodos atualmente usados (cultura e Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real) para a detecção de *P. gingivalis* de amostras de saliva e placa de sítios peri-implantares de indivíduos com peri-implantite e sadios. Adicionalmente, os autores testaram a hipótese da presença de *P. gingivalis* na saliva poderia estar associada com a infecção de sítios peri-implantares e, assim, usar a saliva como

diagnóstico para o estado de saúde peri-implantar. Noventa e sete indivíduos adultos (faixa etária de 29-80 anos) foram incluídos no estudo. A população do estudo consistiu de um grupo controle com saúde periodontal e sem implantes, um grupo com implantes e sem peri-implantite e pacientes com peri-implantite encaminhados para diagnóstico e tratamento da condição peri-implantar. A definição e diagnóstico da doença peri-implantar foi baseada em critérios clínicos e radiográficos previamente estabelecidos: Mucosite peri-implantar (presença de inflamação da mucosa sem sinais de perda óssea) e peri-implantite (caracterizada por perda de mais de 2 mm de altura óssea). O grupo controle incluiu indivíduos que não mostraram sinais radiográficos de perda óssea alveolar. A presença de gengivite não foi um critério de exclusão para o grupo controle. Os parâmetros clínicos avaliados incluíram o número de dentes e o número de implantes presentes, sondagem da profundidade de bolsa, recessão gengival e sangramento à sondagem em seis diferentes sítios de cada dente e implante presente, excluindo terceiros molares. Com base nas medições periodontais e radiografia dos dentes o grupo controle foi dividido e três subgrupos: sujeitos sem implante mas candidato para terapia com implante (C-NI); sujeitos com implantes colocados a seis meses ou mais (C-RI) e sujeitos com implante em função por um período de pelo menos 6 meses (C-IS). Foram classificados em fumantes os indivíduos que fumavam pelo menos um cigarro ao dia e não fumantes aqueles que nunca fumaram ou haviam parado a pelo menos três meses antes do estudo. A população do estudo foi composta por cinco grupos como segue: grupo com mucosite peri-implantar (n=20), grupo com peri-implantite (N=20), grupo com periodonto saudável e sem implante (C-NI) (n=19), grupo com instalação recente do implante (C-RI) (n=19) e grupo com implante saudável por pelo menos 6 meses (C-IS) (n=19). Os autores concluíram que as técnicas parecem adequadas para a detecção de *P. gingivalis* tanto nas amostras de placa

quanto de saliva. No entanto, com todas as três técnicas, *P. gingivalis* não foi muito específica para os casos de peri-implantite.

Prakash et al. (2013) coletaram amostras de placa subgengival de um paciente parcialmente desdentado utilizando pontas de papel absorvente numa bolsa peri-implantar com profundidade de sondagem de 8-9 mm e de um dente com bolsa de 6 mm. Cinco patógenos periodontais foram analisados: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrecens*, *T. denticola* e *T. forsythia* usando o método de reação da Polimerase em Cadeia (RT-PCR). Encontraram 3 vezes mais *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrecens* no sítio peri-implantar e 2 vezes mais *T. denticola*. *T. forsythia* foi encontrada em pequena quantidade no sítio peri-implantar e estava ausente na bolsa periodontal dentária. Concluíram que o controle adequado da infecção antes da instalação de implantes em indivíduos parcialmente desdentados pode prevenir complicações bacterianas precoces e o monitoramento clínico contínuo dos dentes remanescentes mantendo-os livre de infecções vão ajudar na longevidade dos implantes.

Comparin, Coró e Claudino (2014) fizeram uma revisão de literatura e relato de caso clínico abordando as doenças peri-implantares. Consideraram que, para o tratamento da peri-implantite, deve-se considerar a configuração do defeito peri-implantar. Os defeitos circunferenciais parecem ser os mais promissores quando tratados com regeneração óssea guiada, assim como as fenestrações e deiscências. Para defeitos horizontais é indicado reposicionamento apical do retalho, com osteoplastia e implantoplastia. O preenchimento dos defeitos peri-implantares pode ser feito com osso autógeno particulado ou em bloco, substitutos ósseos sintéticos, alógenos ou xenógenos. Os autores concluíram que a associação de técnicas parece ser eficaz para a resolução da peri-implantite e que um programa eficaz de suporte e manutenção pós-tratamento é fundamental para o diagnóstico precoce e para garantir a saúde peri-implantar a longo prazo.

Roccuzzo et al. (2014) compararam os resultados a longo prazo de implantes com tratamento de superfície (SLA) instalados em pacientes que fizeram tratamento prévio de periodontite e em pacientes saudáveis. Concluíram que os implantes com tratamento de superfície (SLA) com um rigoroso controle periodontal oferecem resultados previsíveis a longo prazo. Entretanto, pacientes com histórico de periodontite que não aderiram totalmente à terapia de suporte periodontal necessitaram de procedimentos e antibióticoterapia adicionais.

2.3 Adaptação dos conectores protéticos aos implantes

Quirynen et al. (1994) examinaram *in vitro* a existência de infiltração microbiana ao longo de componentes do sistema Brånemark. Trinta e dois conjuntos implante/conectores estéreis foram apertados com força constante de 10 Ncm e colocados em meio líquido contendo sangue e previamente inoculado com microrganismos da microbiota oral. Para examinar a infiltração na interface implante/conector, 16 amostras dispostas duas a duas foram parcialmente imersas. As 16 restantes, também dispostas duas a duas, foram totalmente submersas para observar a infiltração na interface implante/conector e ao longo do parafuso do conector. Cabe ressaltar que uma das amostras de cada par recebeu em seu interior uma solução salina, enquanto a outra foi imersa com a parte interna seca. Após sete dias de inoculação anaeróbica, os microrganismos eventualmente presentes na parte interna dos implantes foram coletados e incubados em placas com Ágar Sangue em condições anaeróbicas. Foram encontrados microrganismos em todas as amostras, e em maior quantidade nas que foram totalmente imersas, quando comparadas às que foram parcialmente imersas, indicando que a infiltração bacteriana, inclusive de microrganismos de maior diâmetro, como o *Fusobacterium nucleatum*, parece existir em ambos os níveis. Muitas bactérias que

penetram através da interface implante/conector estão associadas à peri-implantite. Desta forma, os autores defendem a esterilização do pilar previamente à instalação e a desinfecção da parte interna do implante.

Jansen, Conrads e Richter (1997) relataram que os sistemas de implantes de dois estágios podem apresentar mais gaps entre o implante e pilar atuando como nicho para bactérias, desencadeando reação inflamatória no tecido mole peri-implantar. O estudo avaliou várias combinações pilar-implante que foram expostas à cultura microbiana *in vitro*. Todos os sistemas testados apresentaram infiltração microbiana.

Sartori (1999) comparou a estabilidade que se estabelece entre intermediários estéticos de diversas empresas (Nobel Biocare, 3i e conexão fabricados em ouro; e Conexão e Carbontec fabricados em plástico) e seus respectivos cilindros protéticos. A adaptação marginal, observada em microscópio ótico, encontrou medidas que variaram de 5,7 a 10,49 μm quando os cilindros eram fabricados em ouro e de 17,8 μm a aproximadamente 20 μm quando fabricados em plástico. Após as leituras iniciais, os cilindros receberam enceramentos, foram incluídos e fundidos com ligas à base de ouro, de prata/paládio e de níquel/cromo, e novamente analisados. As medidas variaram de 5,8 a 20,4 μm quando os cilindros de ouro foram fundidos com as ligas de ouro e prata/paládio, e de 32,1 a 141 μm quando os cilindros de plástico foram fundidos com a liga de níquel/cromo. Os resultados demonstraram que os cilindros usinados em plástico sofrem variabilidade de comportamento em relação à estabilidade dimensional das margens, em grau maior do que os cilindros usinados em ouro.

Piattelli et al. (2001) realizaram um estudo comparando o grau de penetração bacteriana de fluídos orais em dois sistemas de implantes diferentes, 12 amostras com o conector protético apenas rosqueável e 12 amostras com o componente cimentado. A microscopia eletrônica revelou que o gap entre o implante e o componente rosqueável

variou entre 2 e 7 mm, e nos cimentados 7 mm. Nos cimentados, o gap foi totalmente preenchido pelo cimento. Testes de infiltração marginal usando azul de toluidina e cultura microbiana mostraram que a penetração do corante e dos microrganismos ocorreram apenas pela interface implante/conector protético e para os espaços internos do sistema rosqueável. Os autores concluíram que os conjuntos com conectores cimentados apresentam melhores resultados em relação à penetração bacteriana e fluídos comparados aos rosqueáveis.

Dibart et al. (2005) testaram, *in vitro*, o vedamento proporcionado pelo cone de travamento utilizado na conexão implante-pilar para avaliar se o mesmo era capaz de prevenir a invasão de microrganismos orais. Em implantes onde o *microgap* estava presente, a infiltração de microrganismos pode levar à inflamação e perda de osso. Concluíram que o vedamento proporcionado pelo desenho do cone de travamento tem se mostrado hermético em relação à invasão bacteriana *in vitro*.

Teixeira et al. (2011) fizeram um estudo para investigar a infiltração de *Staphylococcus aureus* através da interface pilar-implante pela interface pilar-implante pelo método de cultura de bactérias e comparar a taxa de infiltração de dois tipos diferentes de conexão pilar-implante. Concluíram que a infiltração *in vitro* do *Staphylococcus aureus* através da interface pilar-implante ocorreu tanto em implantes cone *Morse* como em implantes Hexágono Interno.

Do Nascimento et al. (2012) avaliaram a infiltração bacteriana de saliva humana para a parte interna dos implantes ao longo da interface implante-pilar em condições de aplicação e sem aplicação de carga, usando o método DNA *Checkerboard*. Sessenta implantes, sendo 20 hexágonos externos, 20 hexágonos internos e 20 cones *Morse* foram usados. Cada grupo foi dividido em 2 grupos de 10 implantes com aplicação de carga e 10 implantes estáticos. Os conjuntos foram imersos em saliva e carregados com 500.000

ciclos de 120 N (grupo 1) e mantidos em condições estáticas (grupo 2), incubados durante 7 dias a 35° C. Os microrganismos foram encontrados nas superfícies internas de todos os tipos de conexões. A conexão *cone Morse* apresentou a menor contagem de microrganismos em ambos os grupos. Implantes submetidos a carga apresentaram maior contagem de microrganismos que os que não tiveram carga nas conexões hexágono interno e externo.

Do Nascimento et al. (2012) avaliaram a frequência de detecção de contaminação bacteriana da saliva humana na superfície interna dos implantes pela interface implante-pilar, sem aplicação de carga, usando o método de cultura DNA *checkerboard*. Concluíram que a ocorrência de infiltração bacteriana através da interface implante-pilar pode ser detectada tanto pelo método de hibridização DNA *checkerboard*, como por métodos de cultivo convencional.

Jaworski et al. (2012) comparou *in vitro* implantes hexágono externo e *cone Morse* com relação à vedação bacteriana entre os pilares e implantes. Os implantes e suas conexões foram inseridos a um tubo de ensaio e esterilizados por radiação gama. Em seguida, através de um furo apical foi inoculado *Escherichia coli*. As amostras foram analisadas diariamente quanto a evidência de contaminação. Dentro de um período de 14 dias, 60% e 30% das amostras do grupo hexágono externo e *cone Morse* foram contaminadas respectivamente. Após este período não houve mais contaminação. Concluíram que os dois sistemas exibiram contaminação bacteriana, sendo que os implantes *cone Morse* neste estudo proporcionaram uma melhor vedação externa bacteriana do que os implantes de hexágono.

Do Nascimento et al. (2013) avaliaram *in vivo* a adesão de *Candida spp* na superfície de pilares de titânio usinados, fundidos e de zircônia. Seis indivíduos saudáveis com idade entre 21 e 27 anos foram incluídos neste estudo clínico. Os indivíduos

selecionados não tinham sinais clínicos de doenças na mucosa oral e gengiva e profundidade de sulco menor que 3 mm, sem sinais clínicos de inflamação. Critérios de exclusão incluíram gravidez, lactação, tratamento periodontal ou uso de antibiótico nos 3 meses anteriores, fumantes habituais ou qualquer doença sistêmica que pudesse influenciar a condição periodontal. O estudo foi realizado em três fases de acordo com o substrato avaliado. Os participantes foram instruídos a usar uma tala intraoral contendo quatro discos (3 de titânio e 1 de zircônia) do mesmo substrato testado durante 24 horas. Dois discos foram localizados na região anterior e dois na parte posterior. Método de hibridação DNA *Checkerboard* foi utilizado para detectar e quantificar cinco diferentes espécies de *Cândida*. Os dados sobre a rugosidade da superfície e a superfície total dos discos abrangidos pelo biofilme formado também foram fornecidos para correlacionar as espécies e biofilme encontrado entre diferentes substratos. Zircônia apresentaram os maiores valores de rugosidade superficial. A área total coberta pelo biofilme não foi diferente entre os grupos testados. Moderado a altos níveis de micro-organismos alvo foram registrados para todos os substratos testados. Zircônia apresentaram os menores índices, seguido de titânio puro usinado e titânio polido. *Candida albicans* e *Candida krusei* não foram detectados no grupo de zircônia. Os autores encontraram uma diferença significativa na contagem total de células nos três grupos analisados. CPT apresentou as contagens médias mais elevadas, seguidos por MPT e zircônia. Não houve correlação positiva entre a contagem de células registrados e a rugosidade da superfície ou área total de formação de biofilmes.

2.4 Métodos de detecção microbiológica

Pitcher e Saunders, (1989) descreveram um método rápido para isolamento e purificação de DNA genômico bacteriano. Um total de 215 cepas bacterianas

representando espécies de *Campylobacter spp*, *Mebacterium cory*, *Escherichia spp*, *Legionella spp*, *Neisseria spp*, *Staphylococcus spp* e *Streptococos spp* foram lisadas com tiocianato de guanídio. O DNA foi preparado utilizando outros três reagentes e um passo de centrifugação a alta velocidade. Conseguiram um DNA de alta pureza, de velocidade massa molecular e de cadeia dupla.

Para Socransky et al. (1994) é muito difícil conduzir estudos em larga escala sobre os complexos ecossistemas microbiológicos usando técnicas microbiológicas convencionais. Técnicas moleculares de identificação, como a técnica de hibridação DNA-*Checkerboard*, permitem identificar um grande número de espécies em um grande número de amostras. É uma técnica rápida, sensível e relativamente barata. A técnica consiste no cruzamento das amostras coletadas contra as sondas dos microrganismos a serem estudados, preparadas a partir de seu DNA genômico.

Papapanou et al. (1997) compararam a metodologia de hibridização DNA-DNA *checkerboard* com as técnicas de cultura para a análise da composição da microbiota subgengival. Setenta indivíduos, que apresentavam uma variedade de condições periodontais, contribuíram com um total de 283 amostras de placa bacteriana subgengival analisando as seguintes espécies: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mutans*. A identificação e quantificação das espécies foi realizada pelo método *checkerboard* usando genoma total, sondas marcadas com digoxigenina de DNA, e a cultura, incluindo meios não seletivos e seletivos, em combinação com testes bioquímicos de rotina e painéis de testes comerciais. Os autores encontraram que o método DNA-DNA *checkerboard* resultou em maiores números de prevalência de metade das espécies testadas, quando comparados com os dados da cultura. A metodologia

checkerboard resultou em contagens bacterianas mais elevados estatisticamente significativos para a maioria das espécies. Além disso, foi observado que, para a maioria das espécies, quanto maior o número total de unidades formadoras de colônias na amostra, maior a discrepância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas.

Watanabe e Frommel (2006) usaram a reação da polimerase em cadeia (PCR) através de *primers* específicos para gene de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* a fim de determinar a presença desses patógenos em amostras de placa subgengival de sítios periodontais. Esses *primers* específicos para genes foram também usados para determinar a taxa de diferentes cepas de bactérias nos ensaios de PCR. *Primers* para *P. gingivalis* detectaram cepas de *P. gingivalis* mas nenhum produto foi detectado quando *primers* foram usados com extratos de 4 espécies de *Capnocytophaga*, 3 espécies de *Prevotella*, 2 espécies de *Porphyromonas*, exceto *P. gingivalis*, *Bacteroides levii*, *Escherichia coli*, 3 cepas de *A. actinomycetemcomitans* e 3 cepas de *T. denticola*. Análise da PCR usando *primers* para gene de *A. actinomycetemcomitans* também não resultou em produto com nenhuma dessas bactérias, com exceção para resultado positivo de 3 diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans*. *Primers* selecionados para o gene de *T. denticola* não identificou nenhuma dessas cepas de bactérias do teste exceto *T. denticola* sorotipo a, b, e c. Assim, esses *primers* mostraram potencial para amplificar segmentos de gene específicos para cada cepa de bactéria. Os autores concluíram que o ensaio de PCR pode ser usado para a rápida detecção de patógenos periodontais em sítios periodontais.

Barbosa et al. (2009) avaliaram a infiltração bacteriana através da interface implante pilar pela cultura convencional e pelo método de hibridização DNA *Checkerboard*. Vinte implantes Brånemark compatíveis com diâmetro de 3,75 mm e uma plataforma de hexágono externo foram colocadas aleatoriamente em dois grupos de dez

conjuntos implante-pilar. Um grupo foi utilizado para analisar as contagens bacterianas por hibridização de DNA *checkerboard* e o outro por uma cultura de bactérias convencional. Suspensões de *Fusobacterium nucleatum* foram injetados na face interna do conjunto pilar-implante unidos com um torque de 32 N.cm. O conjunto foi colocado individualmente em tubos contendo meio de cultura e incubadas num forno a temperatura constante durante 14 dias. As amostras foram observadas diariamente quanto a presença de turbidez, e após o tempo designado os microrganismos foram recolhidos do interior do implante e analisados pelos dois métodos. Os resultados mostraram que o método DNA *checkerboard* é mais sensível do que as culturas convencionais na detecção de micro-organismos.

Haffajee et al. (2009) fizeram uma investigação comparando dois métodos moleculares de identificação bacteriana: Reação da Polimerase em cadeia com a subsequente hibridização reversa (teste de micro-Ident) e *Checkerboard* hibridização DNA-DNA, para a identificação de 13 espécies de bactérias em amostras de biofilme subgingival retiradas de indivíduos que estavam periodontalmente saudáveis ou tinham evidências de periodontite. Vinte e cinco indivíduos com periodontite crônica e 25 indivíduos periodontalmente saudáveis foram recrutados. Os indivíduos periodontalmente saudáveis tinham mais de 20 anos de idade, pelo menos 24 dentes e nenhum sítio com profundidade de sondagem ou nível de inserção > 4 mm. Indivíduos com periodontite tinham mais de 20 anos de idade, pelo menos 20 dentes e mais de 5% de sítios com sondagem periodontal > 4 mm e/ou mais de 5% de sítios com AL > 4mm. Todos os indivíduos tinham bom estado de saúde geral e não receberam tratamento periodontal ou antibióticos nos 3 meses que antecederam o estudo. O estado periodontal dos indivíduos foi avaliado seguindo os seguintes critérios clínicos: acúmulo de biofilme, evidência de gengivite, sangramento à sondagem. Em todos os dentes, seis sítios foram avaliados (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual), com

exceção dos terceiros molares. As amostras foram coletadas através da inserção de pontas de papel no sulco por 20 segundos. Ambos os métodos distinguiram facilmente amostras de pacientes periodontalmente saudáveis das amostras de pacientes com periodontite. Os autores não encontraram diferenças significativas usando as duas técnicas moleculares. A concordância geral dos dois métodos examinados na investigação foi importante porque cada um forneceu informações para a validação do outro.

3. Proposição

3.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota oral de pacientes com indicação de extração e instalação de próteses implantossuportadas imediata na mandíbula, analisando o perfil microbiológico antes da remoção dos dentes e após a instalação de implantes e próteses fixas implanto-suportadas (Prótese tipo Protocolo), por meio de um estudo clínico intervencional longitudinal prospectivo.

3.2 Objetivos específicos

- a. Identificar e quantificar os micro-organismos do biofilme do sulco periodontal e peri-implantar em função do tempo (T0: *Baseline*, T1: 4 meses e T2: 8 meses), por meio do método molecular DNA *Checkerboard*;
- b. Avaliar os parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem) nos tempos T0, T1 e T2;
- c. Comparar o número total de micro-organismos e o número de patógenos específicos nos três tempos avaliados.

4. Materiais e Métodos

4.1 Desenhos do estudo

Foi executado um estudo clínico intervencional longitudinal prospectivo com uma comparação entre três tempos distintos de coleta de biofilme em um grupo de pacientes que tinham indicação de extração dentária e instalação de próteses fixas implantossuportadas. Os pacientes receberam próteses fixas mandibulares (tipo protocolo) suportadas por cinco implantes. As amostras de biofilme foram coletadas imediatamente antes da extração dos dentes (T0= *Baseline*), após 4 (T1) e 8 meses da instalação dos implantes e próteses (T2). O ensaio teve uma duração de dois anos, com o recrutamento e tratamento dos participantes durante o segundo semestre do primeiro ano e as análises e acompanhamento nos demais semestres. Os aspectos metodológicos do estudo foram relatados conforme a declaração CONSORT para ensaios clínicos (MOHER, SCHULZ & ALTMAN 2001; BOUTRON et al., 2008).

4.2 Seleção dos Pacientes

Dezesseis pacientes com doença periodontal controlada foram selecionados para participar do estudo, entretanto, dois pacientes foram retirados por não comparecerem nas avaliações de T1 e T2, permanecendo 14 participantes (04 homens e 10 mulheres, com faixa etária de 46 a 76 anos – média de 60 anos). Os pacientes procuraram por tratamento reabilitador no Instituto Latino Americano de Ensino e Pesquisa (ILAPEO, Curitiba-PR) e tiveram indicação de extração dos dentes e reabilitação por meio de próteses fixas (tipo Protocolo). Dos pacientes em tratamento no ILAPEO, aqueles que se enquadraram nos

critérios de inclusão do estudo foram incluídos. O tamanho do N amostral para o presente projeto de pesquisa foi calculado com o auxílio do software PASS 2005 (NCSS, KAYSVILLE, EUA). Foi selecionado o parâmetro contagem de células bacterianas como variável primária para a determinação do N amostral, com medidas repetidas realizadas em três tempos (T0 = *baseline*, T1, T2). Foi considerado um desvio-padrão de 0,89 nas medidas de tempo intra-indivíduo (valores dos desvios estimados a partir do observado em estudos da literatura). O poder estatístico (*power*) foi de 95% para o fator tempo, com nível de significância igual a 5% e magnitude do efeito (*effect size*) de 2.

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: (1) indivíduos maiores de 18 anos; (2) com dentes inferiores com indicação de extração e reabilitação com implantes dentários; (3) portadores de arcos superiores desdentados reabilitados com próteses totais maxilares ou próteses sobre implante clinicamente satisfatórias ou que já estivessem com planejamento de troca durante o tratamento; (4) com espaço adequado na mandíbula anterior para a inserção de cinco implantes; (5) capazes de manter higiene bucal adequada e higienizar suas próteses; (6) que apresentasse um estado de saúde sistêmica que permitisse a indicação de procedimentos cirúrgicos menores; (7) capazes de fornecer um consentimento livre e esclarecido. Os critérios de exclusão foram: gravidez, lactação, presença de qualquer condição sistêmica que pudesse influenciar o curso da doença periodontal ou que exigem pré-medicação para procedimentos e fumantes. Todo o tratamento, assim como exames complementares e materiais utilizados foram custeados pelo próprio paciente. Os pacientes que se enquadraram nos objetivos do presente estudo foram convidados a participarem da pesquisa, e não tiveram que custear nenhuma etapa das análises propostas no projeto de pesquisa. Aqueles que manifestaram interesse em colaborar foram informados sobre a participação no estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Aos voluntários foi facultado o direito de decidir sobre

sua participação ou não na fase experimental desse estudo. Durante o primeiro contato com os pesquisadores, orientações foram dadas quanto aos procedimentos da pesquisa. O presente estudo foi realizado com a devida apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ FORP/ USP sob o parecer nº 731.125. Foi constituído por 14 pacientes (04 homens e 10 mulheres, com faixa etária de 46 a 76 anos, com média de idade de 60 anos).

4.3 Coleta inicial (T0)

As coletas microbiológicas e as medidas de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento à sondagem foram realizadas em todos os dentes remanescentes antes das extrações dentárias. Radiografias panorâmicas foram feitas para execução do planejamento cirúrgico.

4.4 Intervenções cirúrgicas e protéticas

As intervenções cirúrgicas e reabilitações protéticas foram realizadas pelas equipes dos cursos de especialização e mestrado do ILAPEO. Aqueles que se enquadraram nos objetivos do projeto foram selecionados e convidados a participar do estudo.

O protocolo para intervenções cirúrgicas nas clínicas do ILAPEO foi o que se segue: procedimentos comuns para a instalação dos implantes incluíram exames pré-operatórios e radiográficos para determinar as condições anatômicas relativas ao volume ósseo e à mucosa da área de suporte. Radiografias panorâmicas e tomografias adicionais foram realizadas conforme decisão do cirurgião responsável, caso necessárias. As informações relacionadas ao exame clínico dos pacientes foram registradas nas fichas clínicas do ILAPEO. Qualquer participante alérgico ao antibiótico previsto recebeu medicação de outra classe. Independentemente do paciente, prescreveu-se Ibuprofeno 200

mg duas vezes diárias por dois dias ou conforme necessário individualmente para os casos de dor pós-operatória. Como medicação alternativa, Acetaminophen 650 a 1000 mg diários ou Naproxeno Sódico 375 a 1000 mg por dia foram prescritos. Registrou-se nos formulários clínicos dos participantes os tipos, doses e frequência de medicamentos usados no período pré e pós-operatório. Após a confirmação de travamento dos implantes com um torque mínimo de 32N.cm, os implantes foram carregados imediatamente com a instalação da prótese fixa inferior do tipo protocolo. Após os ajustes clínicos, instruções de higiene e manutenção foram fornecidas a cada participante antes da entrega das próteses e durante os retornos clínicos de avaliações.

Os pacientes foram alertados para os pequenos riscos provenientes do tratamento reabilitador que o levaram a procurar as clínicas do Instituto. Informações sobre alergias medicamentosas, ocorrência de hemorragias e traumas no trans-cirúrgico e possíveis dores, parestesias e hematomas no período pós-operatório foram claramente transmitidas aos pacientes. A metodologia proposta para este presente estudo não trouxe nenhum custo adicional ao tratamento dos participantes. Não houve riscos previsíveis aos participantes para a realização da metodologia proposta neste estudo.

4.5 Procedimentos realizados no T1

4.5.1 *Avaliação dos indicadores clínicos*

Exames clínicos foram realizados durante todo o tratamento com o objetivo de avaliar o papel do biofilme bacteriano no processo de manutenção da saúde dos tecidos de suporte ou no possível desenvolvimento da doença. A avaliação da profundidade e sangramento à sondagem foram realizadas por meio de sondas periodontais de *Teflon*. Foi avaliada a distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco peri-implantar. Em cada um dos cinco implantes instalados na

mandíbula as medições foram feitas em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto lingual).

4.5.2 *Obtenção das amostras*

Todos os artigos utilizados para a coleta das amostras foram previamente e posteriormente esterilizados em autoclave. Amostras do fluido crevicular dos sulcos periodontais (T0 -*Baseline*) e peri-implantares (4 meses- T1 e 8 meses T2) foram colhidas com o auxílio de cones de papel absorvente nº 30. Foram colhidas 6 amostras de cada dente e implante, 3 no sulco vestibular (mesial, medial e distal) e 3 no sulco lingual (mesial, medial e distal). Os cones permaneceram introduzidos nos sulcos por 30 segundos e, ao final da coleta, foram colocados em um mesmo tubo, rotulado com o tempo de coleta, a indicação da área e o paciente, constituindo uma única amostra para cada elemento. As amostras colhidas foram transferidas para microtubos contendo 150µL TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH= 8,0), aos quais foram adicionados 150µL de NaOH 0,5M para processamento pela técnica de hibridização DNA *Checkerboard*. Todos os tubos foram armazenados a 4°C até o processamento das amostras.

4.6 Processamento microbiológico pela Técnica DNA Checkerboard

O processamento das amostras pela técnica do DNA *Checkerboard* foi realizado de acordo com a técnica inicialmente descrita por SOCRANSKY et al., em 1994, e modificada por do NASCIMENTO et al., em 2010.

4.6.1 *Extração do DNA genômico para a confecção das sondas dos microrganismos*

As espécies bacterianas avaliadas pelo DNA *Checkerboard* foram as seguintes: *A. actinomycetemcomitans a*, *A. actinomycetemcomitans b*, *B. fragillis*, *C. gingivalis*, *C.*

sputigena, *E. coli*, *E. corrodens*, *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *L. casei*, *N. mucosa*, *P. aeruginosa*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermédia*, *P. melaninogenica*, *P. micra*, *P. nigrencia*, *S. aureus*, *S. constelatus*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. moreei*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pasteurii*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *T. denticola*, *T. forsythia*, e *V. parvula*. Após o crescimento e multiplicação dos microrganismos em meio líquido apropriado, foi realizada a extração do DNA genômico de cada espécie de acordo com uma modificação no protocolo de Pitcher et al., em 1989.

4.6.2 Purificação e quantificação do DNA extraído

O tratamento de purificação do DNA foi realizado com a adição da RNase. Em um microtubo de 1,5 ml foram colocados 5 µl do DNA com 95 µl de RNase 20 µg/ml, e os tubos incubados em 37°C por 30 minutos. Após o processo de extração e limpeza, o DNA foi ressuspensionado em TE para análise em gel de agarose, além de quantificação e verificação do grau de pureza em aparelho espectrofotômetro.

4.6.3 Marcação das sondas

Após a obtenção dos DNA, a marcação foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pela empresa fabricante do marcador genômico (*Gene Images Alkphos Direct labelling and Detection System, GE Healthcare, UK*). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA genômico do microrganismo a ser estudado, atingindo uma concentração final de 1 ng/µl de sonda na solução de hibridização.

4.6.4 Teste de sensibilidade e especificidade das sondas de DNA dos microrganismos

A sensibilidade do teste foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridização positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células bacterianas, de acordo com a quantidade de sonda usada (SOCRANSKY et al., 1994).

4.6.5 Avaliação das amostras contra as sondas marcadas (*Reação de Hibridização*)

Os microtubos contendo as amostras em TE e NaOH foram aquecidos em água fervente por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA. As amostras foram então neutralizadas com 800 µl de acetato de amônio 5M, colocadas individualmente em canaletas de um Minislot (Immunetics, EUA) e o DNA foi concentrado à vácuo sobre uma membrana de nylon (GE Healthcare, Inglaterra) e fixado à temperatura de 80°C durante 2 horas. O aparelho Minislot permite a individualização de 28 amostras diferentes em faixas sobre uma única membrana de nylon de 15X15cm, além de 2 faixas controle contendo DNA de 10^5 e 10^6 células de cada espécie a ser testada. A membrana contendo o DNA fixado foi colocada em um *Miniblotter 45* (Immunetics, EUA), com as faixas de DNA posicionadas em um ângulo de 90° com os canais do aparelho. Um *checkerboard* no padrão 30X45 foi então produzido. Cada canal foi usado como uma câmara de hibridização para testes separados de DNA.

4.6.6 Detecção dos sinais de hibridização

Após a reação de hibridização, as membranas passaram por um processo de lavagem e a detecção dos sinais foi realizada através de uma reação de quimiluminescência. Por fim, as membranas foram seladas em saco plástico e levadas para exposição em filme para auto-radiografia (HyperFilm, Amersham Biosciences, Inglaterra) dentro de cassete apropriado (Amersham Biosciences, Inglaterra). Em seguida, os filmes

foram revelados e fixados em soluções para processamento radiográfico convencional (Kodak, Brasil).

4.6.7 *Interpretação dos sinais*

A leitura dos resultados é semi-quantitativa, e foi feita por meio da comparação visual dos sinais das amostras com os controles, obtidos a partir do DNA da bactéria que está sendo pesquisada. A confirmação da análise visual foi feita pela avaliação da intensidade de pixels dos sinais por meio do *software TotalLab Quant* (TotalLab, Reino Unido)

4.7 Análise dos dados

As medianas obtidas em cada parâmetro clínico e microbiológico avaliado, para cada paciente, foram comparadas cruzando-se os tempos propostos. Os dados de sangramento à sondagem foram organizados em tabelas de contingência 2x2 e foram submetidos à análise pelo teste exato de Fisher bicaudal. Por se tratarem de variáveis contínuas, os dados dos parâmetros clínicos (profundidade de sondagem) e microbiológicos (contagem de células) foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas. Por não apresentarem uma distribuição normal, os dados dos parâmetros clínicos e microbiológicos foram avaliados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Dunn. Diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico NCSS 2007 (NCSS, Kaysville, EUA).

5. Artigo Científico

Artigo preparado segundo as normas da revista Clinical Oral Implants Research.

Avaliação comparativa do perfil microbiológico de pacientes antes e após extrações dos dentes e instalação imediata de implantes usando o método DNA *Checkerboard*.

Gomes, JA* / Sartori, IAM, MS,DDS**/ do Nascimento,C, MS,DDS****

*Aluno do Mestrado em Implantodontia do Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico- ILAPEO- Curitiba - PR- BRASIL, Especialista em Periodontia pela Faculdade Federal de Diamantina, Especialista em Ortodontia pela ABO-Ouro Fino-MG.

** Mestre e Doutora em Reabilitação Oral pela USP/Ribeirão Preto. Professora do curso de Mestrado em Odontologia do ILAPEO-Curitiba-PR.

***Professor Doutor do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Mestre e Doutor em Reabilitação pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Endereço do autor: Rua Santa Luzia, 5, Centro, Mantena– MG – Brasil Cep: 35290000
e- mail: jvgo@uai.com.br

Resumo

Objetivo: Avaliar o perfil microbiológico dos pacientes parcialmente desdentados antes da extração dos dentes e após a reabilitação imediata com próteses fixas mandibulares implantossuportadas de arco total. **Métodos:** Dezesseis pacientes começaram no estudo clínico intervencional longitudinal prospectivo sendo que 2 foram retirados por não comparecerem nas avaliações de T1 e T2, permanecendo 14 participantes (04 homens e 10 mulheres, com faixa etária de 46 a 76 anos – média de 60 anos). Parâmetros clínicos e microbiológicos foram realizados antes da extração dos dentes (T0 – baseline) e após 4 (T1) e 8 (T2) meses dos implantes em função. As amostras foram colhidas inserindo 6 pontas de papel durante 30 segundos no sulco periodontal e peri-implantar. Trinta e nove espécies microbianas, incluindo espécies periodontopatogênicas e *Candida* spp. foram avaliadas pelo método DNA *Checkerboard*. **Resultados:** Os valores de profundidade de sondagem T0 ($3,05 \pm 1,45$) foram significativamente maiores do que em T1 ($1,81 \pm 0,56$) e T2 ($1,66 \pm 0,53$); $p < 0,05$. Amostras periodontais de T0 ($2,12 \pm 2,02$) e amostras peri-implantares de T2 ($2,20 \pm 1,63$) apresentaram maior contagem microbiana total do que amostras peri-implantares de T1 ($1,96 \pm 1,72$) ($p < 0,05$). **Conclusão:** Os resultados microbiológicos após 8 meses de função dos implantes foram semelhantes aos encontrados no início do estudo. Os dados obtidos sugerem a viabilidade dessa modalidade de tratamento para indivíduos desdentados com história prévia de doença periodontal. Futuros estudos poderão contribuir para elucidar o impacto da colonização microbiana no sucesso a longo prazo deste tipo de tratamento.

Palavras-chave: Implantes Dentários, Biofilmes, Biologia Molecular, Prótese Dental Implantossuportada.

Introdução

A longevidade dos implantes pode ser comprometida por trauma cirúrgico, sobrecarga oclusal e infecção peri-implantar (Galassi et al. 2012). Após o procedimento cirúrgico, os implantes são expostos à saliva e biofilme que contém um grande número de espécies de micro-organismos (Casado et al. 2011). Estudos têm demonstrado que diversos micro-organismos presentes na cavidade oral, em especial os relacionados à doença periodontal, são responsáveis pelos maiores índices de complicações e insucesso dos implantes (Sbordone et al. 1995; Rocuzzo et al. 2013; Comparin, Coró & Claudino 2014). A presença de bactérias periodontopatogênicas nos sulcos peri-implantares e a presença de dentes com periodontite próximos a implantes dentais são considerados fatores de risco para o sucesso dos implantes (Gouvoussis, Sindhusake & Yeung 1997; Rocuzzo et al. 2013).

As técnicas moleculares de diagnóstico foram desenvolvidas durante as duas últimas décadas e têm sido extensivamente usadas na detecção e quantificação de espécies microbianas habitando a cavidade oral (Ebadian et al. 2012; Hallstrom et al. 2012; do Nascimento et al. 2013). Estas técnicas são mais rápidas, sensíveis e específicas quando comparadas às técnicas convencionais de cultura microbiana, que podem falhar ao detectar e identificar várias espécies frequentemente presentes na cavidade oral, micro-organismos muitas vezes incultiváveis ou fastidiosos (BARBOSA et al. 2009).

A técnica de hibridização DNA *Checkerboard* (Socransky et al. 1994) utiliza sondas feitas a partir de DNA genômico, e apresenta como principal vantagem a identificação e quantificação de várias espécies bacterianas em um grande número de amostras da cavidade oral simultaneamente. Esta técnica tem sido aplicada recentemente em diversas áreas da odontologia para avaliar a composição do biofilme bacteriano em

condições de saúde ou doença (Teles et al. 2010; Kim et al. 2010; Vettore et al. 2010) e na condução de estudos sobre a associação entre o biofilme bacteriano e fatores locais e sistêmicos (Borges et al. 2009; Demmer et al. 2010). A técnica também é usada para avaliar a microbiota associada com lesões endodônticas (Rôças & Siqueira 2010) na mudança de composição do biofilme como resultado do tratamento de terapias periodontais (Haffajee et al. 2009), e na identificação e quantificação de espécies bacterianas provenientes do interior de implantes osseointegráveis (Barbosa et al. 2009; Do Nascimento et al. 2012).

Alguns estudos procuraram determinar e monitorar o tipo de microbiota peri-implantar formada após a instalação imediata de implantes (Lindeboom, Tjiook & Kroon 2006; Devides & Franco 2006; Tripodakis & Nakou 2011; Viskić et al. 2011). Embora estes estudos tenham mostrado resultados considerados satisfatórios em um curto prazo de tempo, este assunto ainda não está completamente compreendido e novas investigações são necessárias para um maior entendimento da colonização microbiana frente ao comportamento clínico dos implantes e próteses. Este estudo propõe a comparação da microbiota presente quando os pacientes ainda possuíam seus dentes com a existente após sua remoção e instalação imediata de prótese implantossuportada. A hipótese nula testada é de que não existem diferenças no perfil microbiano do biofilme presente nos dentes previamente às extrações e no biofilme formado após o tratamento reabilitador com implantes em pacientes com histórico de doença periodontal prévia.

Materiais e métodos

Descrição dos participantes

Os participantes foram selecionados dentre os pacientes que se encontravam em tratamento nas clínicas do Instituto Latino Americano de Ensino e Pesquisa (ILAPEO). As

intervenções cirúrgicas foram realizadas pelas equipes dos cursos de especialização e mestrado. O tamanho do N amostral para o presente projeto de pesquisa foi calculado com o auxílio do software PASS 2005 (NCSS, KAYSVILLE, EUA).

Dezesseis pacientes com doença periodontal controlada foram selecionados para participar do estudo, entretanto, dois pacientes foram retirados por não comparecerem nas avaliações de T1 e T2, permanecendo 14 participantes (04 homens e 10 mulheres, com faixa etária de 46 a 76 anos – média de 60 anos). Todos os pacientes tinham indicação de extração dos dentes remanescentes e instalação de prótese implantossuportada mandibular e prótese total maxilar. Os critérios de inclusão foram indivíduos maiores de 18 anos, com bom estado de saúde sistêmica, capazes de manter higiene bucal adequada e higienizar suas próteses. Os critérios de exclusão foram gravidez, lactação, uso de antibioticoterapia nos últimos três meses e presença de qualquer condição sistêmica que pudesse influenciar o curso do tratamento. Os pacientes foram alertados para os pequenos riscos provenientes do tratamento reabilitador e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo teve apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/FORP/USP (Processo CAAE nº 32345114.0.0000.5419).

Procedimentos clínicos e cirúrgicos

Os pacientes participantes do estudo passaram por terapia periodontal básica prévia com objetivo de padronizar a microbiota subgengival dos dentes remanescentes na condição inicial do estudo (T0) e para diminuição dos riscos de infecção pós-operatória. Todos os dentes remanescentes foram avaliados através de sondagem clínica para medição da profundidade de sondagem, medida do nível de inserção e presença de sangramento à sondagem antes das extrações. O protocolo cirúrgico para instalação dos implantes incluiu exames pré-operatórios e radiográficos para determinar as condições relativas ao volume

ósseo e à mucosa da área de suporte. Cinco implantes cone *Morse* (Neodent, Curitiba, Brasil) foram inseridos entre os forames mentonianos, imediatamente após as extrações, e prótese do tipo protocolo foi instalada dentro de 48 horas.

Avaliação dos indicadores clínicos

Um exame clínico peri-implantar foi realizado durante todo o tratamento com o objetivo de avaliar o papel do biofilme bacteriano no processo de manutenção da saúde dos tecidos de suporte ou no possível desenvolvimento da doença. A avaliação da profundidade e sangramento à sondagem foi realizada por meio de sonda periodontal manual de *Teflon* e pressão controlada. Para tal, em cada implante, as medições foram feitas em seis sítios distintos (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual). As avaliações foram feitas após 4 e 8 meses dos implantes em função.

Obtenção das amostras de biofilme

Todos os artigos utilizados para a coleta das amostras foram previamente e posteriormente esterilizados em autoclave. Amostras do fluido crevicular dos sulcos periodontais (T0 -*Baseline*) e peri-implantares (4 meses- T1 e 8 meses T2) foram colhidas com o auxílio de cones de papel absorvente nº 30. Foram colhidas 6 amostras de cada dente e implante, 3 no sulco vestibular (mesial, medial e distal) e 3 no sulco lingual (mesial, medial e distal). Os cones permaneceram introduzidos nos sulcos por 30 segundos e, ao final da colheita, foram colocados em um mesmo tubo, rotulado com o tempo de coleta, a indicação da área e o paciente, constituindo uma única amostra para cada elemento. As amostras colhidas foram transferidas para microtubos contendo 150µL TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH= 8,0), aos quais foram adicionados 150µL de NaOH

0,5M para processamento pela técnica de hibridização DNA *Checkerboard*. Todos os tubos foram armazenados a 4°C até o processamento das amostras.

Avaliação microbiológica pelo DNA checkerboard

O processamento das amostras pela técnica do DNA *Checkerboard* foi realizado de acordo com a técnica inicialmente descrita por SOCRANSKY et al., em 1994, e modificada por NASCIMENTO et al., em 2010.

As espécies bacterianas avaliadas pelo DNA *Checkerboard* foram as seguintes: *Agregatibacter actinomycetemcomitans* a, *Agregatibacter actinomycetemcomitans* b, *Bacteroides fragilis*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Escherichia coli*, *Eikenella corrodens*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Lactobacillus casei*, *Neisseria mucosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Solobacterium morei*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *S. parasanguinis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Treponema denticola*, *Treponema forsythia*, e *Veillonella parvula*. Após o crescimento e multiplicação dos micro-organismos em meio líquido apropriado, foi realizada a extração do DNA genômico de cada espécie de acordo com uma modificação no protocolo de Pitcher et al., em 1989.

O tratamento de purificação do DNA foi realizado com a adição da RNase. Em um microtubo de 1,5 ml foram colocados 5 µl do DNA com 95 µl de RNase 20 µg/ml, e os tubos incubados em 37°C por 30 minutos. Após o processo de extração e limpeza, o DNA

foi ressuspendido em TE para análise em gel de agarose, além de quantificação e verificação do grau de pureza em aparelho espectrofotômetro.

Após a obtenção dos DNA, a marcação foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pela empresa fabricante do marcador genômico (*Gene Images Alkphos Direct labelling and Detection System, GE Healthcare, UK*). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA genômico do micro-organismo a ser estudado, atingindo uma concentração final de 1 ng/ μ l de sonda na solução de hibridização. A sensibilidade do teste foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridização positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células bacterianas, de acordo com a quantidade de sonda usada (SOCRANSKY et al., 1994).

Os microtubos contendo as amostras em TE e NaOH foram aquecidos em água fervente por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA. As amostras foram então neutralizadas com 800 μ l de acetato de amônio 5M, colocadas individualmente em canaletas de um Minislot (Immunetics, EUA) e o DNA foi concentrado à vácuo sobre uma membrana de nylon (GE Healthcare, Inglaterra) e fixado à temperatura de 80°C durante 2 horas. O aparelho Minislot permite a individualização de 28 amostras diferentes em faixas sobre uma única membrana de nylon de 15X15cm, além de 2 faixas controle contendo DNA de 10^5 e 10^6 células de cada espécie a ser testada. A membrana contendo o DNA fixado foi colocada em um *Miniblotter 45* (Immunetics, EUA), com as faixas de DNA posicionadas em um ângulo de 90° com os canais do aparelho. Um *checkerboard* no padrão 30X45 foi então produzido. Cada canal foi usado como uma câmara de hibridização para testes separados de DNA.

Após a reação de hibridização, as membranas passaram por um processo de lavagem e a detecção dos sinais foi realizada através de uma reação de

quimiluminescência. Por fim, as membranas foram seladas em saco plástico e levadas para exposição em filme para auto-radiografia (HyperFilm, Amersham Biosciences, Inglaterra) dentro de cassete apropriado (Amersham Biosciences, Inglaterra). Em seguida, os filmes foram revelados e fixados em soluções para processamento radiográfico convencional (Kodak, Brasil).

A leitura dos resultados é semi-quantitativa, e foi feita por meio da comparação visual dos sinais das amostras com os controles, obtidos a partir do DNA da bactéria que está sendo pesquisada. A confirmação da análise visual foi feita pela avaliação da intensidade de pixels dos sinais por meio do *software TotalLab Quant* (TotalLab, Reino Unido).

Análise dos dados

As medianas obtidas em cada parâmetro clínico e microbiológico avaliado, para cada paciente, foram comparadas cruzando-se os tempos propostos. Os dados de sangramento à sondagem foram organizados em tabelas de contingência 2x2 e foram submetidos à análise pelo teste exato de Fisher bicaudal. Por se tratarem de variáveis contínuas, os dados dos parâmetros clínicos (profundidade de sondagem) e microbiológicos (contagem de células) foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas. Por não apresentarem uma distribuição normal, os dados dos parâmetros clínicos e microbiológicos foram avaliados pelo teste Friedman seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Dunn. Diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico NCSS 2007 (NCSS, Kaysville, EUA).

Resultados

Os 14 pacientes incluídos neste estudo apresentaram setenta e três elementos remanescentes mandibulares que receberam terapia periodontal básica prévia e foram submetidos a exames clínicos para avaliação da profundidade e sangramento a sondagem e perda no nível clínico de inserção. Após terem sido submetidos às extrações e instalação de 70 implantes (Neodent) e serem reabilitados com próteses fixas implantossuportadas, os mesmos exames foram repetidos nos acompanhamentos de 4 (T1) e 8 meses (T2) dos implantes em função. Os dados estão apresentados na tabela 1. Na avaliação prévia (T0) o perfil microbiano e a contagem de todos os micro-organismos, sem distinção entre as espécies, apresentou valor compatível com saúde. Observou-se na segunda coleta (T1) ($1,96 \pm 1,72$) uma redução significativa no número comparado a T0 ($2,12 \pm 2,02$) ($p < 0,05$). No controle de 8 meses dos implantes em função (T2) ($2,20 \pm 1,63$), observou-se aumento significativo quando comparado a T1 ($p < 0,05$) e sem valor estatisticamente significativo se comparado a T0, apesar desses valores terem sido obtidos em diferentes condições: T0(dentes) e T2(implantes) (Gráfico 1). Quando as contagens foram realizadas para cada espécie de micro-organismos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os 3 tempos (T0, T1, T2) para nenhuma das espécies estudadas (Tabela 2).

Tabela 1. Parâmetros clínicos dos participantes do estudo previamente à extração (T0) e após 4 meses (T1) e 8 meses (T2) dos implantes em função

Participantes	Dentes	Implantes	
	T0	T1	T2
Participantes	16	14	14
Idade (Média, $\pm$ DP)	60,06 $\pm$ 7,67	60,14 $\pm$ 7,69	60,14 $\pm$ 7,69
Gênero (masculino/feminino)	4/12	4/10	4/10
Sítios Avaliados	438	420	420
Profundidade de Sondagem (mm, média $\pm$ DP)	3,05 $\pm$ 1,45 ^A	1,81 $\pm$ 0,56 ^B	1,66 $\pm$ 0,53 ^B
Nível Clínico de Inserção (mm, média $\pm$ DP)	4,90 $\pm$ 2,09	–	–
Sangramento à Sondagem (%)	60/73 (82%)	32/70(45,7%)	29/70(41,4%)

Letras diferentes representam diferenças significantes entre as médias detectadas por Friedman seguido por pós-teste de Dunn; $p < 0,05$; A > B

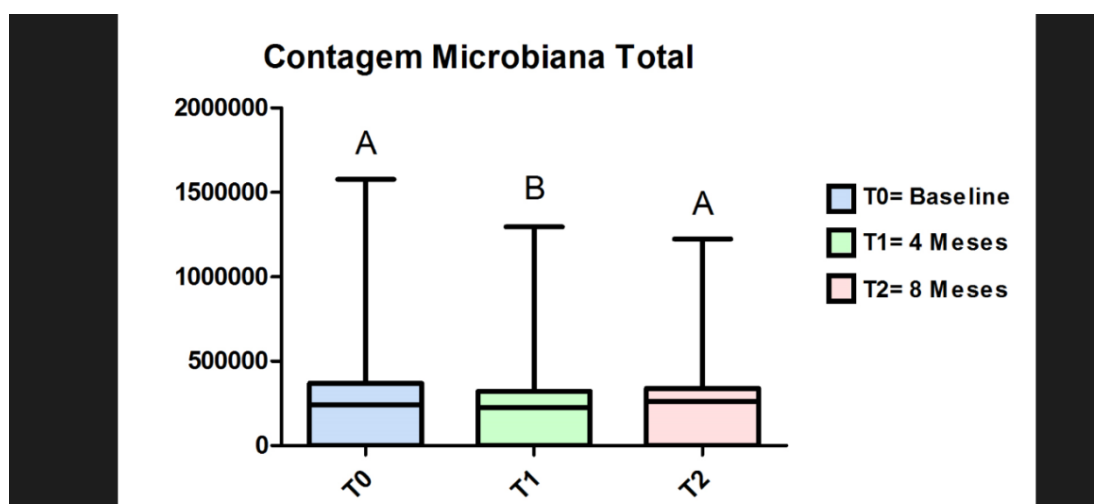


Gráfico 1. Gráfico representativo do número de micro-organismos provenientes dos sítios avaliados nos diferentes tempos: T0 (dentes), T1 (implantes após 4 meses de função) e T2 (implantes após 8 meses). Letras diferentes significam diferenças significantes entre os grupos detectadas pelo teste de Friedman seguido por pós-teste de Dunn: $p < 0,05$).

Tabela 2. Tabela representativa da contagem individual dos micro-organismos nos tempos T0 (*baseline*), T1(4 meses) e T2(8meses).

	T0			T1			T2		
	Mediana	1° Quartil	3° Quartil	Mediana	1° Quartil	3° Quartil	Mediana	1° Quartil	3° Quartil
Aa. a	273340,2	532236,3	0	246812,3	534090,9	0	269223,2	503265,9	0
Aa. b	317369,3	510441,8	0	296814,4	507115,1	0	311693,6	413953,2	0
C. gignivalis	288240	509795,8	0	269985,3	540300,4	0	290676,8	512118,9	0
C. rectus	299903	555257,3	0	234685,1	440070,7	0	292094,4	388732,1	0
E. coli	300353,8	665769,8	0	249378,4	488982,7	0	264651,8	410571,2	0
E. faecalis	285498,8	668423	0	233902	519789,8	0	278671,4	389715	0
F. nucleatum	243719,9	677633,5	0	217542,5	573637,1	0	257347,5	388652,4	0
L. casei	246637,8	645506,7	0	279676,9	457556,9	0	277004,2	377842,2	0
P. aeruginosa	246468,2	605062,8	0	278345,4	577912,4	0	276769,1	371707,1	0
P. anaeróbios	278109,5	635003,9	0	292108,6	515899,4	0	301015,3	401441,5	0
P. gingivalis	276797	611551,4	0	240285,5	523776,5	0	298779	395186,5	0
P. intermedia	140884,3	614754,5	0	205228,9	488116,6	0	200187,7	373325,8	0
P. melanigogenica	0	646084	0	119730,3	570368,8	0	0	587901,9	0
P. micra	0	603165,8	0	201489,4	426694,8	0	262513,8	377047,6	0
P. nigrescens	153575,4	601639,8	0	202187,3	447576,6	0	217882,9	383707,8	0
P. putida	0	661961,9	0	0	475744,3	0	201934	386567,2	0
S. aureus	246170,3	716455,2	0	296226	504626,8	0	330890,4	554451,9	0
S. gordonii	278906,6	684493,3	0	251896,7	493120,6	0	288699	418006,7	0
S. mitis	215294,6	644255,7	0	261736,7	480129,6	0	308864,1	435470,5	0
S. moorei	212936,6	646359	0	231509,3	441071,7	0	248005,5	441900,1	0
S. mutans	287452	651761,6	0	205955,5	486109,6	0	239264,4	463315,7	0
S. salivarius	168513,4	713183,4	0	225746,9	486400,5	0	226018,4	494524,1	0
S. sanguinis	246086,5	658222,7	0	218083	516125,1	0	212026,9	494140,8	0
T. forsythia	296113,1	621325,6	0	215253,7	509806,8	0	228891,5	497046,4	0
T. denticola	284597,3	690033,4	0	262358,4	524125	0	284234,1	494870,3	0
V. Parvula	216676,8	669990,2	0	226114,8	607729,8	0	288919,3	850094,2	0
S. Parasanguinis	0	641382,6	0	196806,2	450477,2	0	206579,4	421961	0
S. Sobrinus	0	629010,2	0	211660,6	372091,5	0	272660,3	384836,5	0
C. albicans	0	595082,4	0	153913,5	487085,6	0	173244,8	401221,5	0
C. dubliniensis	286523,3	610919,1	0	319504,8	517659,1	0	335529,8	507551,1	0
C. krusei	0	513534,9	0	0	375913,2	0	0	375892,6	0
B. fragilis	0	572922,2	0	0	421278,5	0	0	361783,8	0
K. pneumoniae	0	1164017	0	0	638811,8	0	0	974430,8	0
M. salivarius	158496,2	1577422	0	326099,6	1295847	0	294379,3	1224749	0
S. constellatus	0	802188,3	0	300311,6	619715,1	0	272107,6	504094,6	0
E. corrodens	0	577390	0	0	417071,9	0	152577,4	358055,8	0
F. periodonticum	6375,296	568220,8	0	261239,7	430626,5	0	251734,5	398055,1	0
P. endodontalis	0	515102,1	0	0	400163	0	168723,6	353851,5	0
S. oralis	0	490164,9	0	0	423684,2	0	0	338943,7	0
Não houve diferenças significantes para as espécies avaliadas nos diferentes tempos ($p>0,05$)									

Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente o perfil microbiológico de pacientes enquanto parcialmente edentulos e após terem sido reabilitados com prótese de arco total mandibular suportada por 5 implantes e prótese total maxilar removível.

Os resultados encontrados permitem aceitar a hipótese nula testada de que a microbiota oral formada ao redor do sulco peri-implantar após um tempo de acompanhamento dos implantes em função é semelhante à microbiota pré-existente ao redor de dentes periodontalmente controlados. Quando os valores totais de micro-organismos obtidos no T2 (implantes após 8 meses de função) foram comparados aos

valores obtidos em T0 (dentes) os dados não mostraram diferenças estatisticamente significantes. Esses dados corroboram com outros achados (Koka et al. 1993; Mombelli et al. 1995; Papaioannou et al. 1995).

A contagem microbiológica do tempo T1 (4 meses) mostrou uma diminuição significativa do número de bactérias em relação ao T0 (dentes), mas retornou ao mesmo patamar no tempo T2 (8 meses). Isto é perfeitamente justificável pela literatura, onde diversos estudos mostram não haver diferenças significantes em relação à incidência e contagem de espécies bacterianas presentes, bem como sobre o impacto do biofilme formado nos parâmetros clínicos e radiográficos das restaurações após os períodos de 6, 12 e 18 meses dos implantes em função (Van Winkelhoff et al. 2000; Devides & Franco 2006).

O fato de a taxa de micro-organismos ter caído consideravelmente após cirurgia para a extração dos dentes e instalação dos 5 implantes também corrobora com estudos anteriores (Devides & Franco 2006; Koka, Seme & Hren 2010).

Estudos têm demonstrado que as bactérias encontradas no sulco peri-implantar logo após a instalação dos implantes são semelhantes às aquelas presentes em infecções odontogênicas agudas. Com o decorrer do tempo, as bactérias isoladas do sulco peri-implantar se assemelham às bactérias encontradas em doenças periodontais crônicas. Estudos apontam que a microbiota presente na cavidade oral antes da colocação de implantes é determinante para uma nova microbiota após a instalação dos mesmos (Apse et al., 1989; Leonhardt et al., 1992).

Em pacientes parcialmente desdentados, a microbiota dental parece ser uma importante fonte de bactérias. Pacientes com história prévia de doença periodontal podem

apresentar uma alta prevalência de patógenos anaeróbios (Koka et al., 1993; Mombelli et al., 1995) o que não foi encontrado neste estudo.

A presença de bactérias periodontopatogênicas nos sulcos peri-implantares e a presença de dentes com infecção periodontal próximo aos implantes tem sido relatados na literatura como fator de risco para o sucesso dos implantes (Gouvoussis, Sindhusake & Yeung 1997; Roccuzzo et al., 2013), enquanto outros estudos têm demonstrado que dentes com doença periodontal funcionam como reservatórios para a infecção da região peri-implantar (Papaioannou et al., 1995; Gouvoussis, Sindhusake & Yeung 1997; Agerbak, Lang & Person, 2006; Prakash et al., 2013) e outros consideram que a colonização bacteriana em implantes de pacientes desdentados origina-se a partir da superfície da mucosa oral (Smedberg, Beck & Embery 1993; Danser et al., 1997).

Assim, corroborando com esses achados neste estudo, como todos os pacientes participantes foram controlados periodontalmente antes do procedimento cirúrgico, a taxa de micro-organismos no T0 foi compatível com condição de saúde. Não foi perdido nenhum implante nos tempos T1 e T2 e a taxa de micro-organismos em T2 mostrou resultado similar a T0 em número.

Vários estudos têm relatado a satisfação dos pacientes após a reabilitação com prótese implantossuportada em substituição à próteses removíveis mandibulares (Coró et al., 2011; Vieira et al, 2014; Thomé et al., 2015). Assim sendo, a condução de estudos como este são de fundamental importância para ajudar na compreensão dos fatores associados à presença de micro-organismos e controle dos mesmos. A identificação de potenciais micro-organismos patogênicos colonizando os sulcos peri-implantares após a instalação e função das próteses mandibulares fixas sobre implantes e sua relação com os achados clínicos, podem alertar e contribuir para o desenvolvimento de métodos de higienização e protocolos clínicos de descontaminação dos

implantes/componentes/próteses, reduzindo desta forma o risco de desenvolvimento de reações inflamatórias nos tecidos per-implantares.

O uso da técnica de hibridização DNA *Checkerboard* permitiu em nosso estudo a avaliação de um grande número de espécies bacterianas responsáveis pelo início da formação do biofilme bacteriano e aquelas relacionadas às doenças periodontais e peri-implantares. As técnicas de biologia molecular para detecção e identificação de micro-organismos tem colaborado para uma melhor compreensão da microbiota envolvida nas doenças periodontais e peri-implantares (Quirynen et al., 2005; Vettore, Leão & Leal et al., 2010). No entanto, a técnica de hibridização DNA *Checkerboard* apresenta a limitação de detecção das espécies bacterianas em uma concentração mínima de 10^4 células. Portanto, pode ser que determinadas espécies estejam presentes em quantidades inferiores ao seu limite de detecção. Uma alternativa para suprir esta limitação do método seria a utilização de técnicas complementares de detecção molecular mais sensíveis e específicas, como o *Real-time* PCR. Outro fator que deve ser levado em consideração em estudos utilizando o material genético como alvo de detecção é a possibilidade de degradação ocorrida durante o transporte e manipulação das amostras clínicas. Entretanto, estas metodologias apresentam resultados altamente previsíveis, desde que corretamente utilizadas.

Os resultados apresentados neste estudo clínico fornecem um maior entendimento sobre o perfil microbiano que se desenvolve em próteses totais mandibulares fixas sobre implantes imediatos em pacientes com história prévia de doença periodontal. Nossos resultados confirmam os achados de estudos prévios que relatam haver uma similaridade da microbiota formada sobre implantes com aquela presente nos sulcos periodontais previamente à remoção dos dentes. No entanto, novos estudos são necessários para

acompanhar o desenvolvimento e possíveis modificações desta microbiota ao longo do tempo.

Conclusão

Com base nos dados encontrados, é possível concluir que o tratamento reabilitador com implantes imediatos em carga imediata, em pacientes com história prévia de doença periodontal, é um tratamento com boa previsibilidade. Os achados microbiológicos ao longo dos 8 meses mostraram um resultado compatível com a condição de saúde que os pacientes apresentavam no momento da instalação dos implantes. Um acompanhamento a longo prazo desses pacientes poderá nos fornecer mais dados com relação a influência da microbiota na manutenção desta modalidade de tratamento.

Referências

- Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. & Brånemark, P.I.(1981) A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International Journal of Oral Surgery*. **10**: 387-416.
- Agerback, M.R., Lang, N.P. & Persson, G.R. (2006) Comparisons of bacterial patterns present at implant and tooth sites in subjects on supportive periodontal therapy. I. Impact of clinical variables, gender and smoking. *Clinical Oral Implants Research*. **17**: 18-24.
- Albrektsson, T., Dahl, E., Enbom, L., Engvall, S., Engquist, B., Eriksson, A.R., Feldmann, G.,Freiberg, N., Glantz, P.O., Kjellman, O. & et al.(1988) Osseointegrated oral implants. A Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *Journal of Periodontology*. **59**: 287-296.
- Apse, P., Ellen, RP., Overall, CM, & Zarb, GA.(1989) Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *Journal of Periodontal Research*. **24**: 96-105.
- Barbosa, R.E., do Nascimento, C., Issa, J.P., Watanabe, E., Ito, I.Y. & de Albuquerque, R.F. Jr. (2009) Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. *Journal of Prosthodontics*. **18**:376-381.
- Borges, M.A., de Figueiredo, L.C., de Brito, R.B. Jr., Faveri, M, & Feres M.(2009) Microbiological composition associated with vitamin D receptor gene polymorphism in chronic periodontitis. *Brazilian Oral Research*. **23**:203-208.

Buser, D., Mericske-Stern, R., Bernard, J.P., Behneke, A., Behneke, N., Hirt, H.P., Belser, U.C. & Lang NP. (1997) Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multicenter study with 2359 implants. *Clinical Oral Implants Research*, **8**: 161-172.

Casado, P.L., Otazu, I.B., Balduino, A., de Mello, W., Barbosa, E.P. & Duarte, M.E. (2011) Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. *Implant Dentistry*. **20**:226-235.

Comparin, L.L., Coró, E.R. & Claudino, M. (2014) Tratamento químico, mecânico e cirúrgico-regenerativo da peri-implantite: relato de caso clínico com nove meses de acompanhamento em um sítio mandibular posterior extenso. *ImplantNews*. **11**:93-100.

Coró, E.R., Sartori, I.A.M., Vieira, R.A., Coró, V. & Borges, A.F.S. (2011) Avaliação de mastigação e satisfação de pacientes reabilitados com prótese mandibular implantorretida. *ImplantNews*. **8**:187-194.

Crespi, R., Cappare, P., Gherlone, E. & Romanos, G.E. (2007) Immediate occlusal loading of implants placed in fresh sockets after tooth extraction. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. **22**: 955-962.

Danser, M.M., Van Winkelhoff, A.J., de Graaf, J., Loss, B.G. & van der Velden U. (1994) Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. *Journal of Clinical Periodontology*. **21**: 484-489.

Demmer, R.T., Papapanou, P.N., Jacobs, D.R Jr. & Desvarieux, M. (2010) Evaluating clinical periodontal measures as surrogates for bacterial exposure: the oral infections and vascular disease epidemiology study invest. *BMC Medical Research Methodology*. **7**:10-12.

Devides, S.L. & Franco, A.T. (2006) Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load. *The International Journal Oral & Maxillofacial Implants*. **21**:262-269.

do Nascimento, C., de Albuquerque, R.F Jr., Monesi, N. & Candido-Silva, J.A. (2010) Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**:3039-3040.

do Nascimento, C., Miani, P.K., Pedrazzi, V., Gonçalves, R.B., Ribeiro, R.F., Faria, A.C., Macedo, A.P. & de Albuquerque, R.F Jr. (2012) Leakage of saliva through the implant-abutment interface: *in vitro* evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. **27**:551-560.

do Nascimento, C., Miani, P.K., Pedrazzi, V., Muller, K. & de Albuquerque júnior, R.F.(2012) Bacterial leakage along the implant-abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses. *Clinical Oral Implants Research*. **23**: 1168-1172.

do Nascimento, C., Pita, M.S., Pedrazzi, V., de Albuquerque Junior, R.F. & Ribeiro, R.F. (2013) In vivo evaluation of Candida spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. *Archives of Oral Biology*. **58**:853-861.

Ebadian, A.R., Kadkhodazadeh, M., Zarnegarnia, P. & Dahlén, G. (2012) Bacterial analysis of peri-implantitis and chronic periodontitis in Iranian subjects. *Acta Medica Iranica*. **50**:486-492.

Galassi, F., Kaman, W.E., Anssari Moin, D., van der Horst, J., Wismeijer, D., Crielaard, W. & et al. (2012) Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of Porphyromonas gingivalis in patients with or without peri-implant infections. *Journal of Periodontal Research*. **47**: 616-625.

Gouvoussis, J., Sindhusake, D. & Yeung, S. (1997) Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. **12**:666-673.

Haffajee, A.D., Yaskell, T., Torresyap, G., Teles, R. & Socransky, S.S. (2009) Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*. **36**:642-649.

Haffajee, A.D., Roberts, C., Murray, L., Veiga, N., Martin, L., Teles, R.P. & et al. (2009) Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters. *The Journal of Clinical Dentistry*. **20**:211-7.

Hallström, H., Persson, G.R., Lindgren, S., Olofsson, M. & Renvert, S. (2012) Systemic antibiotics and debridement of peri-implant mucositis. A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*. **39**:574-581.

Jaworski, M.E., Melo, A.C., Picheth, C.M. & Sartori, I.A. (2012) Analysis of the bacterial seal at the implant-abutment interface in external-hexagon and morse taper-connection implants: an *in vitro* study using a new methodology. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. **27**: 1091-1095.

Kim, K., Heimisdottir, K., Gebauer, U. & Persson, G.R. (2010) Clinical and microbiological findings at sites treated with orthodontic fixed appliances in adolescents. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. **137**:223-228.

Koka, S., Razoog, M. & Bloem, T.J. & Syed, S. (1993) Microbial colonization of dental implants in partially edentulous patients. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. **70**:141-144.

Leonhardt, A., Berglundh, T., Ericsson, I. & Dahlén, G. (1992) Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research*. **3**:112-119.

Lindeboom, J.A., Tjiook, Y. & Kroon, F.H. (2006) Immediate placement of implants in periapical infected sites: A prospective randomized study in 50 patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. **101**:705-710.

Mombelli, A., Marxer, M., Gaberthuel, T., Grunder, U. & Lang, N.P. (1995) The microbiota of osseintegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. **22**:124-130.

Nascimento, C., Pita, M.S., Pedrazzi, V., de Albuquerque Júnior, R.F. & Ribeiro, R.F. (2013) In vivo evaluation of *Cândida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. *Archives of Oral Biology*. **58**:853-861.

Papapanou, P.N., Madianos, P.N., Dahlén, G. & Sandros, J. (1997) “Checkerboard” versus cultura: a comparison between two methods for indentification of subgingival microbiota. *European Journal of Oral Sciences*. **105**:389-396.

Papaioannou, W., Quirynen, M., Nys, M. & Van Steenberghe, D. (1995) The effect of periodontal parameters on the subgingival microbiota around implants. *Clinical Oral Implants Research*. **6**:197-204.

Piattelli, A., Scarano, A., Paolantonio, M., Assenza, B., Leghissa, G.C., Di Bonaventura, G. & et al. (2001) Fluids and microbial penetration in the internal part of cemented-retained versus screw-retained implant-abutment connections. *Journal of Periodontology*. **72**:1146-1150.

Pitcher, D.G., Sanders, N.A. & Owen, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*. **8**:151-156.

Prakash, P.S.G., Vaishavi, R. & Vitor, D.J. (2013) Quantification of subgingival microflora in a peri Implants pacient using RTPCR – a case reporter. *Journal of Periodontology & Implant Dentistry*. **5**: 29-37.

Quirynen, M., Alsaad, G., Pauwels, M., Haffajee, A., Van Steenberghe, D. & Naert, I. (2005) Microbiological and clinical outcomes and patient satisfaction for two treatment options in the edentulous lower jaw after 10 years of function. *Clinical Oral Implants Research*. **16**:277-287.

Quirynen, M., Bollen, C.M., Eyssen, H. & van Steenberghe, D. (1994) Microbial penetration along the implant components of the Brånemark system. An *in vitro* study. *Clinical Oral Implants Research*. **5**:239-244.

Rôças, I.N. & Siqueira Jr, J.F. (2010) Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *Journal of Endodontics*. **36**:45-52.

Roccuzzo, M., Bonino, L., Dalmasso, P. & Aglietta, M. (2014) Long-term results of a three arms prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients: 10-year

data around sandblasted and acid-etched (SLA) surface. *Clinical Oral Implants Research*. **25**: 1105-1112.

Sartori, I. Análise comparativa da interface intermediário estético/cilindro protético, torneados em ouro ou em plástico, antes e após as fundições. [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 1999.

Sato, J., Gomi, K., Makino, T., Kawasaki, F., Yashima, A., Ozawa, T. & et al. (2011) The evaluation of bacterial flora in progress of Peri-implant disease. *Australian Dent Journal*. **56**: 201-206.

Sbordone, L., Barone, A., Ramaglia, L., Ciaglia, R.N. & Iacono, V.J. (1995) Antimicrobial susceptibility of periodontopathic bacteria associated with failing implants. *Journal of Periodontology*. **66**:69-74.

Schwarz, S., Gabbert, O., Hassel, A.J., Schmitter, M., Seché, C. & Rammelsberg, P. (2010) Early loading of implants with fixed dental prostheses in edentulous mandibles: 4.5-year clinical results from a prospective study. *Clinical Oral Implants Research*. **21**:284-89.

Smedberg, J.I., Beck, C.B. & Embery, G. (1993) Glycosaminoglycans in peri-implant sulcus fluid from implants supporting fixed or removable prostheses. *Clinical Oral Implants Research*. **4**:137-143.

Socransky, S.S., Smith, C., Martin L, Paster B.J., Dewhirst, F.E. & Levin, A.E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. **17**:788-792.

Teixeira, W., Ribeiro, R.F., Sato, S. & Pedrazzi, V. (2011) Microleakage into and from two-stage implants: an *in vitro* comparative study. *The International Journal of Oral Maxillofacial Implants*. **26**:56-62.

Teles, R., Sakellari, D., Teles, F., Konstantinidis, A., Kent, R., Socransky, S. & Haffajee, A. (2010) Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *Journal of Periodontology*. **81**:89-98.

Tripodakis, A.P. & Nakou, M. (2011) Microbiologic evaluation of compromised periodontal sites before and after immediate intrasocket implant placement. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. **31**:109-117.

Van Winkelhoff, A.J. & Wolf, J.W. (2000) Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report . *Journal of Clinical Periodontology*. **27**: 531-535.

Vettore, M.V., Leão ,A.T., Leal, M. C, Feres, M., de Figueiredo, L.C. & Sheiham, A. (2010) Periodontal bacterial load: a proposed new epidemiological method for periodontal disease assessment. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. **11**:E049-56.

Vieira, R.A., Melo, A.C., Budel, L.A., Gama, J.C., Sartori, I.A. & Thomé, G. (2014) Benefits of rehabilitation with implants in masticatory function: is patient perception of

change in accordance with the real improvement? *The Journal of Oral Implantology*. **40**: 263-9.

Viskić, J., Milardović, S., Katanec, D., Vojvodić, D. & Mehulić, K. (2011) Immediate implantation in infected tooth sockets. *Collegium Antropologicum*. **35**:217-221.

Zitzmann, N.U. & Marinello, C.P. (2006) Patient satisfaction with removable implant-supported prostheses in the edentulous mandible. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. **116**:237-244.

6. Referências

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10(6):387-416.
2. Agerback MR, Lang NP, Persson GR. Comparisons of bacterial patterns present at implant and tooth sites in subjects on supportive periodontal therapy. I. Impact of clinical variables, gender and smoking. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(1):18-24.
3. Albrektsson T, Dahl E, Enbom L, Engvall S, Engquist B, Eriksson AR, et al. Osseointegrated oral implants. A Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *J Periodontol.* 1988;59(5):287-96.
4. Algraft H, Borumandi F, Cascarini L. Peri-implantitis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012 50(8):689-94.
5. Aoki M, Takanashi K, Matsukubo T, Yajima Y, Okuda K, Sato T, et al. Transmission of periodontopathic bacteria from natural teeth to implants. *Clin implant Dent Relat Res.* 2012; 14(3):406-11.
6. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res.* 1989;24(2):96-105.
7. Barbosa RE, do Nascimento C, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque RF Jr. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. *J Prosthodont.* 2009; 18(5):376-81.
8. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implant and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(2):81-90.
9. Brånemark PI, Adell R., Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969; 3(2):81-100.
10. Brånemark PI. Tissue integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintessence Publishing; 1985. Introduction on osseointegration. p. 11-76.
11. Borges MA, de Figueiredo LC, de Brito RB Jr, Faveri M, Feres M. Microbiological composition associated with vitamin D receptor gene polymorphism in chronic periodontitis. *Braz Oral Res.* 2009; 23(2):203-8.
12. Boutron I, Moher D, Altman DG, Schulz KF, Ravaud P. CONSORT Group. Extending the CONSORT statement to randomized trials of nonpharmacologic treatment: explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2008;148(4):295-309.
13. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table

analysis of a prospective multicenter study with 2359 implants. Clin Oral Implants Res. 1997;8(3):161-72.

14. Casado PL, Otazu IB, Balduino A, de Mello W, Barbosa EP, Duarte ME. Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. Implant Dent. 2011;20(3):226-35.

15. Comparin LL, Coró ER, Claudino M. Tratamento químico, mecânico e cirúrgico-regenerativo da peri-implantite: relato de caso clínico com nove meses de acompanhamento em um sítio mandibular posterior extenso. ImplantNews. 2014; 11(1):93-100.

16. Coró, ER; Sartori, IAM; Vieira, RA; Coró, V; Borges, AFS. Avaliação de mastigação e satisfação de pacientes reabilitados com prótese mandibular implantorretida. ImplantNews 2011;8(3b):187-94.

17. Crespi R, Capparè P, Gherlone E, Romanos GE. Immediate occlusal loading of implants placed in fresh sockets after tooth extraction. Int J Oral Maxillofac implants. 2007;22(6):955-62.

18. 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.

19. 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.

20. Demmer RT, Papapanou PN, Jacobs DR Jr, Desvarieux M. Evaluating clinical periodontal measures as surrogates for bacterial exposure: the oral infections and vascular disease epidemiology study invest. BMC Med Res Methodol. 2010;7:10-2.

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

22. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. Nature. 2007; 449(7164): 811-8.

23. Dibart S, Warbington M, Su MF, Skobe Z. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system. Int J Oral Maxillofac Implants. 2005; 20(5):732-7.

24. do Nascimento C, de Albuquerque RF Jr, Monesi N, Candido-Silva JA. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. J Clin Microbiol. 2010;48(8):3039-40.

25. do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Gonçalves RB, Ribeiro RF, Faria AC, et al. Leakage of saliva through the implant-abutment interface: *in vitro* evaluation of three

different implant connections under unloaded and loaded conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012; 27(3):551-60.

26. do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Muller K, de Albuquerque júnior RF. Bacterial leakage along the implant-abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses. *Clin Oral Impl Res*. 2012;23(10):1168-72.

27. do Nascimento C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. *Arch Oral Biol*. 2013;58(7):853-61.

28. Ebadian AR, Kadkhodazadeh M, Zarnegarnia P, Dahlén G. Bacterial analysis of peri-implantitis and chronic periodontitis in Iranian subjects. *Acta Med Iran*. 2012;50(7):486-92.

29. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308(5728):1635-38.

30. Esposito M, Grusovin MG, Talati M, Coulthard P, Oliver R, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: antibiotics at dental implant placement to prevent complications. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;16(3)CD004152.

31. Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, van der Horst J, Wismeijer D, Crielaard W et al. Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri-implant infections. *J Periodontal Res*. 2012;47(5):616-25.

32. Gehrke P, Dhom G, Brunner J, Wolf D, Degidi M, Piatelli A. Zirconium implant abutments: fracture strength and influence of cyclic loading on retaining screw loosening. *Quintessence Int*. 2006;37(1):19-26.

33. Gouvoussis J, Sindhusake D, Yeung S. Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997;12(5):666-73.

34. Haffajee AD, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2009;36(8):642-9.

35. Haffajee AD, Roberts C, Murray L, Veiga N, Martin L, Teles RP, et al. Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters. *J Clin Dent*. 2009; 20(7):211-7.

36. Hallström H, Persson GR, Lindgren S, Olofsson M, Renvert S. Systemic antibiotics and debridement of peri-implant mucositis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012; 39(6):574-81.

37. Hjalmarsson L, Smedberg JJ, Pettersson M, Jemt T. Implant-level prostheses in the edentulous maxilla: a comparison with conventional abutment-level prostheses after 5 years of use. *Int J Prosthodont*. 2011;24(2): 158-67.

38. Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997;12(4):527-40.
39. Jaworski ME, Melo AC, Picheth CM, Sartori IA. Analysis of the bacterial seal at the implant-abutment interface in external-hexagon and morse taper-connection implants: an *in vitro* study using a new methodology. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(5):1091-5.
40. Kim K, Heimisdottir K, Gebauer U, Persson GR. Clinical and microbiological findings at sites treated with orthodontic fixed appliances in adolescents. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010;137(2):223-8.
41. Kocar M, Seme K, Hren NI. Characterization of the normal bacterial flora in peri-implant sulci of partially and completely edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010;25(4):690-8.
42. Koka S, Razoog M, Bloem TJ, Syed S. Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects. *J Prosthet Dent*. 1993;70(2):141-4.
43. Leonhardt A, Berglundh T, Ericsson I, Dahlén G. Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res*. 1992;3(3):112-9.
44. Lindeboom JA, Tjiook Y, Kroon FH. Immediate placement of implants in periapical infected sites: A prospective randomized study in 50 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101(6):705-10.
45. MacEntee MI, Walton JN, Glick N. A clinical trial of patient satisfaction and prosthodontic needs with ball and bar attachments for implant -retained complete overdentures: three-year results. *J Prosthet Dent*. 2005;93(1):28-37.
46. Moher D, Schulz KF, Altman DG. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet*. 2001;357(9263):1191-4.
47. Mombelli A, Marxer M, Gaberthuel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseintegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(2):124-30.
48. Mullard A. Microbiology: the inside story. *Nature*. 2008;453(7195):578-80.
50. Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. Diversity of human vaginal bacterial communities and their association with clinically defined bacterial vaginosis. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(15):4898-909.

51. Papapanou PN, Madianos PN, Dahlén G, Sandros J. “Checkerboard” versus cultura: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(5 Pt 1):389-96.
52. Papaioannou W, Quirynen M, Nys M, Van Steenberghe D. The effect of periodontal parameters on the subgingival microbiota around implants. *Clin Oral Implants Res.* 1995; 6(4):197-204.
53. Piattelli A, Scarano A, Paolantonio M, Assenza B, Leghissa GC, Di Bonaventura G, et al. Fluids and microbial penetration in the internal part of cemented-retained versus screw-retained implant-abutment connections. *J Periodontol.* 2001;72(9):1146-1150.
54. Pitcher DG, Sanders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol.* 1989; 8(4):151-6.
55. Prakash PSG, Vaishavi R, Vitor DJ. Quantification of subgingival microflora in a peri Implants patient using RTPCR – a case reporter. *J Periodontol Implant Dent.* 2013; 5(1): 29-37.
56. Quirynen M, Alsaad, G, Pauwels M, Haffajee A, Van Steenberghe D, Naert I. Microbiological and clinical outcomes and patient satisfaction for two treatment options in the edentulous lower jaw after 10 years of function. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16(3):277-87.
57. Quirynen M, Bollen CM, Eyssen H, van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Brånemark system. An *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res.* 1994;5(4):239-44.
58. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010;36(1):45-52.
59. Roccuzzo M, Bonino L, Dalmaso P, Aglietta M. Long-term results of a three arms prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients: 10-year data around sandblasted and acid-etched (SLA) surface. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(10): 1105-12.
60. Sartori I. Análise comparativa da interface intermediário estético/cilindro protético, torneados em ouro ou em plástico, antes e após as fundições. [Dissertação] São Paulo. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 1999.
61. Sato J, Gomi K, Makino T, Kawasaki F, Yashima A, Ozawa T, et al. The evaluation of bacterial flora in progress of Peri-implant disease. *Aust Dent J.* 2011;56(2): 201-6.
62. Sbordone L, Barone A, Ramaglia L, Ciaglia RN, Iacono VJ. Antimicrobial susceptibility of periodontopathic bacteria associated with failing implants. *J Periodontol.* 1995;66(1):69-74.

63. Schwarz S, Gabbert O, Hassel AJ, Schmitter M, Seché C, Rammelsberg P. Early loading of implants with fixed dental prostheses in edentulous mandibles: 4.5-year clinical results from a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(3):284-89.
64. Smedberg JI, Beck CB, Embery G. Glycosaminoglycans in peri-implant sulcus fluid from implants supporting fixed or removable prostheses. *Clin Oral Implants Res.* 1993; 4(3):137-43.
65. Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 1989;62(5):567-72.
66. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994; 17(4):788-92.
67. Takanashi K, Kishi M, Okuda K, Ishihara K. Colonization By *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* from teeth to osseointegrated implant regions. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2004;45:77-85.
68. Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an *in vitro* comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26(1):56-62.
69. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, Haffajee A. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* 2010; 81(1):89-98.
70. Thomason JM, Lund JP, Chehade A, Feine JS. Patient satisfaction with mandibular implant overdentures and conventional dentures 6 months after delivery. *Int J Prosthodont.* 2003;16(5):467-73.
71. Thomé E, Lee HJ, Sartori IA, Trevisan RL, Luiz J, Tiossi R. A randomized controlled trial comparing interim acrylic prostheses with and without cast metal base for immediate loading of dental implants in the edentulous mandible. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(12):1414-20
72. Tripodakis AP, Nakou M. Microbiologic evaluation of compromised periodontal sites before and after immediate intrasocket implant placement. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011;31(6):e109-17.
73. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449(7164):804-10.
74. Van Winkelhoff AJ, Wolf JW. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. *J Clin Periodontol.* 2000;27(7):531-5.
75. Vettore MV, Leão AT, Leal Mdo C, Feres M, de Figueiredo LC, Sheiham A. Periodontal bacterial load: a proposed new epidemiological method for periodontal disease assessment. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11(1):E049-56.

76. Vieira RA, Melo AC, Budel LA, Gama JC, Sartori IA, Thomé G. Benefits of rehabilitation with implants in masticatory function: is patient perception of change in accordance with the real improvement? *J Oral Implantol*. 2014;40(3):263-9.
77. ViskiĆ J, Milardović S, Katanec D, Vojvodić D, Mehulić K. Immediate implantation in infected tooth sockets. *Coll Antropol*. 2011;35(1):217-21.
78. Watanabe K, Frommel TO. Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans and Treponema denticola detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol*. 1996;23(3pt1):212-9.
79. Zitzmann NU, Marinello CP. Patient satisfaction with removable implant-supported prostheses in the edentulous mandible. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2006;116(3):237-44.

7. Apêndice

Segue abaixo gráficos e tabelas do estudo:

Tabela 1. Parâmetros clínicos e dos participantes do estudo previamente à extração (T0) e após a cirurgia de instalação dos implantes (T1 e T2).

	Dentes	Implantes	
	T0	T1	T2
Participantes	16	14	14
Idade (Média, $\pm$DP)	60,06 $\pm$ 7,67	60,14 $\pm$ 7,69	60,14 $\pm$ 7,69
Gênero (masculino/feminino)	4/12	4/10	4/10
Sítios Avaliados	438	420	420
Profundidade de Sondagem (mm, média $\pm$DP)	3,05 $\pm$ 1,45 ^A	1,81 $\pm$ 0,56 ^B	1,66 $\pm$ 0,53 ^B
Nível Clínico de Inserção (mm, média $\pm$DP)	4,90 $\pm$ 2,09	–	–
Sangramento à Sondagem (%)	60/73 (82%)	32/70(45,7%)	29/70(41,4%)

Letras diferentes representam diferenças significantes entre as médias detectadas por Friedman seguido por pós-teste de Dunn; $p < 0,05$; A > B

Tabela 2. Tabela representativa da contagem individual dos micro-organismos nos tempos T0 (*baseline*), T1(4 meses) e T2(8meses).

	T0			T1			T2		
	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mediana	1º Quartil	3º Quartil
Aa. a	273340,2	532236,3	0	246812,3	534090,9	0	269223,2	503265,9	0
Aa. b	317369,3	510441,8	0	296814,4	507115,1	0	311693,6	413953,2	0
C. giginvalis	288240	509795,8	0	269985,3	540300,4	0	290676,8	512118,9	0
C. rectus	299903	555257,3	0	234685,1	440070,7	0	292094,4	388732,1	0
E. coli	300353,8	665769,8	0	249378,4	489982,7	0	264651,8	410571,2	0
E. faecalis	285498,8	668423	0	233902	519789,8	0	278671,4	389715	0
F. nucleatum	243719,9	677633,5	0	217542,5	573637,1	0	257345	388652,4	0
L. casei	246637,8	645506,7	0	279676,9	457556,9	0	277004,2	377842,2	0
P. aeruginosa	246468,2	605062,8	0	278345,4	577912,4	0	276769,1	371707,1	0
P. anaeróbios	278109,5	635003,9	0	292108,6	515899,4	0	301015,3	401444,5	0
P. gingivalis	276797	611551,4	0	240285,5	523776,5	0	298779	395186,5	0
P. intermedia	140884,8	614754,5	0	205228,9	489116,6	0	200187,7	373235,8	0
P. melanigenica	0	646084	0	119730,3	570368,8	0	0	587901,9	0
P. micra	0	603165,8	0	201489,4	426694,8	0	262513,8	377047,6	0
P. nigrescens	153575,4	601639,8	0	202187,3	447576,6	0	217882,9	383707,8	0
P. putida	0	661961,9	0	0	475744,3	0	201934	386567,2	0
S. aureus	246170,3	716455,2	0	296226	504628,6	0	330890,4	554451,9	0
S. gordonii	278906,6	684493,3	0	251896,7	493120,6	0	288669	410066,7	0
S. mitis	215294,6	644255,7	0	261736,7	480129,6	0	308864,1	435470,5	0
S. moorei	212936,6	646359	0	231509,3	441017,7	0	248005,5	441900,1	0
S. mutans	287452	651761,6	0	205955,5	486709,6	0	239264,4	463315,7	0
S. salivarius	168513,4	713183,4	0	225746,9	486400,5	0	226018,4	494524,1	0
S. sanguinis	246086,5	658222,7	0	218083	516125,1	0	212026,9	494140,8	0
T. forsythia	296113,1	621325,6	0	215253,7	509806,8	0	228891,5	497046,4	0
T. denticola	284597,3	690033,4	0	262358,4	524125	0	284234,1	494870,3	0
V. Parvula	216676,8	669990,2	0	226114,8	607729,8	0	288919,3	850094,2	0
S. Parasanguinis	0	641382,6	0	196806,2	450477,2	0	206579,4	421961	0
S. Sobrinus	0	629010,2	0	211660,6	372091,5	0	272660,3	384836,5	0
C. albicans	0	595082,4	0	153913,5	487085,6	0	173244,8	401221,5	0
C. dubliniensis	286523,3	610919,1	0	319504,8	517659,1	0	335529,8	507551,1	0
C. krusei	0	513534,9	0	0	375913,2	0	0	375892,6	0
B. fragilis	0	572922,2	0	0	421278,5	0	0	361783,8	0
K. pneumoniae	0	1164017	0	0	638811,8	0	0	974430,8	0
M. salivarium	158496,2	1577422	0	326099,6	1295847	0	294379,3	1224749	0
S. constelatus	0	802188,3	0	300311,6	619715,1	0	272107,6	504094,6	0
E. corrodens	0	577390	0	0	417077,9	0	152577,4	358055,8	0
F. periodonticum	6375,296	568220,8	0	261239,7	340626,5	0	251734,5	398055,1	0
P. endodontalis	0	515102,1	0	0	400163	0	168723,6	363851,5	0
S. oralis	0	490164,9	0	0	423684,2	0	0	338943,7	0
Não houve diferenças significantes para as espécies avaliadas nos diferentes tempos (p>0,05)									

Tabela 3. Tabela representativa dos valores de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, sangramento à sondagem e presença de supuração dos dentes remanescentes.

T0		Sondagem						Nível de Inserção						Nível de Inserção						Sangramento	Supuração
		MV	V	DV		ML	L	DL		MV	V	DV		ML	L	DL					
Paciente 1	dente 43	3	3	6		4	5	5		6	6	8		5	7	7		x		x	
	dente 44	6	2	5		7	7	6		8	5	7		8	8	7		x		x	
Paciente 2	dente 43	1	2	2		1	2	1		3	5	5		3	5	4		x			
	dente 42	2	1	2		2	1	2		4	3	5		5	3	4		x			
	dente 41	1	1	2		1	2	1		3	3	5		4	5	3		x			
	dente 31	1	1	2		2	1	1		3	3	5		4	3	3		x			
	dente 32	2	1	2		2	2	2		5	4	3		3	3	3		x			
Paciente 3	dente 42	2	2	2		5	6	3		4	4	4		8	7	5		x			
	dente 41	2	2	2		5	5	2		4	4	4		8	8	5		x			
	dente 31	2	2	2		2	3	2		3	4	4		4	6	4		x			
Paciente 4	dente 45	2	2	3		2	3	5		4	4	5		4	3	6		x		x	
	dente 43	2	2	4		6	7	8		3	4	4		8	8	9		x		x	
	dente 33	3	3	6		4	4	6		4	5	7		5	5	8		x		x	
	dente 34	6	4	2		5	5	2		8	5	3		6	6	4		x		x	
	dente 35	2	3	2		2	2	2		3	4	5		5	5	5		x		x	
Paciente 5	dente 41	1	1	2		1	2	2		3	3	5		4	3	3		x			
	dente 31	1	1	1		1	2	1		3	2	2		2	4	2					
	dente 32	1	2	3		2	2	3		3	5	4		4	3	3		x			
Paciente 6	dente 43	2	2	2		2	2	2		5	5	5		5	5	5					
	dente 42	2	2	3		3	2	3		5	5	7		6	3	4		x		x	
	dente 41	8	8	9		4	4	5		9	8	9		5	4	5		x		x	
	dente 32	3	2	2		3	2	2		4	5	5		4	5	5					
	dente 33	1	1	1		2	1	1		3	3	3		5	3	2					
Paciente 6	dente 44	4	2	4		5	3	3		4	5	7		5	7	6		x			
	dente 43	3	2	3		3	2	3		5	9	3		5	5	3		x			
	dente 42	3	2	3		3	2	3		6	6	4		6	5	4		x			
	dente 41	3	2	3		3	2	3		6	7	7		6	5	7		x			
	dente 31	3	2	3		3	2	3		5	3	3		5	5	3		x			
	dente 32	3	2	3		3	2	3		4	4	3		4	4	3		x			
	dente 33	5	2	3		3	3	3		6	7	4		4	6	4		x			
Paciente 8	dente 44	4	2	4		5	3	3		4	5	7		5	7	6		x			
	dente 43	3	2	3		3	2	3		5	9	3		5	5	3					
	dente 42	3	2	3		3	2	3		6	6	4		6	5	4					
	dente 41	3	2	3		3	2	3		6	7	6		6	5	7					
	dente 31	3	2	3		3	2	3		5	3	3		5	5	3					
	dente 32	3	2	3		3	2	3		4	4	3		4	4	3					
	dente 33	5	2	3		3	3	3		6	7	4		4	6	4					
Paciente 9	dente 41	4	3	4		3	2	3		4	3	4		4	2	3		x			
	dente 31	5	3	6		3	2	3		5	4	6		4	3	4		x			
	dente 32	5	3	3		3	2	3		5	6	7		2	8	10		x			
Paciente 10	dente 45	4	2	3		3	3	3		4	5	5		3	6	5		x			
	dente 44	4	3	3		5	3	5		4	6	3		5	3	5		x			
	dente 43	4	2	3		3	3	3		7	4	3		6	6	3		x			
	dente 42	3	2	3		4	3	3		9	9	8		9	9	8		x			
	dente 32	5	3	8		3	3	4		11	10	13		9	9	8		x			
	dente 33	3	2	3		4	3	3		5	5	5		6	6	5		x			
Paciente 11	dente 43	3	3	3		2	1	2		6	6	6		5	5	4		x			
	dente 37	8	6	5		5	6	6		8	6	5		5	6	6		x			
Paciente 12	dente 43	5	5	7		4	2	2		6	8	12		5	12	7		x			
	dente 42	5	3	7		3	3	5		5	3	10		3	10	8		x			
	dente 41	3	3	4		3	2	5		3	3	4		3	5	5		x			
	dente 31	3	2	3		2	2	3		3	2	3		2	2	3		x			
	dente 32	3	2	5		5	4	5		3	2	5		5	8	5		x			
	dente 33	4	4	4		5	3	7		4	5	7		5	13	10		x			
	dente 33	5	2	3		3	2	3		5	4	6		3	3	6		x			
Paciente 13	dente 47	3	2	4		3	2	3		3	3	4		3	2	3		x			
	dente 45	4	3	3		5	2	3		4	6	5		5	7	7		x			
	dente 44	3	2	3		3	2	5		3	3	5		3	2	5		x			
	dente 43	3	2	3		3	1	3		3	2	3		3	1	3		x			
	dente 42	3	2	3		3	2	3		3	2	3		3	2	3		x			
	dente 41	3	2	4		3	2	3		4	4	4		3	2	3		x			
	dente 31	3	2	3		3	2	2		3	2	3		3	2	3		x			
	dente 32	3	2	7		3	2	3		5	2	7		3	2	3		x			
	dente 33	5	2	3		3	2	3		5	4	6		3	3	6		x			
	dente 33	3	2	2		2	2	3		3	4	6		6	6	3		x			
Paciente 15	dente 31	3	3	3		3	2	3		3	3	3		3	2	3		x			
	dente 32	3	2	2		2	3	2		3	2	3		3	2	3		x			
	dente 33	3	2	2		2	3	2		3	5	2		2	4	4		x			
	dente 33	3	2	2		2	3	2		3	5	2		2	4	4		x			
Paciente 16	dente 43	2	2	3		3	2	2		4	3	3		4	5	4		x			
	dente 42	5	3	6		4	3	3		9	6	8		9	8	8		x			
	dente 41	5	3	5		4	5	4		8	9	9		8	8	8		x			
	dente 31	3	2	2		5	3	3		8	7	6		8	6	6		x			
	dente 32	6	2	5		6	7	10		9	6	8		9	10	12		x		x	
	dente 33	3	2	2		4	3	3		5	4	4		6	5	5		x			
	dente 33	3	2	2		4	3	3		5	4	4		6	5	5		x			

Tabela 4. Tabela representativa dos valores de profundidade de sondagem (em mm) da área peri-implantar obtidos em T1 e T2 e dados de sangramento à sondagem.

T1						Sangramento à sondagem	T2						Sangramento à sondagem
V			L			5 implantes	V			L			5 implantes
MV	V	DV	ML	L	DL		MV	V	DV	ML	L	DL	
1	1,4	1,6	1,6	1,4	1,6	5	1	1,2	1,6	1,6	1,4	1,6	5
1,2	1,2	1,4	1,2	1	1	2	1	1,4	1,4	1,4	1	1	
1,2	1,6	1,4	1	1	1	3	1,4	1,4	1,4	1,2	1	1	2
2,8	2,2	2	2	1,8	1,6		2,4	2,4	2	1,6	1,6	1,6	
1,8	2,2	2	2,2	1,8	2	3	1,8	2	2,2	2	1,8	2,2	4
1,4	1,6	1,4	1,4	1	1	3	1	1,4	1,2	1,4	1	1,2	2
Paciente saiu do estudo													
2	1,6	1,6	1,2	1	1		1,6	1,4	1,2	1	1	1	2
2,8	2,4	2,4	2	1,4	1,2	5	2,2	2,2	2,4	1,4	1,2	1,2	5
3	2,6	3	3	2,8	2,4	5	2,6	1,8	2,6	2,4	1,2	1,8	2
2	2,4	2	1,4	1,4	1,6		1,8	2	2	1,2	1,4	1,6	
2,6	2,4	2,4	1,6	1,8	2,4		2,8	2,2	2,4	1,6	1,8	2,8	
2,8	2,6	2,6	2,6	2,4	2,2	4	3	3	2,2	2,2	2	2,4	5
2,4	2,4	1,8	1,8	1,8	1,6	2	2	2,4	1,8	1,2	1,2	1,2	2
Paciente saiu do estudo													
1,4	1,2	1,4	1,4	1,4	1,6		1,2	1,2	1,2	1	1,2	1,4	
28,4	27,8	27	24,4	22	22,2	32	25,8	26	25,6	21,2	29,6	22	29

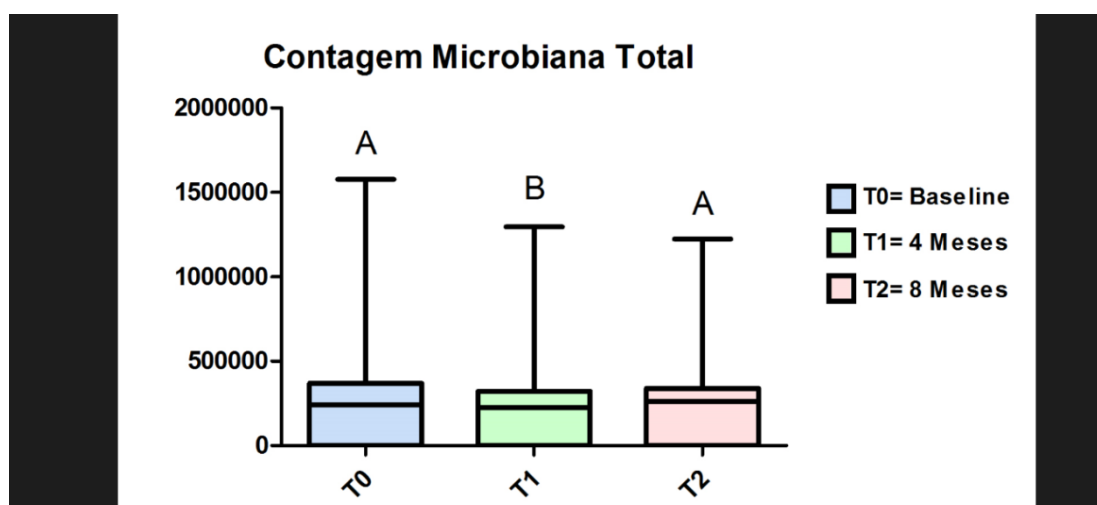


Gráfico 1. Gráfico representativo do número de micro-organismos provenientes dos sítios avaliados nos diferentes tempos: T0 (dentes), T1 (implantes após 4 meses de função) e T2 (implantes após 8 meses). Letras diferentes significam diferenças significantes entre os grupos detectadas pelo teste de Friedman seguido por pós-teste de Dunn: $p < 0,05$).

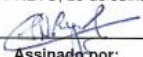
7.1. Artigo 2

O artigo 2 dessa dissertação foi o capítulo de livro abaixo referenciado:

Gomes J, Padovan LEM, Klüppel L, Sartori EM, Sartori IAM. Reabilitação de maxila atrófica: aspectos envolvidos na seleção da técnica cirúrgica. IN Sartori IAM, Padovan LEM, Melo ACM, Klüppel L, Bernardes SR. Reabilitações orais com implantes osteointegrados em casos de maior complexidade. Nova Odessa,SP:Napoleão,2015.456p.

8. Anexos

8.1 Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP 
Continuação do Parecer: 731.125
Resposta: o TCLE foi corrigido de acordo com a orientação. Análise: Pendência atendida.
Pendência 4: Atualizar o orçamento prevendo o pagamento das radiografias e despesas de transporte e alimentação nos dias que o participante for ao ILAPEO apenas para Participar da Pesquisa. Resposta: as informações foram incluídas no TCLE e na Plataforma Brasil. Análise: Pendência atendida.
Recomendações: Não há.
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).
Situação do Parecer: Aprovado
Necessita Apreciação da CONEP: Não
Considerações Finais a critério do CEP: Conforme deliberado na 168ª R.E. do CEP.
RIBEIRAO PRETO, 29 de Julho de 2014  Assinado por: Simone Cecilio Hallak Regalo (Coordenador)

8.2 Link das normas da revista Clinical Oral Implants Research:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1600-0501/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1600-0501/homepage/ForAuthors.html)