



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO



JEFFERSON ANTONIO GOMES

**Acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico de pacientes com histórico de doença periodontal que receberam prótese total mandibular implantossuportada**

**Ribeirão Preto  
2021**



**JEFFERSON ANTONIO GOMES**

**Acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico de pacientes com histórico de doença periodontal que receberam prótese total mandibular implantossuportada**

**Versão Original**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

**Ribeirão Preto  
2021**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Gomes, Jefferson Antônio

Acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico de pacientes com histórico de doença periodontal que receberam prótese total mandibular implantossuportada. Ribeirão Preto, 2021.

106 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia (Reabilitação Oral).

Orientador: do Nascimento, Cassio.

1. Implante dentário. 2. Biofilmes 3. Biologia molecular. 4. Prótese Dental Implantossuportada.

**GOMES, J. A. Acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico de pacientes com histórico de doença periodontal que receberam prótese total mandibular implantossuportada.** 2021. Tese (Doutorado em Odontologia – Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a). Dr. (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_



*Dedicatória*

---

---



### ***A Deus***

*Pela manutenção da minha vida, concedendo força para ir além dos meus limites. Meu amigo fiel em todos os momentos. Sempre percebi Seu amparo e, em muitas ocasiões, senti sendo carregado em seus braços.*

### ***Aos meus pais***

*Nilton Antônio Gomes (in memoria) e Geny Vitalina de Souza, meus exemplos de vida, íntegros, trabalhadores, simples e extremamente dedicados aos filhos. Meu eterno agradecimento por me ensinar o valor da responsabilidade, do compromisso, da dedicação, da gratidão... 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, minha eterna amada, 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 proporcionou a tranquilidade que eu precisava ao saber que nossos filhos estavam seguros. E mesmo estando longe, você sempre esteve nos meus pensamentos. Te conhecer foi uma grande sorte, te conquistar foi meu grande desafio, te amar para sempre meu eterno objetivo.*

### ***Às minhas irmãs***

*Jucéia e Joelma, são apenas duas, mas preenchem minha vida como se fossem muitos. Crescemos juntos, lutamos juntos e estamos colhendo os resultados juntos. Amo vocês.*

### ***Aos meus filhos***

*Pedro Afonso e Marco Antonio, presentes de Deus, razões do meu viver... Vocês me ensinaram o valor da persistência, dedicação e do amor incondicional.*

***À vocês, amada família, dedico este trabalho!***



*Agradecimentos Especiais*



*Ao Professor. Dr. Cássio do Nascimento, agradeço a Deus pela sua vida, dedicação, paciência e humildade. Foi um presente Dele ser agraciado por sua orientação. O meu muito obrigado por acreditar que eu seria capaz. Seu jeito simples e amigável justificam suas conquistas.*

*Ao Professor Dr. Rúbens Ferreira de Albuquerque Júnior, agradeço pela firmeza em seus ensinamentos. “Do your best” levarei como preciosa conduta para o resto de minha vida.*

*À Professora Dr<sup>a</sup> Ivete Aparecida de Mattias Sartori, meu agradecimento por não medir esforços no início de nossa jornada de atender meus anseios de pesquisa. Seus conhecimentos e experiência clínica são impressionantes.*

*Ao Dr. Thalisson Saymo, parceiro de laboratório, serei eternamente grato por sua amizade. A você devo a realização de todos os meus experimentos. Obrigado por não se importar de passarmos finais de semana inteiros no laboratório . Não poderia esperar nada menos do que o sucesso que tens conseguido alcançar.*

*Às companheiras de pós-graduação, Dr<sup>a</sup> Alice Ramos, e Dr<sup>a</sup> Millena Mangueira. Muito obrigado pelo suporte que me proporcionaram durante todo o curso. A amizade de vocês me fez sentir em casa em Ribeirão Preto.*

*Aos voluntários da pesquisa, pela confiança e compromisso com o estudo. Obrigado por atender aos meus apelos de marcação de consultas. Sem vocês esse trabalho não existiria.*



# Agradecimientos



*À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), que me concedeu a oportunidade de crescimento profissional.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da FORP - USP, representada inicialmente pelo coordenador Professor Dr. Ricardo Faria Ribeiro, e agora pela Professora Dra. Andréa Cândido dos Reis pelo empenho em tornar o programa cada vez melhor e formar profissionais capacitados para o mercado de trabalho.*

*Aos Docentes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP – USP, pelos ensinamentos de qualidade, pelo carinho e cuidado com os alunos.*

*Aos meus amigos e colaboradores no Instituto Latino Americano de Ensino e Pesquisa (ILAPEO). O apoio de vocês tornaram esse sonho uma realidade.*

*À toda minha família, amigos e colaboradores da clínica UNIODONTO. O companherismo de vocês me deram suporte para atingir meus objetivos.*

*À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,*

***Meus sinceros agradecimentos!***



*“Crie em mim, oh Deus, um coração puro e renove dentro de mim um espírito inabalável”*

***Salmos 51:10***



Resumo

---

---



## RESUMO

GOMES, J.A. **Acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico de pacientes com histórico de doença periodontal que receberam prótese total mandibular implantossuportada.** 2021. Tese (Doutorado em Odontologia – Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A literatura sugere que a manutenção de uma microbiota associada com a periodontite crônica aumenta o risco de infecções e reações inflamatórias nos tecidos de suporte. Técnicas moleculares de diagnóstico, como o método de hibridização *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, contribuem para a identificação dos patógenos frequentemente envolvidos nas infecções peri-implantares em indivíduos com história prévia de doença periodontal. O objetivo do presente estudo foi caracterizar, após 5 anos de função mastigatória, a microbiota peri-implantar de pacientes com história prévia de doença periodontal e que receberam prótese fixa total mandibular implantossuportada. Uma análise dos indicadores clínicos de profundidade de sondagem e sangramento à sondagem, bem como a reabsorção óssea marginal, também foram avaliados ao longo do tempo. Doze indivíduos com histórico de periodontite crônica receberam 5 implantes imediatos e foram reabilitados com uma prótese total fixa mandibular. Dados microbiológicos (contagem microbiana, perfil microbiano e diversidade microbiana) e indicadores clínicos (profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e reabsorção marginal óssea) foram avaliados após 4 e 5 anos de função dos implantes. Trinta e cinco espécies microbianas distintas incluindo bactérias e *Candida*, foram detectadas e quantificadas pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os resultados mostraram que a microbiota peri-implantar foi significativamente modificada após 5 anos de função, com um aumento na abundância de patógenos periodontais e alta diversidade microbiana; o perfil microbiano foi significativamente diferente daquele encontrado nos dentes remanescentes no início do estudo (*baseline*). Entretanto, não foram encontradas correlações entre os achados microbiológicos (contagem e perfil microbiano) e os indicadores clínicos ao longo do tempo. Concluiu-se que, após 5 anos de função, a microbiota peri-implantar apresentou diferenças significantes de contagem de células e perfil microbiano quando comparadas aos dentes remanescentes, com um aumento de espécies consideradas periodontopatogênicas. A microbiota não influenciou os indicadores clínicos, que foram compatíveis com a condição de saúde ao longo do tempo.

Palavras chave: Implantes Dentários, Biofilmes, Biologia molecular, Prótese Dental implantossuportada.

Abstract



## ABSTRACT

GOMES, J. A. **Clinical, radiographic and microbiological monitoring of patients with a history of periodontal disease who received implant-supported total mandibular prostheses.** Tese (Doutorado em Odontologia – Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Literature suggests that maintenance of specific oral bacteria associated with chronic periodontitis may increase the risk of adverse health outcomes in the implant-supported restorations. The aim of this study was to characterize the microbiota of implant-supported full-mandible restorations during 5 years of function on patients with a previous history of chronic periodontitis. We also assessed the impact of microbioma on the clinical outcomes. Twelve individuals with history of chronic periodontitis received 5 immediate implants and a fixed complete-arch mandibular prosthesis. Microbiota (microbial counts, microbial profile, and diversity) and clinical outcomes (probing depth, bleeding on probing, and bone resorption) were examined before teeth extraction and up to 5 years post-loading. Thirty-five microbial species including bacteria and *Candida* were detected and quantified by DNA checkerboard analysis. Microbiota of dental implants has significantly modified after 5 years of loading, with increased abundance of periodontal pathogens and high microbial diversity; microbial profile of implants was quite different to that found in the remaining teeth at baseline. Nevertheless, no correlations between microbial taxa/counts and clinical outcomes were observed. Microbiota of dental implants and remaining teeth presented different microbial profile and genome counts after 5 years of function; both microbial counts and diversity were shown increased after the entire experimental period. Microbiota did not impact the clinical outcomes, which were consistent with a healthy condition over time.

Keywords: Dental Implants, Biofilms, Molecular Biology, Implant-supported Dental Prosthesis.



## Lista de Figuras

---

---



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sequencia cirúrgica dos pacientes do projeto de pesquisa .....	52
<b>Figura 2.</b> Sondagem dos implantes com sonda manual. ....	53
<b>Figura 3.</b> Tomada radiográfica com o auxílio do dispositivo de padronização. ....	54
<b>Figura 4.</b> Coleta microbiológica com o auxílio de cones de papel na face vestibular dos dentes antes das extrações para instalação dos implantes. ....	55
<b>Figura 5.</b> Coleta microbiológica dos implantes com o auxílio de cones de papel absorvente posicionados nas faces vestibular e lingual .....	55
<b>Figura 6.</b> Desnaturação das fitas de DNA e resfriamento imediato em gelo .....	57
<b>Figura 7.</b> Sequencia de trabalho para hibridização em Minislot 30. ....	58
<b>Figura 8.</b> Ilustração de uma reação de hibridização pelo método Checkerboard DNA-DNA Hybridization. ....	60
<b>Figura 9.</b> Análise da membrana vista no software CLIQS 1D®. ....	61
<b>Figura 10.</b> Efeito relativo do fator “tempo de coleta” sobre a contagem microbiana total. ....	66
<b>Figura 11.</b> Contagem microbiana total nos três períodos de investigação. ....	67
<b>Figura 12.</b> Os valores das contagens microbianas individuais e a significância para cada uma das 35 espécies investigadas. ....	68
<b>Figura 13.</b> Representação da abundância relativa das espécies, índice de diversidade Shannon e índice de diversidade de Simpson .....	69
<b>Figura 14.</b> Padrões de similaridade e dissimilaridade de Jaccard. ....	70
<b>Figura 15.</b> Valores das medianas, intervalo interquartil, valores mínimo e máximos para os indicadores de profundidade à sondagem, sangramento à sondagem e reabsorção óssea marginal dos dentes e implantes .....	71



## *Sumário*

---

---



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	35
2. Proposição.....	43
2.1 Objetivo geral .....	45
2.2 Objetivos específicos .....	45
2.3 Hipótese nula .....	45
3. Material e Métodos.....	47
3.1 Desenho do estudo .....	49
3.2 Seleção dos participantes.....	49
3.3 Intervenções cirúrgicas e protéticas .....	50
3.4 Avaliação dos indicadores clínicos e radiográficos .....	53
3.5 Avaliação microbiológica.....	54
3.5.1 Coleta das Amostras de Biofilme.....	54
3.5.2. Processamento microbiológico pela técnica de hibridização <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> .....	55
3.5.3 Confecção das Sondas de DNA genômico.....	56
3.5.4 Reação de Hibridização.....	57
3.5.5 Análise dos dados clínicos e microbiológicos .....	60
4. Resultados.....	63
4.1 Contagem Microbiana Total .....	65
4.2 Contagem Microbiana Individual .....	67
4.3 Diversidade e Similaridade das Comunidades Microbianas .....	68
4.4 Indicadores Clínicos e Correlação com os Achados Microbiológicos .....	70
5. Discussão.....	73
6. Conclusões .....	81
Referências .....	85
Anexo.....	97
Apêndice.....	103



# 1. Introdução



## 1. INTRODUÇÃO

A partir da descoberta e estabelecimento dos princípios da osteointegração por Per Ingvar Brånemark (BRÅNEMARK *et al.*, 1969), o uso dos implantes tem se tornado uma opção amplamente utilizada para reabilitação parcial ou total de indivíduos que tiveram perda de elementos dentários, atingindo, nos dias de hoje, uma alta previsibilidade e taxas de sobrevivência que variam de 90-97% em acompanhamentos de 5 a 10 anos (ESPOSITO *et al.*, 1998; BERGLUNDH; PERSSON; KLINGE, 2002; FERRIGNO *et al.*, 2002; ROOS-JANSAKER *et al.*, 2006a; ROOS-JANSAKER *et al.*, 2006b; WINDAEL *et al.*, 2018; WERBELOW; WEISS; SCHRAMM, 2020). Kern *et al.*, em uma revisão sistemática com meta-análise de 2016, relataram taxas de 97,9% a 98,9% de sobrevivência em acompanhamento de 5 anos de próteses fixas e removíveis sobre implantes em maxilares edêntulos. Um outro estudo (MORASCHINI *et al.*, 2015) relatou sobrevivência de 94,6% com seguimento mínimo de 10 anos, e as taxas médias de sucesso também foram consideradas relevantes, de 89,7% considerando-se um tempo de seguimento médio de 14,6 anos. Ravald *et al.* (2013), demonstraram baixa incidência de perda óssea marginal ao redor dos implantes e 95,1% de sobrevivência com um período de 12-15 anos de seguimento.

Entretanto, apesar dos altos índices de sucesso e sobrevivência, a literatura reporta que um histórico prévio de doença periodontal pode representar um fator de risco para o desenvolvimento da peri-implantite, e comprometer o sucesso em longo prazo dos implantes (SGOLASTRA *et al.*, 2015; MONJE *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018; BELIBASAKIS; MANOIL, 2021). Uma parcela significativa dos implantes pode apresentar falhas, seja precoce, resultado da incapacidade de integração à estrutura óssea (ALSAADI *et al.*, 2007; CHRCANOVIC *et al.*, 2016; KORSH *et al.*, 2021), ou tardia, influenciada pelo ambiente microbiano oral, hábitos parafuncionais e fatores locais e sistêmicos (CHRCANOVIC; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2014; DO *et al.*, 2020). Na fase tardia da terapia com implantes dentários pode aparecer a mucosite peri-implantar, definida como uma reação inflamatória reversível dos tecidos moles sem evidência radiográfica de perda óssea (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994). Os sinais clínicos da mucosite peri-implantar incluem eritema e edema associado a sondagem  $\geq 4$ mm e sangramento à sondagem suave. Outra complicação, a peri-implantite, se evidencia como um processo inflamatório progressivo e irreversível associado à placa que ocorre em torno dos tecidos peri-implantares com subsequente perda progressiva dos tecidos de suporte (LANG; BERGLUNDH, 2011; SANZ;

CHAPPLE, 2012) e que afeta mais de 14% dos implantes após 5 anos em função (BERGLUNDH; PERSSON; KLINGE, 2002; NOROWSKI; BUMGARDNER, 2009; MOMBELLI, 2002; MOMBELLI; MÜLLER; CIONCA, 2012).

Após a instalação, os implantes são expostos à saliva e formação de biofilme da cavidade oral que contém um grande número de espécies de micro-organismos, incluindo os potencialmente patogênicos para a doença periodontal (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 insucesso dos implantes (SBORDONE *et al.*, 1995; ROCCUZZO *et al.*, 2014; COMPARIN; CORÓ; CLAUDINO, 2014; CORTÉS-ACHA *et al.*, 2017; HÄMMERLE *et al.*, 2018). A presença de bactérias periodontopatogênicas nos sulcos peri-implantares são considerados fatores de risco para o sucesso dos implantes, e sua presença pode ser resultado de dentes com periodontite próximos aos implantes, em pacientes parcialmente edêntulos (GOUVOUSSIS; SINDHUSAKE; YEUNG, 1997; ROCCUZZO *et al.*, 2014; JERVØE-STORM *et al.*, 2015; RAFFAINI *et al.*, 2018). De acordo com a literatura, há uma semelhança entre a microbiota formada em torno dos implantes dentários com os dentes comprometidos remanescentes (MOMBELLI; DÉCAILLET, 2011). O desequilíbrio da microbiota oral seguida do aumento de patógenos oportunistas pode levar à destruição inflamatória dos tecidos peri-implantares (POKROWIECKI *et al.*, 2017). O perfil microbiológico de implantes que falharam é comparável às espécies encontradas em locais saudáveis, mas com uma quantidade maior de anaeróbios Gram-negativos (AUGTHUN; CONRADS, 1997; SALCETTI *et al.*, 1997; MENINI *et al.*, 2020).

A literatura tem demonstrado que o desenho da conexão do implante e os espaços existentes com seus pilares intermediários tem forte influência na penetração microbiana e na consequente inflamação do tecido peri-implantar (GROSS; ABRAMOVICH; WEISS, 1999; VERDUGO *et al.*, 2014; LAURITANO *et al.*, 2020), principalmente quando conexões de hexágono externo são usadas (ALBREKTSSON *et al.*, 1986; PERSSON *et al.*, 1996; VERDUGO *et al.*, 2014; SEN; SERMET; GÜRLER, 2019). Esses espaços existentes nos implantes e seus pilares atuam como reservatórios para a colonização e crescimento bacteriano (SAKKA; BAROUDI; NASSANI, 2012). A penetração microbiana por meio da interface implante-pilar já foi intensamente observada em vários estudos *in vitro* (AL-JADAA *et al.*, 2015; do NASCIMENTO *et al.*, 2015; GHERLONE *et al.*, 2016; KOUTOUZIS; GADALLA; LUNDGREN, 2016) e *in vivo* (SUBRAMANI *et al.*, 2009; PIMENTEL *et al.*, 2014; do

NASCIMENTO *et al.*, 2016). Estudos demonstram que as conexões internas dos implantes apresentam menores taxas de infiltrações quando comparadas às conexões externas (DIBART *et al.*, 2005; LARRUCEA VERDUGO *et al.*, 2014). Mesmo com o avanço dos sistemas de conexão implante-pilar visando aumentar a estabilidade dos componentes, a contaminação interna através dos pilares é esperada devido ao diâmetro médio das menores bactérias orais variarem de 0,3 a 0,7 micrometros (LOVE; JENKINSON, 2002; WEART *et al.*, 2007); e os espaços de desajustes para implantes de conexão interna e externa podem variar de 2,3 a 100 micrometros (TSUG; HAGIWARA; MATSUMURA, 2008; do NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Outro fator importante, e que deve ser considerado nos casos de infecção, são as diferenças fisiológicas entre os dentes naturais e implantes. Enquanto os dentes naturais são inseridos no alvéolo por meio do ligamento periodontal, os implantes são ancorados diretamente ao osso. A ausência de ligamento periodontal nos implantes limita o suprimento sanguíneo, restringindo dessa forma a quantidade de nutrientes e a chegada de células imunes para combater os estágios iniciais da infecção bacteriana, tornando a região mais susceptível às infecções (BELIBASAKIS, 2014; BELIBASAKIS *et al.*, 2015). A colonização bacteriana do biofilme já está presente 30 minutos após a inserção do implante na cavidade oral (BELIBASAKIS *et al.*, 2015). Um estudo mostra que nos primeiros meses após a instalação do implante a microbiota apresenta uma diversidade microbiana menor em relação aos dentes vizinhos remanescentes (PAYNE *et al.*, 2017). Neste estágio pode haver um equilíbrio simbiótico com o hospedeiro compatível com a saúde peri-implantar, na ocorrência de uma ruptura deste equilíbrio, o microambiente pode ser alterado por fatores que favorecem o início da inflamação dos tecidos adjacentes (BELIBASAKIS, 2014; HEITZ-MAYFIELD; TELES, LANG, 2015).

A metodologia de diagnóstico *Checkerboard DNA-DNA hybridization* utilizada o material genético das amostras de biofilme e tem sido extensivamente usada para a detecção e quantificação de espécies microbianas que habitam a cavidade oral (DAHLEN *et al.*, 2012; HALLSTRÖM *et al.*, 2012, DO NASCIMENTO *et al.*, 2011; DO NASCIMENTO *et al.*, 2012; DO NASCIMENTO *et al.*, 2013; DO NASCIMENTO *et al.*, 2014; DO NASCIMENTO *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2017; BELIBASAKIS; MANOIL, 2021). Utiliza sondas feitas a partir de DNA genômico (SOCRANSKY *et al.*, 1994), e apresenta como principal vantagem a possibilidade de identificar e quantificar várias espécies microbianas em um grande número de amostras da cavidade oral simultaneamente. Além disso, como a metodologia consiste na identificação através do material genético, permite a detecção de células viáveis e não viáveis.

Resultados relacionados à reabilitação de arco completo com implantes imediatos em pacientes com histórico de periodontite crônica em acompanhamentos mais longos ainda são escassos e não apresentam resultados completamente definidos ou conclusivos. Ainda não está claro se a microbiota dos dentes remanescentes comprometidos e que foram removidos interferem na formação da nova microbiota ao redor dos implantes e, ainda, se esta microbiota se mantém por períodos prolongados. A literatura mostra que a incidência de peri-implantite pode aumentar após 5 anos de carga funcional em pacientes com história prévia de comprometimento periodontal (PANDOLFI *et al.*, 2020). Neste contexto, monitorar a microbiota de indivíduos com histórico de periodontite crônica ao longo do tempo mostra ser importante para o sucesso e sobrevivência das próteses totais fixas implantossuportadas. Desta forma, com base nas limitações do conhecimento atual, este estudo clínico objetivou abordar as seguintes questões de pesquisa: (1) A microbiota formada ao redor dos implantes será similar àquela presente nos dentes remanescentes que foram removidos?; (2) Como essa microbiota varia ao longo do tempo?; e (3) Qual a implicação clínica (avaliada por meio dos indicadores clínicos de inflamação dos tecidos moles e duros), em longo prazo (após 4 e 5 anos), da colonização microbiana associada aos implantes? A diversidade microbiana e as potenciais alterações ao longo do tempo foram avaliadas pela hibridização *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Foi testada a hipótese de que a microbiota dos implantes dentários permanece similar ao longo do tempo à microbiota dos dentes remanescentes extraídos (as contagens microbianas e as comunidades em torno dos implantes dentários permaneceriam semelhantes às encontradas no início do estudo até o acompanhamento de 4 e 5 anos), e isso pode se refletir nos indicadores clínicos de acompanhamento.

Os resultados microbiológicos e clínicos, observados em longo prazo, contribuirão para uma melhor compreensão do papel do biofilme na manutenção da saúde ou no desenvolvimento de potenciais lesões inflamatórias nos tecidos suportes peri-implantares, podendo orientar no desenvolvimento de recomendações clínicas que possam evitar ou minimizar a proliferação dos micro-organismos, desenvolvimento de doenças e consequente perda dos implantes. Os dados obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas em pacientes com histórico de doença periodontal crônica que necessitarão de reabilitação com implantes e ajudarão a compreender melhor o papel das bactérias periopatogênicas nas infecções peri-implantares. Os resultados obtidos neste estudo também poderão fornecer bases científicas para futuras investigações envolvendo a avaliação do impacto do biofilme

microbiano no sucesso, em longo prazo, das restaurações implantossuportadas em pacientes com história prévia de doença periodontal.



## 2. Proposição



## **2. PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil microbiológico do biofilme formado no sulco peri-implantar dos implantes de pacientes com história prévia de doença periodontal e que receberam prótese fixa total mandibular implantossuportada após 4 e 5 anos de função. Uma análise dos indicadores clínicos de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, bem como a reabsorção óssea marginal, serão também avaliados ao longo do tempo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Identificar e quantificar, por meio do método de hibridização DNA Checkerboard, a presença de até 35 espécies microbianas colonizando os sulcos peri-implantares após 4 e 5 anos de função.
- ✓ Avaliar os indicadores de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e reabsorção óssea marginal dos implantes após 4 e 5 anos de função.

### **2.3 Hipótese nula**

A hipótese nula testada neste estudo foi de que as contagens microbianas e as comunidades em torno dos implantes dentários permaneceriam semelhantes às encontradas no início do estudo até o acompanhamento de 4 e 5 anos e não teriam efeito sobre os indicadores clínicos de saúde dos tecidos de suporte.



### 3. *Material e Métodos*



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do estudo

Este estudo clínico consistiu em uma avaliação observacional prospectiva da colonização microbiana ao redor de implantes utilizados como pilares de próteses totais fixas mandibulares parafusadas para a reabilitação de indivíduos com história prévia de doença periodontal crônica, avaliando o efeito do biofilme formado sobre os indicadores clínicos de saúde tecidual ao longo do tempo. Trata-se da continuação de um estudo clínico intervencional onde foi constituído um único grupo de estudo, por amostragem de conveniência, com indivíduos que apresentavam indicação de extração dos remanescentes dentários e possibilidade de instalação imediata de implantes (GOMES *et al.*, 2017). Os participantes do estudo receberam próteses totais fixas mandibulares parafusadas (tipo protocolo) suportadas por cinco implantes, com carregamento imediato. Foram definidos como desfecho primário para este estudo a Avaliação Microbiológica, e como desfecho secundário a Avaliação dos Indicadores Clínicos. As amostras dos biofilmes formados ao redor dos implantes, assim como os dados referentes aos indicadores clínicos, foram avaliados imediatamente antes da extração dos dentes remanescentes (T1 - Baseline) e após 4 (T2) e 5 (T3) anos de função mastigatória. Este estudo apresentou cegamento para as etapas clínicas, microbiológicas e análises dos dados. O desenho experimental do estudo, em sua etapa inicial, foi realizado conforme a declaração CONSORT para ensaios clínicos (MOHER *et al.*, 2001, BOUTRON *et al.*, 2008).

#### 3.2 Seleção dos participantes

Foram selecionados para o estudo 16 pacientes que procuraram por tratamento reabilitador no Instituto Latino Americano de Ensino e Pesquisa (Faculdade ILAPEO, Curitiba-PR), no ano de 2014, e apresentavam indicação de extração dos dentes remanescentes por motivo de doença periodontal crônica. Todos os participantes deveriam ter indicação clínica para reabilitação por meio de próteses totais fixas mandibulares implantossuportadas (tipo Protocolo). O tamanho do N amostral 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 nos três tempos de investigação propostos (T1 = baseline, T2, T3). Foi considerado um desvio-padrão de 1,53 nas medidas de tempo inter-indivíduos (valores dos desvios estimados a partir do observado em estudos da literatura). O poder estatístico (power) foi de 90% para o fator tempo, com nível de significância igual a 5% e magnitude do efeito (effect size) de 1,69.

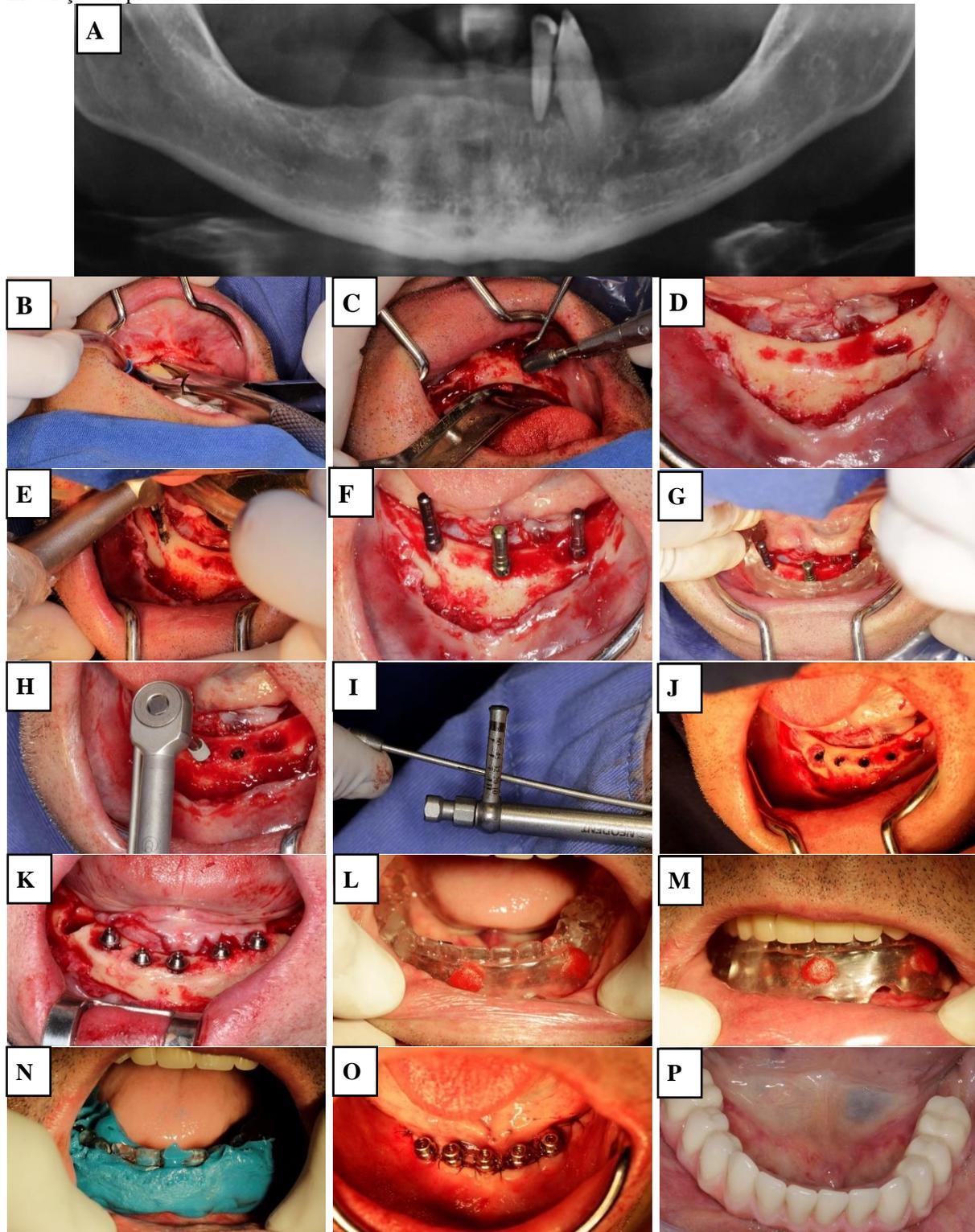
Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: (1) indivíduos maiores de 18 anos; (2) dentes inferiores com comprometimento periodontal e indicação de extração e reabilitação com implantes dentários; (3) possuir próteses totais maxilares clinicamente satisfatórias; (4) apresentar espaço adequado na mandíbula anterior para a inserção de cinco implantes; (5) serem capazes de manter higiene bucal adequada e higienizar suas próteses; (6) apresentar um estado de saúde sistêmica que possibilite procedimentos cirúrgicos; (7) Serem capazes de fornecer um consentimento livre e esclarecido. Os critérios de exclusão foram: gravidez, lactação, tratamento periodontal ou antibiótico nos últimos 3 meses, presença de qualquer condição sistêmica que possa influenciar o curso da doença periodontal ou que exigem pré-medicação para procedimentos e fumantes. Os pacientes 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, e 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 (CAAE 63508116.0.1001.5419).

### **3.3 Intervenções cirúrgicas e protéticas**

Os procedimentos para a colocação dos implantes incluíram exames pré-operatórios e radiográficos para determinar as condições anatômicas relativas ao volume ósseo e à mucosa da área de suporte de cada indivíduo. Radiografias panorâmicas e tomografias adicionais foram realizados individualmente conforme a necessidade clínica. Foi prescrita antibioticoterapia profilática (Amoxicilina 2g, 1 h antes da cirurgia ) e Ibuprofeno 200 mg duas vezes diárias por dois dias (ESPOSITO *et al.*, 2008). Como medicação alternativa, Acetaminophen (650 a 1000 mg diários) ou Naproxeno Sódico (375 a 1000 mg por dia) foram prescritos. As informações relacionadas ao exame clínico, os tipos, doses e frequências de medicamentos usados no trans e pós-operatório foram registradas nos prontuários clínicos dos indivíduos e arquivados no ILAPEO. A sequência clínica do ato cirúrgico e instalação das prótese está ilustrada na Figura 1, consistindo, após visualizado em radiografia panorâmica (A) nas extrações dos dentes remanescentes (B), aplainamento do rebordo para remoção das espículas ósseas (C e D), localização dos forames mentuais direito e esquerdo e perfuração para instalação dos 5 implantes interforame (E). As duas primeiras perfurações foram feitas medialmente aos forames e, em seguida, a perfuração medial (F). Foi conferido o posicionamento das perfurações com os pinos e guia cirurgico em posição (G). Em seguida foi executado as duas últimas perfurações.

Todos os implantes usados apresentavam conexão do tipo Cone Morse (NEODENT, Curitiba, Brasil) com diâmetros e comprimentos variando de 3,5 mm a 5,0 mm e 9,00 mm a 13,00 mm, respectivamente. Nos pacientes que apresentavam uma estrutura óssea mais cortical foi inserido um implante com desenho que facilitava o corte ósseo em sua inserção (Titamax Cone Morse NeoPoros). Aqueles que apresentavam osso mais trabeculado, foi inserido um implante com maior capacidade de travamento (Drive Cone Morse, Curitiba, Brasil). Um torque mínimo de 35N durante a inserção do implante foi conseguido para garantir a carga imediata com a instalação da prótese total fixa inferior do tipo protocolo (H e I). Os implantes foram instalados ao nível ósseo ou até 2 mm abaixo (J). Após a instalação de todos os implantes e intermediários (K), a moldagem foi executada imediatamente após o término da cirurgia com o guia multifuncional previamente confeccionado (L, M e N) e os implantes/intermediários foram recobertos com protetores até a instalação das próteses (O). As próteses definitivas foram instaladas num prazo máximo de uma semana (P). Após a instalação das próteses e ajustes clínicos, instruções de higiene e manutenção foram fornecidas a cada participante e reforçadas em todos os retornos clínicos e de avaliações do estudo.

**Figura 1.** Sequencia cirúrgica dos pacientes do projeto de pesquisa: (A) Radiografia panorâmica mostrando os remanescentes dentários a serem extraídos no arco mandibular; (B) Remoção dos remanescentes dentários; (C) Aplainamento do rebordo ósseo; (D) Rebordo ósseo após a sua regularização; (E) Frezagem com a broca 2.0 para marcação do posicionamento dos implantes distais e médio; (F) Posicionamento dos pinos guias nas perfurações distais e medial; (G) Prova do guia cirúrgico; (H) Instalação dos 5 implantes; (I) Torque mínimo de 32N durante a inserção dos implantes; (J) Visão da disposição dos implantes instalados; (K) Visão dos intermediários instalados; (L e M) Fixação do guia multifuncional nos cilindros parafusados nos intermediários; (N) Moldagem com o guia multifuncional em posição; (O) Protetores instalados nos 5 intermediários ao término da cirurgia; (P) Instalação da prótese definitiva.



Fonte: Própria (2021).

### 3.4 Avaliação dos indicadores clínicos e radiográficos

Exames clínicos peri-implantares e exames por imagens radiográficas foram realizados durante todo o período proposto de investigação dos implantes. As avaliações da profundidade de sondagem e sangramento à sondagem foram realizadas com pressão controlada usando uma sonda periodontal manual (Hu-Friedy, EUA; Figura 2). Para a profundidade de sondagem, foi avaliada a distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco peri-implantar. Em cada implante, tanto as medições de sondagem quanto o sangramento foram realizados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual). Radiografias periapicais foram realizadas com um dispositivo que garantia o mesmo posicionamento da tomada radiográfica em todas as etapas do estudo com o objetivo de avaliar a reabsorção óssea marginal (SARTORI *et al.*, 2014; Figura 3). As radiografias periapicais dos implantes foram digitalizadas e a mensuração da reabsorção óssea marginal foi realizada utilizando o software Image J 1.43 (NIH, EUA). Todas as medições foram realizadas nas faces mesial e distal de cada um dos 5 implantes, e os valores de reabsorção para um determinado período foram definidos com uma média destas duas medidas. Para orientar as medições, um ponto fixo foi definido de forma aleatória na parte superior da plataforma de cada implante como um ponto de referência inicial, e um segundo ponto foi posicionado sobre a região mais alta da crista óssea marginal do lado a ser aferido.

**Figura 2.** Sondagem dos implantes com sonda manual.



Fonte: Própria (2021).

**Figura 3.** Tomada radiográfica com o auxílio do dispositivo de padronização.



Fonte: Própria (2021).

### **3.5 Avaliação microbiológica**

#### **3.5.1 Coleta das Amostras de Biofilme**

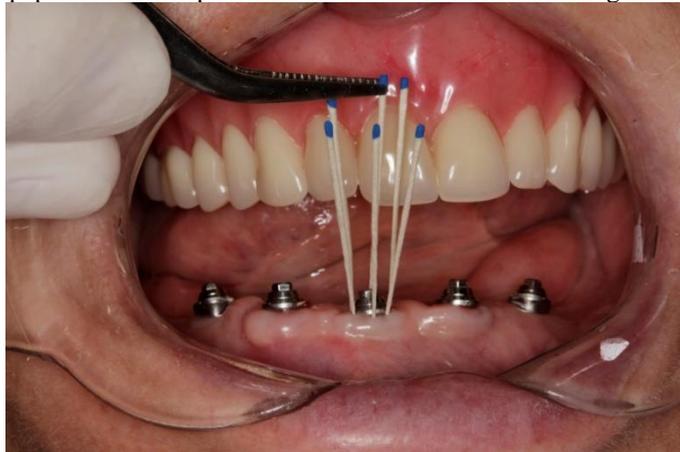
Amostras do fluido crevicular dos sulcos dentários e peri-implantares foram colhidas com o auxílio de cones de papel #30 (Figura 4 e 5). Previamente à coleta, os sítios de coleta foram secos com gaze esterilizada e isolados com o auxílio de roletes de algodão. Ao todo, foram utilizados 6 cones para constituir a amostra de biofilme de cada elemento investigado (dentes remanescentes no baseline-T1 e implantes no T2-T3), 3 posicionados no sulco vestibular e 3 no sulco lingual/palatino (região mesial, central e distal), sendo misturados ao final em um mesmo microtubo e constituindo uma única amostra para o elemento. Após a coleta, os cones foram inseridos em microtubos contendo 150 $\mu$ L de solução tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6), adicionados com 150 $\mu$ L de solução NaOH 0,5M e armazenados em temperatura de 4°C até o processamento laboratorial.

**Figura 4.** Coleta microbiológica com o auxílio de cones de papel na face vestibular dos dentes antes das extrações para instalação dos implantes.



Fonte: Própria (2021).

**Figura 5.** Coleta microbiológica dos implantes com o auxílio de cones de papel absorvente posicionados nas faces vestibular e lingual



Fonte: Própria (2021).

### **3.5.2. Processamento microbiológico pela técnica de hibridização *Checkerboard DNA-DNA Hybridization***

A técnica de hibridização de sondas de DNA genômico, *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, foi utilizada para a avaliação dos desfechos microbiológicos do estudo. Esta técnica permite a identificação e quantificação de até 45 espécies distintas de micro-organismos em um grande número de amostras, de forma simultânea (SOCRANSKY *et al.*, 1994). Todas as etapas de processamento das amostras pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, conforme

inicialmente descrito por Socransky *et al.* (1994) e modificada por do Nascimento *et al.* (2010).

Trinta e cinco espécies microbianas, incluindo bactérias colonizadoras primárias do biofilme oral e patógenos associados à doença periodontal/peri-implantar, e três espécies de *Candida* frequentemente encontradas na microbiota oral de indivíduos saudáveis e doentes foram selecionadas para serem alvo neste estudo: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides fragilis*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Escherichia coli*, *Eikenella corrodens*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus casei*, *Mycoplasma salivarium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Solobacterium moorei*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Veillonella parvula*, *Candida albicans*, e *Candida dubliniensis*.

### **3.5.3 Confeção das Sondas de DNA genômico**

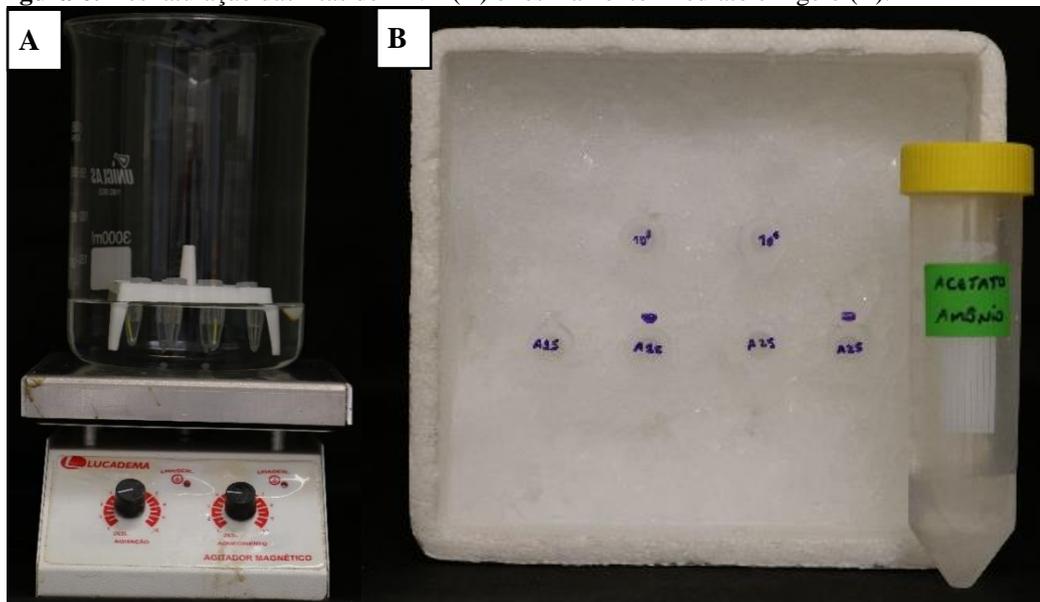
O DNA genômico das espécies foram comprados da empresa ATCC (American Type Culture Collection, Virgínia, EUA). Os DNAs genômicos foram obtidos na forma liofilizada e ressuspendidos em solução tampão TE até uma concentração final de 0,25 µg/µL. A confecção das sondas genômicas das 35 espécies-alvo de detecção deste estudo foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante do marcador genômico (*AlkPhos Direct Labelling and Detect System*, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA genômico da espécie-alvo alvo, atingindo uma concentração final de 1 ng/µL. Em microtubos individuais, os DNAs foram diluídos até uma concentração de 10 ng/µL, para um volume final de 10 µL de solução. Após a diluição, os DNAs foram desnaturados em água fervente por 5 minutos e resfriados em gelo por 5 minutos. No gelo, foram adicionados os componentes do *kit* de marcação na seguinte sequência: 10 µL de *Reaction buffer*, 2 µL de *Labelling reagent* e 10 µL de *Cross-linker solution* (1:4). Os microtubos foram agitados para homogeneização da solução constituída e incubados por 30 minutos a 37°. Em seguida, foram estocados com glicerol (50% v/v) em -20°C até o processamento laboratorial.

### 3.5.4 Reação de Hibridização

A sensibilidade da técnica foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridizações positivas para a presença de  $10^5$  e  $10^6$  células de cada uma das espécies microbianas propostas como alvo do estudo. Estas quantidades são utilizadas como padrões de referência para a quantificação dos micro-organismos presentes nas amostras de biofilme após as reações de hibridização. Neste contexto, foram preparados dois microtubos para serem utilizados como padrões de quantificação, contendo quantidades equivalentes a  $10^5$  ou  $10^6$  células de cada uma das espécies-alvo.

Previamente ao processamento, os microtubos contendo as amostras de biofilme dental e peri-implantar foram homogeneizados durante 3 minutos em um agitador de tubos (AP 56, Phoenix Luferco, Araraquara, Brasil) para a desagregação de todo o biofilme contido nos cones de papel, e na sequência, os cones foram todos removidos. Tanto os microtubos contendo as amostras de biofilme quanto os microtubos contendo as quantidades padrões de quantificação foram fervidos em temperatura de  $95^\circ\text{C}$ , durante 5 minutos, para a desnaturação das fitas de DNA e resfriados imediatamente em gelo por 5 minutos (Figura 6).

**Figura 6.** Desnaturação das fitas de DNA (A) e resfriamento imediato em gelo (B).



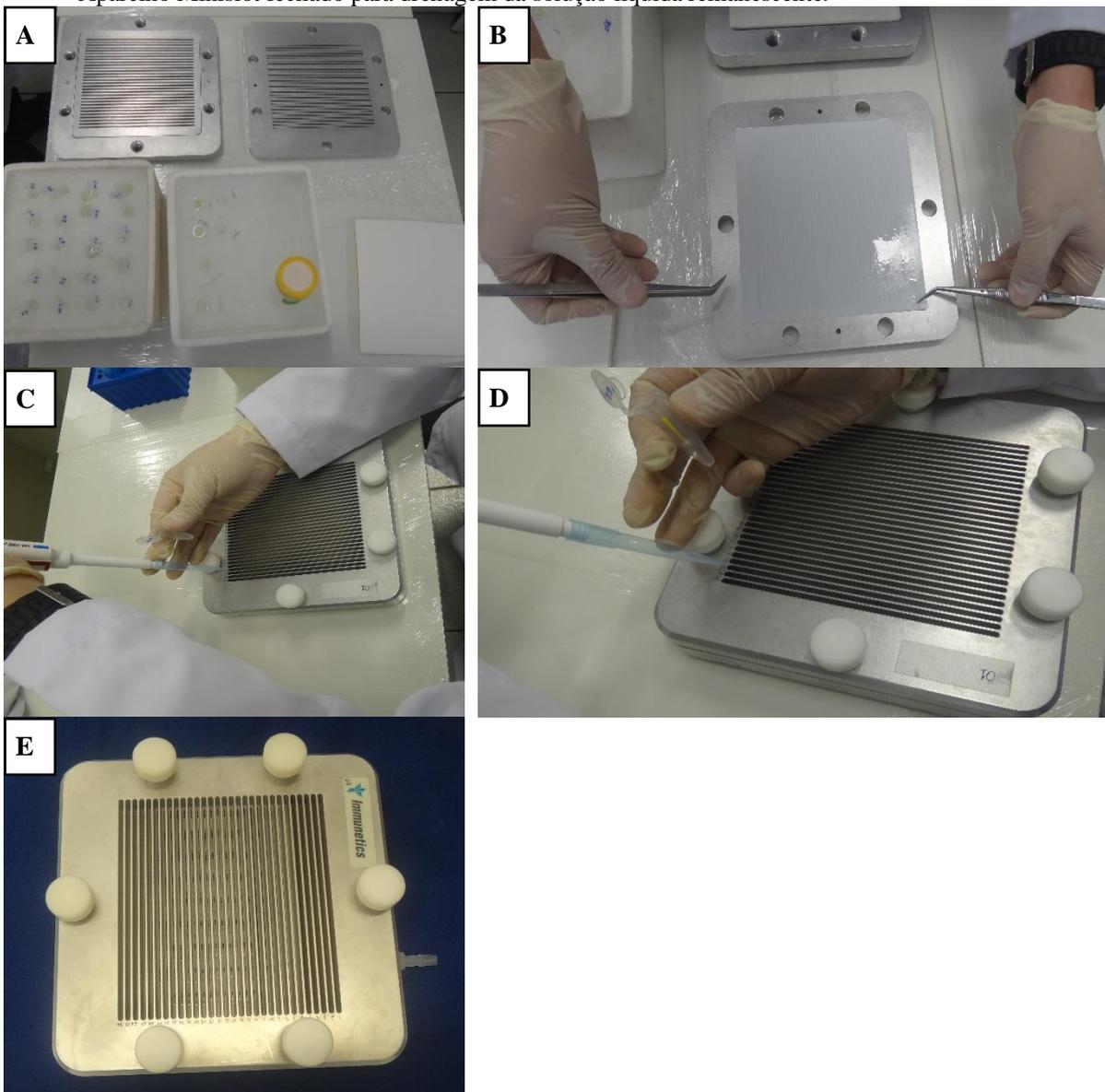
Fonte: Própria (2021).

As amostras desnaturadas do DNA dos biofilmes e padrões de quantificação, ainda resfriadas, foram aplicadas sobre uma membrana de nylon de  $15\text{ cm}^2$ , carregada positivamente (Hybond N+, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e posicionada no aparelho Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA), específico para esta técnica de hibridização e que permite a disposição paralela e individualizada de 30 amostras de DNA genômico (28

amostras clínicas de biofilmes e os 2 padrões de quantificação  $10^5$  e  $10^6$  células de cada espécie-alvo; Figura 7).

Cada amostra de biofilme e os padrões de comparação foram depositados no interior das canaletas com auxílio de pipetas automáticas de precisão. Após 5 minutos, com o auxílio de uma bomba a vácuo conectada ao aparelho Minislot 30, a solução líquida remanescente foi totalmente removida e a membrana armazenada em estufa a  $120^\circ\text{C}$  (SX 1.2 DTME, Sterilifer Ind. e Com. Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 20 minutos, para a fixação dos DNAs genômicos das amostras de biofilme e padrões de quantificação à membrana.

**Figura 7.** A: Minislot 30 aberto com amostras para aplicação; B: Posicionamento da membrana de nylon sobre a placa do Minislot; C e D: Aplicação das amostras de DNA e os padrões de comparação  $10^5$  e  $10^6$ ; E: Aparelho Minislot fechado para drenagem da solução líquida remanescente.



Fonte: Própria (2021).

Após a fixação dos DNAs das amostras de biofilme e dos padrões de comparação, uma solução contendo NaCl 1 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e *Blocking reagent* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) diluídos em 30 mL de *Hybridization Buffer* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) foi preparada e aplicada sobre a membrana e embalada em um invólucro de plástico e pré-hibridizada no forno de hibridização em 63,5°C, durante 6 horas.

Após a etapa de pré-hibridização, a membrana foi posicionada em um dispositivo de acrílico denominado *Miniblotter 45* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) para aplicação das sondas marcadas. O dispositivo apresenta 45 canaletas individuais de hibridização, permitindo a aplicação simultânea de até 45 sondas distintas. Para tanto, a membrana foi posicionada de forma que as amostras de DNA previamente fixadas à membrana ficassem orientadas em um ângulo de 90° com as canaletas do *Miniblotter 45*, formando um xadrez (*Checkerboard*) no padrão de 30 (amostras de DNA e padrões 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup>) x 45 (sondas genômicas). Cada canaleta foi utilizada como uma câmara para reações de hibridização independentes. Foram aplicadas, individualmente no interior de cada canaleta, 160 µL de sonda genômica das 35 espécies-alvo. Após a aplicação das sondas, o *Miniblotter 45* foi envolvido em filme de PVC e embalado em saco plástico para evitar o ressecamento da membrana. Todo o conjunto foi levado para a reação de hibridização no forno de hibridização em temperatura de 63,5°C, sob agitação suave, durante 16 horas.

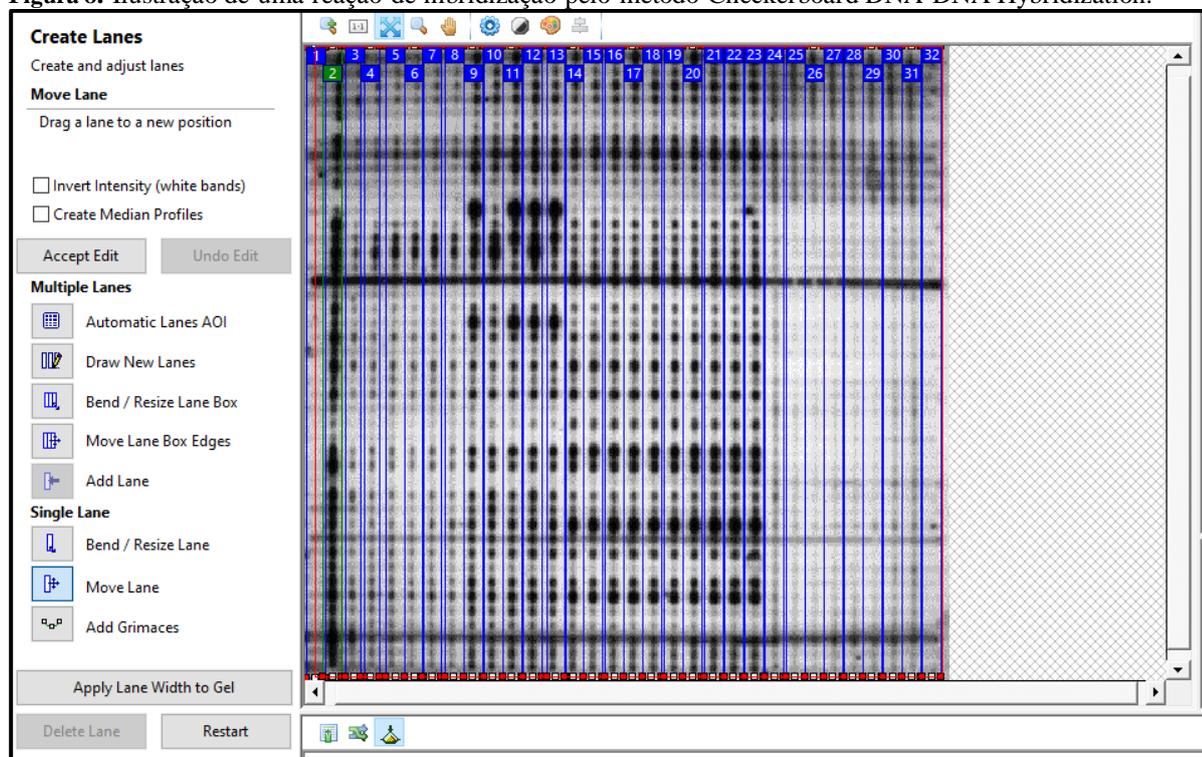
Após a reação de hibridização, as membranas passaram por um processo de lavagem para remoção das sondas que não hibridizaram completamente (ligações inespecíficas entre os DNAs). Inicialmente, foram realizadas duas lavagens de 30 minutos cada, em 67,5°C, com 500 mL de uma solução contendo Urea 2 M (Sigma Chemical Co.), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1% (Sigma Chemical Co.), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH=7; Sigma Chemical Co.), NaCl 150 mM (Sigma Chemical Co.), MgCl<sub>2</sub> 1mM (Sigma Chemical Co.) e *Blocking Reagent* (GE Healthcare). Adicionalmente, foram realizadas mais duas lavagens de 15 minutos, em temperatura ambiente, com 500 mL de uma solução contendo Tris 1 M (Sigma Chemical Co.), NaCl 2 M (Sigma Chemical Co.) e MgCl<sub>2</sub> 1M (Sigma Chemical Co.). Todas as lavagens foram realizadas sob agitação vigorosa, em forno de hibridização.

A detecção dos sinais de hibridização provenientes do cruzamento dos DNAs das amostras de biofilme coletadas com os DNAs das sondas genômicas marcadas de cada uma das 35 espécies-alvo foi realizada por meio de uma reação de quimiluminescência. Após as lavagens, foram aplicados 3 mL do reagente de detecção CDP-Star® (GE Healthcare,

Buckinghamshire, Reino Unido) sobre a membrana, deixando-o em contato com toda sua superfície durante 30 minutos, protegido da luz. Em seguida, o excesso do reagente de detecção foi removido e a membrana foi embalada com filme plástico de PVC para posterior exposição em cassete de autorradiografia.

Cada membrana foi posicionada dentro de um cassete de autorradiografia (Hypercassete, Buckinghamshire, Reino Unido), em câmara escura, onde permaneceu em contato com um filme para autorradiografia (HyperFilm, GE Healthcare), durante 1 hora. Após esse período, os filmes expostos foram revelados e fixados em soluções de processamento radiográfico convencional (Kodak, Rochester, NY, EUA). Ao final, são obtidos filmes autorradiográficos onde podem ser observados os sinais positivos de hibridização nas regiões de intersecção entre as amostras e sondas cruzadas, caso ocorra o pareamento das cadeias de DNA, confirmando a presença de determinada espécie-alvo investigada. A Figura 8 representa uma reação de hibridização de uma membrana, na qual as linhas horizontais representam as 35 sondas marcadas e as linhas verticais representam as 28 amostras e os 2 padrões de quantificação ( $10^5$  e  $10^6$  células microbianas).

**Figura 8.** Ilustração de uma reação de hibridização pelo método Checkerboard DNA-DNA Hybridization.



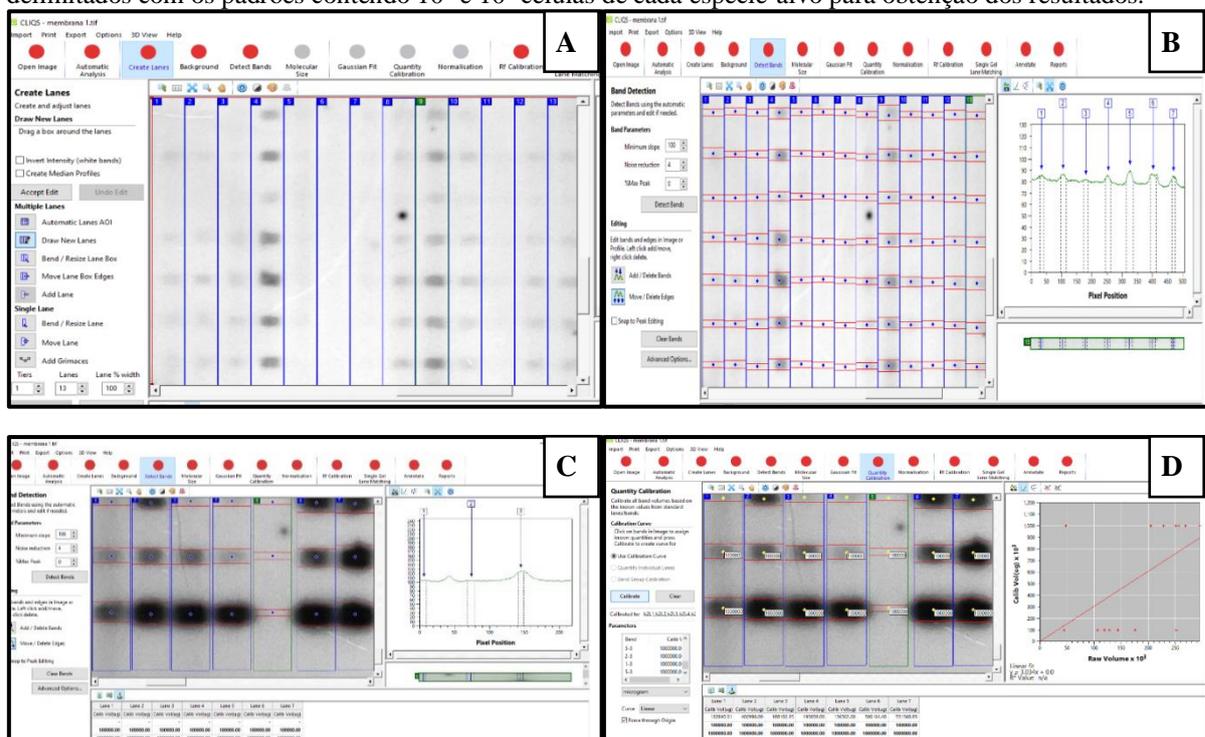
Fonte: Própria (2021).

### 3.5.5 Análise dos dados clínicos e microbiológicos

Após a obtenção dos filmes autorradiográficos com os sinais de hibridização, estes

foram fotografados e as imagens obtidas foram analisadas no software CLIQS – Core Laboratory Image Quantification Software (Totallab, Newcastle, Inglaterra), que possibilitou a determinação do número aproximado de células microbianas (contagem microbiana) presentes em cada amostra de biofilme avaliada, a partir da comparação da intensidade dos sinais de hibridização obtidos pela intersecção das amostras contra as sondas marcadas em relação à intensidade dos padrões contendo  $10^5$  e  $10^6$  células de cada uma das 35 espécies-alvo. (Figura 9).

**Figura 9.** A: Imagem da membrana vista no software CLIQS 1D®; B: Delimitação das canaletas em que foram aplicadas as sondas; C: Delimitação dos sinais de hibridização a serem quantificados; D: Comparação dos sinais delimitados com os padrões contendo  $10^5$  e  $10^6$  células de cada espécie-alvo para obtenção dos resultados.



Fonte: Própria (2021).

A diversidade de espécies da microbiota dos implantes foi avaliada inicialmente medindo-se a abundância relativa de cada uma das espécies microbianas-alvo, e comparada com a microbiota presente nos dentes previamente à extração para reabilitação protética. Os índices de diversidade alfa, Shannon-Weaver e Simpson, foram utilizados para avaliar a composição das comunidades microbianas presentes nos biofilmes ao longo do tempo de investigação. E por fim, o coeficiente de similaridade de Jaccard, referente à diversidade beta, também foi utilizado para avaliar a variação na composição de espécies nos sítios ao longo do tempo.

Todos os dados referentes aos despechos microbiológicos e clínicos registrados durante o período do estudo foram analisados com estatística descritiva e de inferência. Os resultados

dos desfechos microbiológicos foram apresentados como mediana, intervalo interquartil e valores máximo e mínimo. Os resultados dos desfechos clínicos foram apresentados como média e desvio-padrão da média. Considerando-se a presença de múltiplos fatores de variação e a dependência longitudinal dos dados, foi utilizado o modelo não-paramétrico de regressão linear mista *Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments* (BRUNNER; LANGER, 1999). Desta forma, avaliou-se o efeito de cada um dos fatores de variação (localização dos implantes, espécies-alvo e tempo) e suas interações sobre a formação da microbiota peri-implantar e indicadores clínicos, considerando-se cada participante voluntário do estudo como efeito aleatório para a análise. Este modelo estatístico utiliza os testes *Wald-Type Statistic* (WTS) e *ANOVA-Type Statistic* (ATS) para investigar a hipótese de ausência de interação entre os fatores de variação. O modelo estatístico *Generalized Estimating Equations* (GEE) foi utilizado para avaliar, por meio de múltiplas comparações, quais fatores de variação foram significativamente associados com cada tempo de avaliação. As diferenças de diversidade microbiana foram avaliadas por meio de ANOVA seguida do teste *Tukey's Honest Significant Difference* (HSD). Análises de correlações entre a microbiota e os indicadores clínicos foram avaliados pelo teste *Spearman's rank correlation coefficient*. As diferenças foram consideradas significantes para valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados utilizando o software estatístico R (R. software 4.0.0; R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

## 4. Resultados



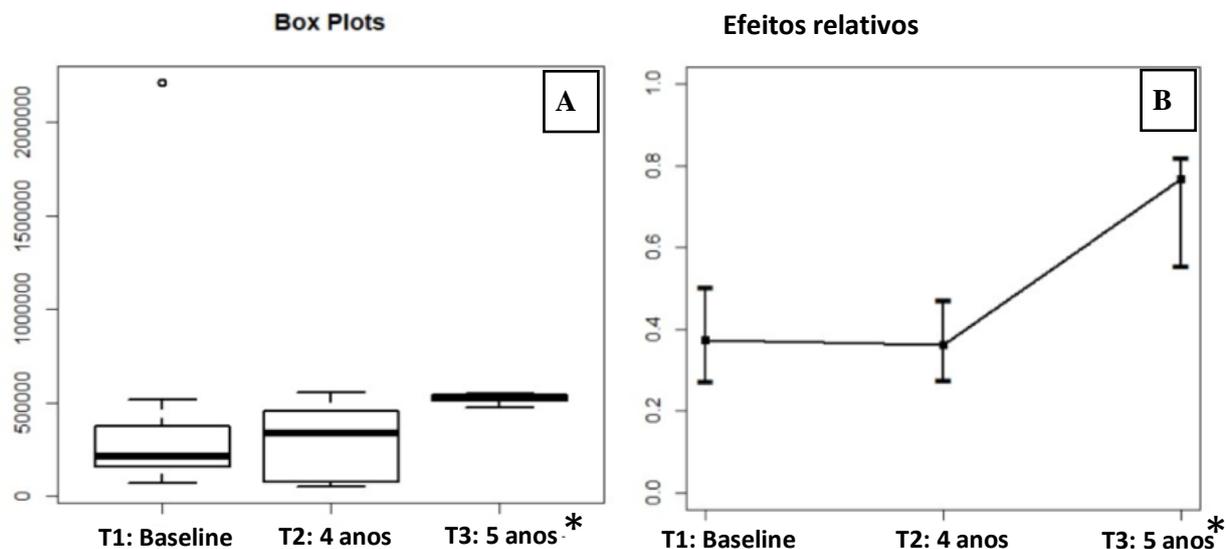
## 4. RESULTADOS

De um total de 16 voluntários participantes incluídos na etapa inicial da pesquisa, somente 12 completaram o período avaliativo de 5 anos de função mastigatória das próteses implantossuportadas; quatro participantes não puderam ser contactados para as coletas dos períodos T2 e T3. A média de idade dos participantes foi de 60,14 ( $\pm$  7,69) anos. Um total de 180 amostras clínicas de biofilme, incluindo biofilmes periodontais e peri-implantares, foram avaliadas durante os três períodos de investigação (5 dentes/implantes x 12 indivíduos x 3 períodos), resultando em um total de 6.300 reações de hibridização de DNA (x35 espécies microbianas). O conjunto de dados dos indicadores clínicos compreendeu um total de 360 registros (5 dentes/implantes x 6 sítios x 12 indivíduos).

### 4.1 Contagem Microbiana Total

Os dados referentes à contagem microbiana total de micro-organismos consistiu na análise de um *pool* das 35 espécies-alvo propostas para serem investigadas no estudo. A contagem de células microbianas em cada biofilme foi realizada sem discriminar entre as diferentes espécies presentes, resultando, desta forma, em um indicador da carga microbiana total presente em cada amostra. A Figura 10 ilustra o efeito relativo do fator “tempo de coleta” sobre a contagem microbiana total considerando-se um intervalo de confiança de 95% e sem discriminar entre os diferentes sítios de coleta (5 implantes). O gráfico do tipo *box plot* (A) representa a mediana, primeiro quartil, terceiro quartil e os valores mínimo e máximo registrados no *baseline* (T1), e após 4 (T2) e 5 (T3) anos de função dos implantes, respectivamente. Estes resultados indicam que as distâncias medidas aumentaram após o período de 4 anos, confirmando que o fator tempo teve um efeito significativo para o aumento da contagem total dos micro-organismos. O gráfico apresentado no lado direito (B), representa o intervalo de confiança de 95% das medianas, indicando o limite mínimo, o ponto-estimado e o limite máximo para cada um dos 3 períodos de investigação. A mediana aumenta significativamente após o período de 4 anos, indicando que quanto maior o período de avaliação maior a contagem de micro-organismos presente nas amostras. O efeito relativo do fator tempo foi avaliado por meio dos testes estatísticos *Wald-Type Statistics* (WTS) e *ANOVA-Type Statistics* (ATS); ambos demonstraram efeito significativo do fator tempo sobre a contagem total de micro-organismos, com valores de  $p$   $1,89 \times 10^{-6}$  e  $8,59 \times 10^{-7}$ , respectivamente. Os testes complementares de múltiplas comparações corrigidos por Bonferroni mostraram diferenças significantes entre as contagens registradas para os períodos de 4 e 5 anos (WTS/ATS:  $p=1,22 \times 10^{-5}$ ).

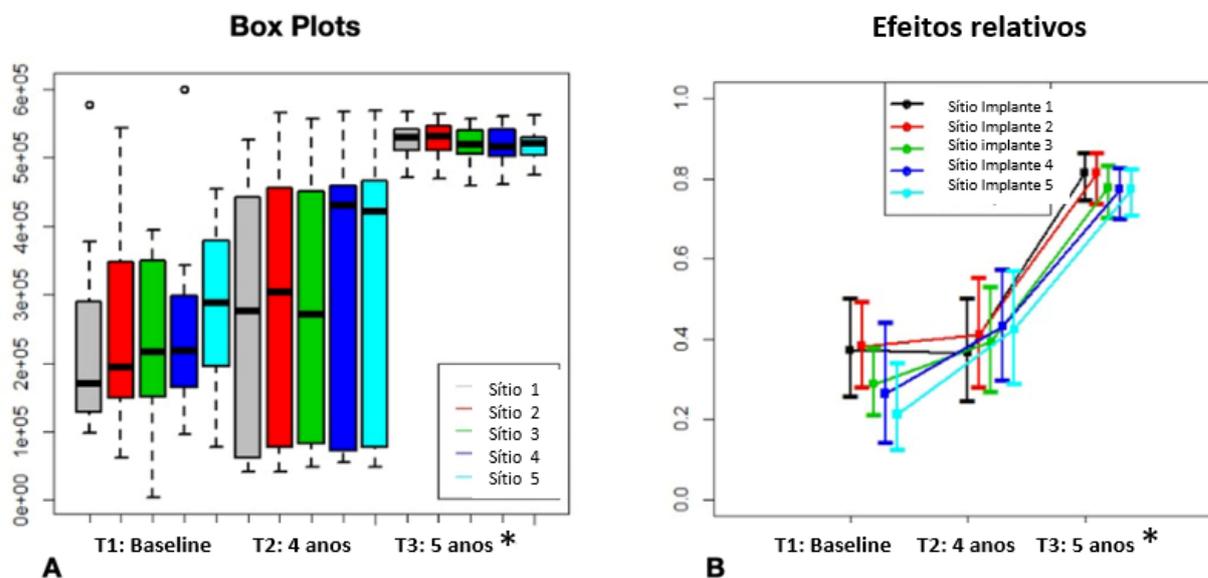
**Figura 10.** Efeito relativo do fator “tempo de coleta” sobre a contagem microbiana total. Em A, gráfico box plot representando a mediana, primeiro quartil, terceiro quartil e valores mínimo e máximo registrados no baseline (T1), T2 e T3. Em B, representação do intervalo de confiança de 95% das medianas.



Fonte: Própria (2021).

A Figura 11 ilustra a contagem microbiana total registrada nos 3 períodos de investigação considerando-se os 5 diferentes sítios (implantes) de coleta de amostras. Os gráficos do tipo *box plot* e de intervalo de confiança de 95% das medianas estão representados pelas letras A e B, respectivamente. Os testes estatísticos mostraram não haver efeito significativo do fator “sítio de coleta” (WTS:  $p= 0,9815$ ; ATS:  $0,9787$ ). Também não foi encontrada uma interação estatística entre os fatores “sítios” e “tempo” (WTS:  $p= 0,8209$ ; ATS:  $p= 0,8531$ ). Diferentemente, o fator tempo foi altamente significativo para o aumento da contagem microbiana, conforme comprovado pelos testes estatísticos WTS ( $p= 4,06 \times 10^{-24}$ ) e ATS ( $p= 4,06 \times 10^{-24}$ ). O intervalo de confiança de 95% das medianas (B) comprova que a contagem aumentou após o período de 4 anos, independentemente do sítio de coleta do biofilme.

**Figura 11.** Contagem microbiana total nos três períodos de investigação. A: gráfico Box Plots com os 5 diferentes sítios de coleta das amostras. B: gráfico com efeito relativo e intervalo de confiança de 95%.



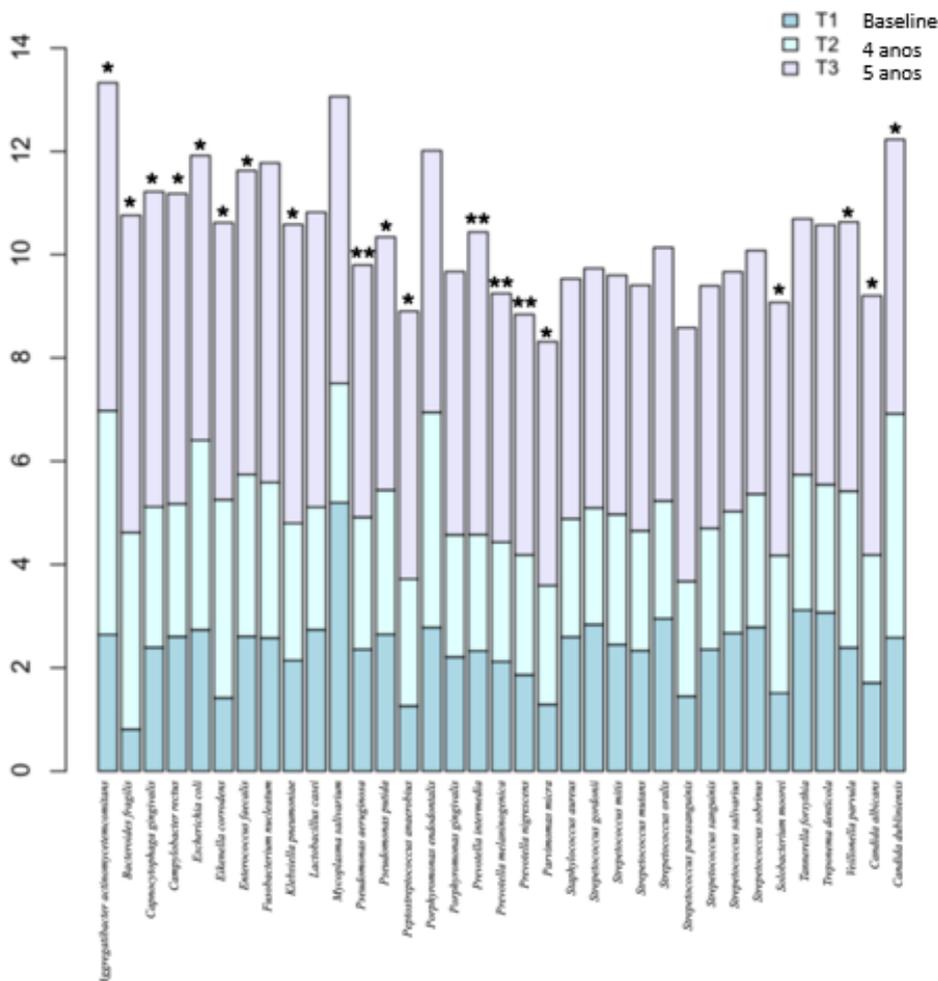
Fonte: Própria (2021).

## 4.2 Contagem Microbiana Individual

Os testes estatísticos aplicados considerando-se o aspecto multi-fatorial do estudo mostraram um efeito significativo do fator “espécies de micro-organismos”. Tanto o teste WTS quanto o teste ATS indicaram uma forte interação entre as espécies e o fator tempo, com valores de  $p$  de  $5,92 \times 10^{-323}$  e  $2,16 \times 10^{-69}$ , respectivamente. Os efeitos relativos do fator tempo e espécie foram, respectivamente,  $p = 2,00 \times 10^{-16}$  e  $p = 0,0001$ . O modelo estatístico *Generalized Estimating Equations* (GEE) foi aplicado para avaliar a significância dos efeitos dos fatores de variação investigados, considerando-se o aspecto longitudinal e dependência dos dados. Das 35 espécies-alvo investigadas no estudo, 19 espécies apresentaram contagens aumentadas no período de 5 anos (T3). Os valores das contagens microbianas individuais e a significância para cada uma das 35 espécies investigadas estão representados na Figura 12. Não foram encontradas diferenças significantes comparando-se as espécies entre os períodos *baseline* (T1) e 4 anos (T2);  $p > 0,05$ . As espécies patogênicas mais comumente encontradas nas doenças periodontais/peri-implantares foram observadas em níveis elevados no período de 5 anos (mediana,  $\times 10^5$  células): *P. gingivalis* (4,89;  $p = 2,11 \times 10^{-6}$ ), *T. forsythia* (4,90;  $p = 5,30 \times 10^{-11}$ ), e *T. denticola* (4,97;  $p = 0,0035$ ). Outras espécies relevantes e frequentemente encontradas nas condições de doenças peri-implantares foram também observadas em níveis elevados no período de 5 anos: *P. intermedia* (5,10;  $p = 0,0246$ ), *F. nucleatum* (6,20;  $p < 2,00 \times 10^{-16}$ ), e *A.*

*actinomycetemcomitans* (6,34;  $p= 2,84 \times 10^{-12}$ ). As medianas (valores mínimos e máximos;  $\times 10^5$  células) variaram de 2,74 (mínimo: 0; máximo: 15,77) a 3,93 (mínimo: 0; máximo: 6,67).

**Figura 12.** Os valores das contagens microbianas individuais e a significância para cada uma das 35 espécies investigadas



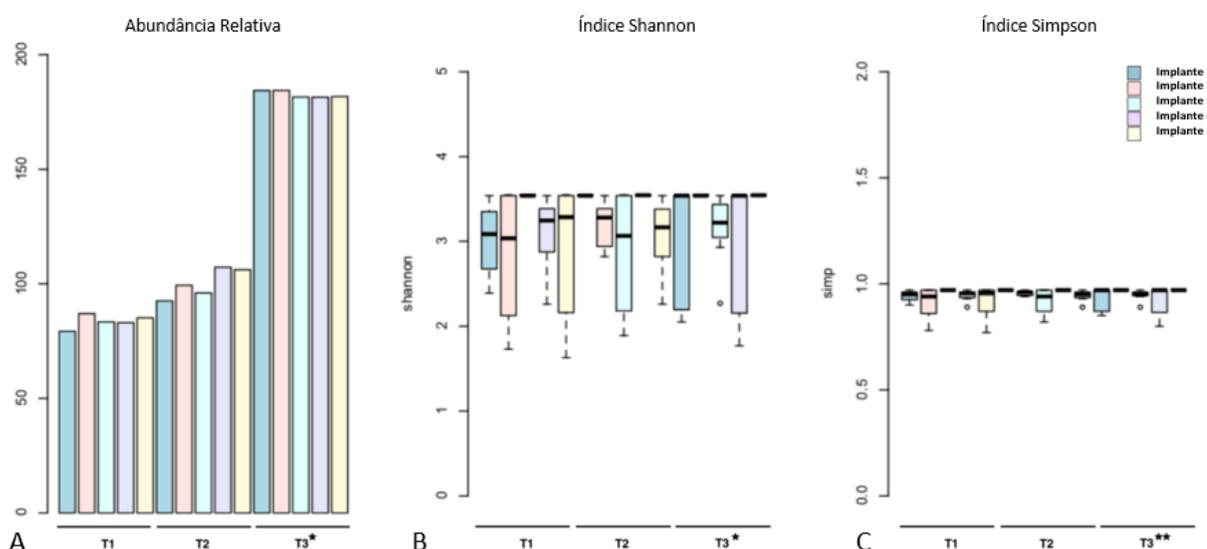
Fonte: Própria (2021).

### 4.3 Diversidade e Similaridade das Comunidades Microbianas

A diversidade dos biofilmes investigados foi representada pela abundância relativa das espécies presentes em cada amostra e pelos índices de diversidade alfa Shannon e Simpson. Todos os dados de diversidade estão representados na Figura 13. As maiores abundâncias relativas foram encontradas nas amostras coletadas no período de 5 anos, independentemente do sítio de investigação ( $p= 1,32 \times 10^{-11}$ ). Todas as espécies-alvo apresentaram valores moderados a alto de abundância relativa. Os maiores valores (média de abundância relativa > 70%) registrados no período T3 foram para as espécies *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* e *P. melaninogenica*. De uma forma geral, o valor médio de abundância relativa das espécies no período de 5 anos foi de 61,4%. A abundância relativa das espécies no período T2 (4 anos) foi maior do que no período *baseline* (T1), porém, sem diferença significante ( $p>0.05$ ).

Corroborando com os resultados de abundância relativa, o teste ANOVA seguido de Tukey HSD confirmou que a diversidade alfa, avaliada pelos índices de Shannon e Simpson, foi maior no período e 5 anos de investigação ( $p= 3,60 \times 10^{-11}$  e  $p= 0,0152$  para Shannon e Simpson, respectivamente). Os valores do índice Shannon variaram de 3,47 a 3,55, indicando alta diversidade para todas as amostras, independentemente dos tempos e amostragem. Da mesma forma, os valores de índice Simpson também foram altos, variando de 0,96 a 0,97, com um valor médio de 0,96. Estes resultados de grande diversidade sugerem que não existem espécies dominantes na microbiota dos participantes do estudo em nenhum dos tempos investigados.

**Figura 13.** Representação da abundância relativa das espécies (A), índice de diversidade Shannon (B) e índice de diversidade de Simpson (C)

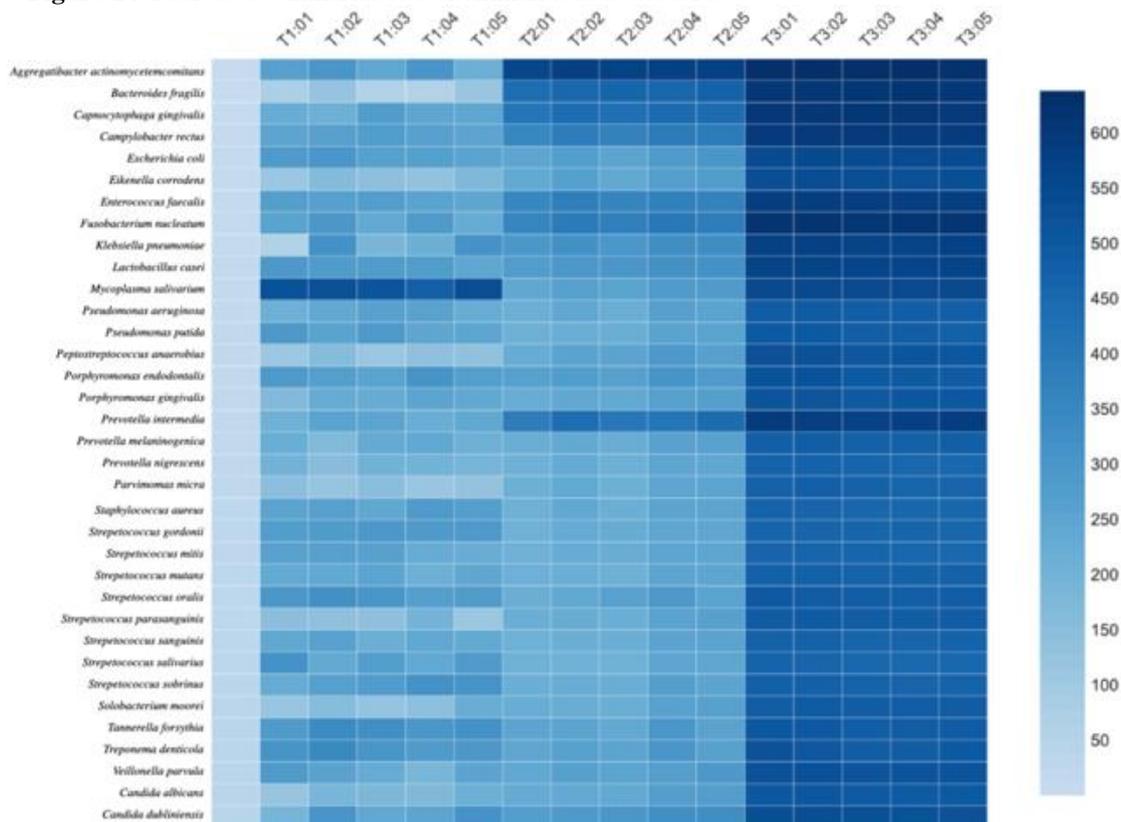


Fonte: Própria (2021).

O número de espécies compartilhadas entre as amostras e suas abundâncias relativas foram avaliadas usando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (diversidade beta). Baseando-se nas métricas de Jaccard, diferentes padrões de similaridade e dissimilaridade foram observados analisando-se as amostras nos diferentes tempos (Figura 14). Foram encontradas diferenças significantes na composição e estrutura das comunidades microbianas ao longo do tempo. A microbiota peri-implantar após 5 anos de função mastigatória não apresentou similaridades com as microbiotas encontradas nas amostras do *baseline* e 4 anos. De forma geral, os dados comparativos de similaridade foram os seguintes: T1-T2 (63%); T1-T3 (43%); e T2-T3 (53%). A similaridade das comunidades microbianas reduziu ao longo do tempo; após 5 anos de função (T3), a microbiota dos implantes compartilhou menos do que a metade das espécies presentes nos dentes no *baseline*. Os colonizadores iniciais do biofilme, pertencentes ao gênero *Streptococcus* spp. e os colonizadores tardios, principalmente

representados por gêneros Gram-negativos (incluindo patógenos periodontais como *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, e *A. actinomycetemcomitans*) foram encontrados em maiores abundâncias após o período de 5 anos. Não foram encontradas diferenças significantes na microbiota comparando-se os diferentes sítios dos implantes (variaram de 90% a 99%).

**Figura 14.** Padrões de similaridade e dissimilaridade de Jaccard.



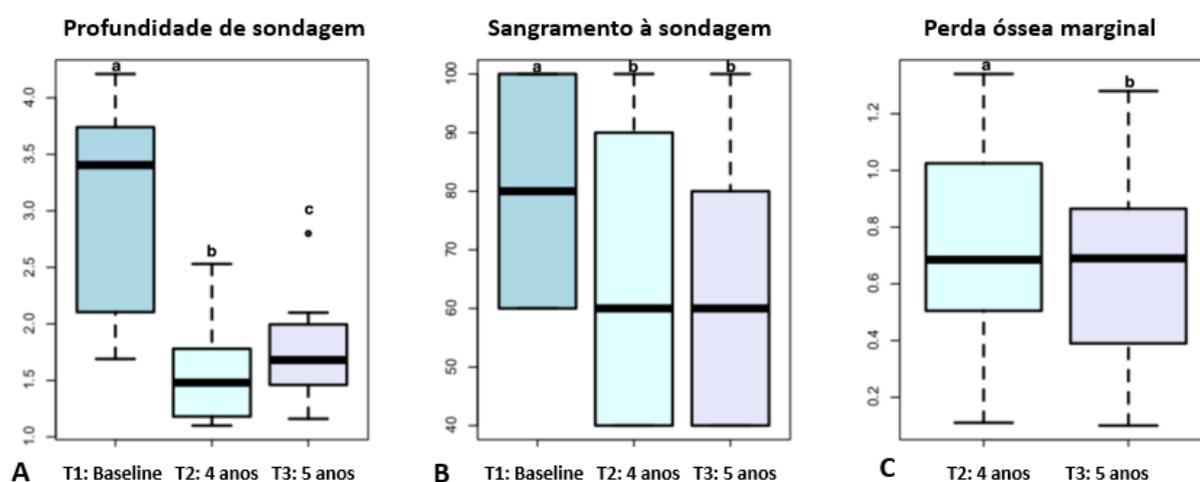
Fonte: Própria (2021).

#### 4.4 Indicadores Clínicos e Correlação com os Achados Microbiológicos

Não foram observadas ou reportadas complicações clínicas ao longo do tempo de investigação do estudo. Não foram detectados sinais de infecção bacteriana localizada, mucosite ou peri-implantite. De uma forma geral, os cuidados de higiene pessoal dos participantes foram considerados satisfatórios. Os valores das medianas, intervalo interquartil, valores mínimo e máximos para os indicadores de profundidade à sondagem (mm), sangramento à sondagem (%) e reabsorção óssea marginal (mm) dos dentes e implantes estão representados na Figura 15. Os valores de profundidade à sondagem registrados para os dentes e implantes ao longo do estudo foram compatíveis com a condição de saúde dos tecidos suporte. Os valores médios, nos tempos T1 e T2, variaram de  $3,04 \pm 0,92$  mm para os dentes e  $1,74 \pm 0,45$  mm para os implantes. Os valores médios de porcentagem de sangramento à sondagem foram 81,66% para os dentes e 63,33% para os implantes após 5 anos. A perda óssea total (mm,  $\pm$  desvio-padrão) ao redor dos

implantes após 5 anos foi de  $1,39 \pm 0,73$ . O valores de significância estatística para as comparações entre os períodos foram registrados como segue: Profundidade de Sondagem: T1-T2:  $p= 1,30 \times 10^{-6}$ ; T1:T3:  $p= 0,0006$ ; T2-T3:  $p= 1,27 \times 10^{-8}$ ; Sangramento à Sondagem: T1-T2:  $p= 0,0005$ ; T1-T3:  $p= 0,0111$ ; T2-T3:  $p= 0,89$ ; Reabsorção Óssea Marginal T2-T3:  $p= 0,038$ ).

**Figura 15.** Valores das medianas, intervalo interquartil, valores mínimo e máximos para os indicadores de profundidade à sondagem (mm) (A), sangramento à sondagem (%) (B) e reabsorção óssea marginal (mm) dos dentes e implantes (C).



Fonte: Própria (2021).

O teste de correlação de Spearman (*Spearman's rank correlation test*) foi aplicado para analisar a associação entre a contagem microbiana e os indicadores clínicos após 5 anos. Nenhum dos indicadores clínicos apresentaram correlação significativa com a microbiota encontrada: Profundidade de Sondagem ( $R= 0,26$ ;  $p= 0,23$ ), Sangramento à Sondagem ( $R= -0,31$ ;  $p= 0,14$ ), e Reabsorção Óssea Marginal ( $R= 0,28$ ;  $p= 0,21$ ).



## 5. Discussão



## 5. DISCUSSÃO

A instalação imediata de implantes com carregamento imediato tem sido utilizada de forma bastante previsível em indivíduos com histórico de doenças periodontais, e a maioria dos estudos na literatura relatam altas taxas de sobrevivência, confirmando que os implantes são osseointegrados com sucesso e mantidos na cavidade oral (MALÓ *et al.*, 2014; CHRCANOVIC; MARTINS; WENNERBERG, 2015). Entretanto, ainda são bastante escassos na literatura estudos com um maior período de acompanhamento avaliando as mudanças microbianas que podem ocorrer ao longo do tempo nestes indivíduos, e qual o potencial impacto da composição das comunidades bacterianas nos indicadores clínicos e sucesso em longo prazo do tratamento reabilitador com próteses implantossuportadas. A disbiose da microbiota oral, comumente caracterizada pela perda da diversidade dos micro-organismos e crescimento excessivo de espécies potencialmente patogênicas, tem sido considerado o principal fator etiológico da peri-implantite (KRÖGER *et al.*, 2018).

Embora o mecanismo pelo qual a disbiose ocorre nos casos de peri-implantite ainda não seja totalmente esclarecido, a compreensão das interações dinâmicas entre a microbiota instalada e os tecidos de suporte periodontal/peri-implantar do hospedeiro ao longo do tempo são cruciais para se reduzir os riscos relacionados aos potenciais desequilíbrios microbianos e para alcançar modelos previsíveis de diagnóstico e tratamento. Portanto, o objetivo deste estudo clínico longitudinal foi investigar prospectivamente a microbiota oral formada ao redor de implantes dentários pilares de reabilitações totais mandibulares fixas em indivíduos com história prévia de periodontite crônica, e avaliar como esta microbiota se correlaciona com os indicadores clínicos após 5 anos de carga funcional.

A hipótese testada neste estudo foi rejeitada, uma vez que os resultados demonstraram que a microbiota observada nos dentes remanescentes no início do estudo, previamente às suas extrações, foi significativamente diferente da microbiota presente nos implantes após 5 anos de função mastigatória; ou seja, houve uma grande alteração no perfil microbiano ao longo do tempo do estudo. As contagens microbianas (totais e individuais) e as comunidades de espécies presentes ao redor dos implantes dentários permaneceram semelhantes às encontradas no início do estudo (dentes remanescentes) até o período de análise de 4 anos. Após o período de avaliação de 5 anos, tanto as contagens quanto as diversidades microbianas aumentaram significativamente. As espécies bacterianas consideradas como principais patógenos para a doença periodontal/peri-implantar, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. gingivitis* e *A. actinomycetemcomitans*, foram encontradas em altos níveis e abundância, sugerindo que a

história anterior de periodontite tem um impacto relevante na determinação da formação da microbiota peri-implantar tardia, e que as contagens de micro-organismos podem aumentar quanto mais tempo os implantes estiveram em função, conforme reportado previamente (LEE *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2017). Vários estudos têm demonstrado que a peri-implantite tem sua frequência maior de aparecimento a partir do quinto ano de carga funcional, com pico de incidência após o 7º ano em pacientes com comprometimento periodontal (DERKS, 2012; SANZ; CHAPPLE, 2012; DERKS; TOMASI, 2015; TOMASI; PANDOLFI *et al.*, 2020). Ainda, pacientes que apresentam mais de 4 implantes em um tratamento reabilitador têm maior probabilidade de desenvolver a peri-implantite (DERKS *et al.*, 2016; PANDOLFI *et al.*, 2020). Portanto, os resultados microbiológicos do presente estudo estão em consonância com os dados reportados na literatura, confirmando que essas alterações no perfil microbiológico observadas ao longo do tempo podem estar envolvidas na progressão das doenças peri-implantares e podem representar um risco potencial para o sucesso em longo prazo dos implantes dentários (RENVERT; QUIRYNEN, 2015). Outro dado relevante do estudo e que pode justificar o não aparecimento de reações inflamatórias clínicas nos participantes deste estudo, ao contrario do que é frequentemente reportado pela literatura, foi que a diversidade microbiana também aumentou significativamente ao longo do tempo, o que pôde ter inibido o crescimento excessivo dos micro-organismos patogênicos, ao mesmo tempo em que favoreceu a manutenção do equilíbrio da microbiota peri-implantar. Nesse estudo, a microbiota instalada não foi capaz de refletir em mudanças clínicas ao longo do tempo; todos os participantes não apresentaram sinais de infecção/inflamação e os dados dos indicadores clínicos durante todo o período experimental foram compatíveis com uma situação de saúde dos tecidos de suporte. Não foram encontradas correlações significantes entre os achados microbiológicos e os indicadores clínicos de progressão da mucosite ou peri-implantite. Dentro das condições estabelecidas neste estudo, os resultados observados sugerem que a presença de espécies microbianas potencialmente patogênicas para a doença periodontal/peri-implantar, em níveis moderados a altos, não está necessariamente associada ao desenvolvimento de doenças peri-implantares e falha dos implantes, conforme observado em outros estudos similares da literatura (SBORDONE *et al.*, 1999; GRAETZ *et al.*, 2018).

Os dados preliminares deste estudo de indivíduos com história prévia de periodontite crônica, relativos à avaliação por um período curto de 8 meses, demonstraram que a microbiota peri-implantar nos estágios iniciais de carga funcional era composta, principalmente, por bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero *Streptococcus* e espécies Gram-negativas

pertencentes aos gêneros *Veillonella*, *Porphyromonas* e *Prevotella*. Algumas espécies consideradas periodontopatogênicas, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, também foram observadas, porém em níveis reduzidos a moderados (GOMES *et al.*, 2017). Nesse curto período de investigação, concluímos que a microbiota dos implantes dentários era bastante semelhante àquela encontrada nos dentes remanescentes extraídos para a colocação dos implantes, apresentando padrões microbianos de uma microbiota saudável. A literatura tem demonstrado que espécies comensais e patogênicas podem estar presentes em níveis moderados ou altos, mesmo em biofilmes iniciais e condições de saúde (DO NASCIMENTO *et al.*, 2015; DE OLIVEIRA SILVA *et al.*, 2020), confirmando que a microbiota presente nos dentes remanescentes influencia significativamente a formação de uma nova microbiota, mesmo que os dentes sejam previamente removidos para a instalação dos implantes. Os resultados desta avaliação de 5 anos sugerem que tanto a microbiota dos dentes remanescentes quanto o tempo de carregamento dos implantes podem ter um impacto relevante na formação da microbiota peri-implantar de indivíduos com histórico de doenças periodontais. Em outras palavras, o fator tempo pode determinar até que ponto a microbiota dos dentes remanescentes pode consolidar o biofilme formado ao longo do tempo. Portanto, parece extremamente relevante prevenir o desequilíbrio da microbiota oral, nestes indivíduos com histórico de doença periodontal prévia, por meio da modulação do crescimento excessivo das espécies patogênicas com medidas de controle do biofilme. A presença de sulcos gengivais profundos favorece a proliferação de espécies anaeróbias e a literatura destaca a importância de protocolos de higiene de suporte na manutenção de implantes para estes indivíduos com histórico de doenças periodontais (SMITH *et al.*, 2017). De acordo com estudos prévios, o aumento da profundidade do sulco peri-implantar está fortemente correlacionado com mudanças do perfil microbiano, podendo resultar no aumento dos níveis de disbiose (KRÖGER *et al.*, 2018). Em nosso estudo, realizamos um protocolo de higiene de suporte durante todo o tempo experimental e os participantes foram inseridos no programa da instituição onde são chamados a cada 6 meses para profilaxia da prótese e instruções para continuar a manutenção da terapia de higiene. Provavelmente, o programa de higienização aplicado foi o responsável por manter a alta diversidade microbiana e equilíbrio da microbiota ao longo do tempo, o que pode ter impactado positivamente na saúde dos tecidos peri-implantares. Independentemente dos níveis elevados de espécies patogênicas após 5 anos de carregamento, a alta abundância de várias espécies comensais (microflora normal) inibiu a proliferação das espécies patogênicas, impedindo o desequilíbrio da microbiota e desenvolvimento de doenças dos tecidos de suporte. Micro-organismos comensais e patogênicos são comumente encontrados abrindo a cavidade

oral em uma capacidade simbiótica; os comensais atuam como barreiras bloqueando a adesão de espécies patogênicas às superfícies mucosas (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009). Após o período experimental de 5 anos, o valor médio da profundidade de sondagem dos implantes nesta investigação mostrou-se inferior a 1,8 mm, compatível com a situação de saúde peri-implantar.

Outro fator relevante e que pode ter contribuído para o não desenvolvimento de doenças inflamatórias nos tecidos ao longo do tempo foi o tipo de conexão dos implantes utilizados. Em nosso estudo, todos os participantes foram reabilitados com implantes e conexões internas do tipo Cone Morse, que apresentam uma melhor adaptação da interface implante-conector protético e diminuem a infiltração de fluidos e nichos de proliferação bacteriana (DO NASCIMENTO *et al.*, 2012; AL-JADAA *et al.*, 2015; GHERLONE *et al.*, 2016). Implantes de conexão interna apresentam diminuição do infiltrado bacteriano quando comparados aos implantes de conexão externa (DIBART *et al.*, 2005; VERDUGO *et al.*, 2014). Isto pode ter influenciado positivamente os resultados clínicos encontrados ao longo do estudo.

Apesar dos avanços desta pesquisa e das informações relevantes obtidas, esta investigação também apresentou algumas limitações. Uma lacuna deste estudo foi não avaliar as amostras de biofilme dos dentes remanescentes antes da terapia periodontal de suporte, realizada previamente ao tratamento cirúrgico e reabilitador. Também, não investigamos as amostras de biofilme formado sobre as próteses maxilares dos participantes. A amostragem desses sítios poderia contribuir com informações importantes sobre a microbiota patogênica envolvida na perda dos elementos dentários pela periodontite, e também estabelecer um parâmetro de comparação adicional com os achados microbiológicos ao longo do tempo. De acordo com a literatura, a microbiota dos dentes remanescentes atua como fonte de espécies patogênicas e influenciam diretamente na microbiota dos implantes (ONG *et al.*, 2008). Os resultados do nosso estudo, provavelmente também refletem uma translocação de microorganismos presentes no biofilme formado sob as estruturas das próteses superiores e mucosa de suporte. A mucosa oral é considerada um reservatório de bactérias em pacientes totalmente desdentados que podem ser transferidos aos implantes posteriormente (MOMBELLI *et al.*, 1988; DANSER *et al.*, 1994; DEVIDES; FRANCO, 2006; KOCAR; SEME; HREN, 2010). Além disso, não investigamos o efeito da variação interpessoal nas contagens microbianas e na diversidade da microbiota; dados sobre essas questões podem ser relevantes, uma vez que a literatura descreve que a variação interpessoal influencia a composição geral da microbiota (YU *et al.*, 2019). Outra limitação está relacionada ao método molecular usado para identificar e

quantificar as espécies-alvo. A técnica de hibridização *Checkerboard DNA-DNA hybridization* permitiu a avaliação de um grande número de espécies microbianas, desde as formadoras iniciais do biofilme até as espécies relacionadas às doenças periodontais/periimplantares; mas a metodologia possui um limite de detecção de células, que deve ser maior do que  $10^4$  microorganismos, e também podem ocorrer reações cruzadas entre espécies com material genético muito semelhante. Neste estudo, a sensibilidade foi ajustada para detectar quantidades de DNA correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, mantendo especificidade suficiente para discriminar entre os diferentes gêneros. Os sinais de hibridização equivalentes a  $10^4$  células não foram detectados ou reproduzidos.

Considerando os resultados desta investigação longitudinal de 5 anos, podemos supor que a reversão da microbiota peri-implantar para um perfil compatível com a condição de doença dos tecidos peri-implantares pode ocorrer de forma lenta e pode não se refletir nos indicadores clínicos, provavelmente devido ao impacto relevante de um protocolo efetivo de manutenção da higiene oral. Os resultados também confirmam a relevância das terapias de higiene para a manutenção do controle do biofilme oral em longo prazo, principalmente nas reabilitações de arco total, uma vez que um estudo recente mostrou que 1/3 dos indivíduos com histórico de periodontite e reabilitados com este tipo de prótese, assim como 1/5 de todos os implantes instalados, foram diagnosticados com peri-implantite (KORDBACHEH FINKELSTEIN; PAPAPANOU, 2019). Estudos adicionais, envolvendo um maior número de participantes e incluindo períodos de tempo mais longos de avaliação, podem ajudar a entender esses achados, investigando se as mudanças presentes no perfil microbiano ao longo do tempo podem se refletir nos indicadores clínicos de sucesso e sobrevivência dos implantes.



## 6. Conclusões



## **6. CONCLUSÕES**

A microbiota peri-implantar apresentou um perfil microbiano semelhante à microbiota presente nos dentes previamente às extrações até o período de 4 anos de carga funcional. Após 5 anos em função, alterações microbianas significantes ocorreram, resultando em um aumento das contagens microbianas (totais e individuais), e um aumento dos níveis de abundância e diversidade das espécies. No entanto, as alterações microbianas quantitativas e qualitativas não resultaram em disbiose da microbiota e não influenciaram os resultados clínicos.



## *Referências*

---



REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ALBREKTSSON, T.; ISIDOR, F. Consensus report of session IV. *In*: LANG, N. P.; KARRING, T. (ed.). **Proceedings of the First European Workshop on Periodontology**. London: Quintessence, p. 365-369, 1994.

ALBREKTSSON, T.; ZARB, G.; WORTHINGTON, P.; ERIKSSON, A. R. The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 1, n. 1, p. 11-25, 1986.

AL-JADAA, A.; ATTIN, T.; PELTOMÄKI, T.; SCHMIDLIN, P. R. Comparison of three in vitro implant leakage testing methods. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 26, n. 4, p. e1-e7, 2015. DOI 10.1111/clr.12314

ALSAADI, G.; QUIRYNEN, M.; KOMÁREK, A.; VAN STEENBERGHE, D. Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 34, n. 7, p. 610-617, 2007. DOI 10.1111/j.1600-051X.2007.01077.x.

AUGTHUN, M.; CONRADS, G. Microbial findings of deep peri-implant bone defects. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 12, n. 1, p. 106-112, 1997.

AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009. DOI 10.1089/dna.2009.0874.

BELIBASAKIS, G. N. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 66-72, 2014. DOI 10.1016/j.archoralbio.2013.09.013.

BELIBASAKIS, G. N.; CHARALAMPAKIS, G.; BOSTANCI, N.; STADLINGER, B. Peri-implant infections of oral biofilm etiology. **Advances in Experimental Medicine And Biology**, New York, v. 830, p. 69-84, 2015. DOI 10.1007/978-3-319-11038-7\_4.

BELIBASAKIS, G. N.; MANOIL, D. Microbial community-driven etiopathogenesis of peri-implantitis. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 100, n. 1, p. 21-28, 2021. DOI 10.1177/0022034520949851.

BERGLUNDH, T.; PERSSON, L.; KLINGE, B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 29, p. 197-212, discussion 232–233, 2002. Supl 3. DOI 10.1034/j.1600-051x.29.s3.12.x

BOUTRON, I.; MOHER, D.; ALTMAN, D. G.; SCHULZ, K. F.; RAVAUD, P; CONSORT Group. Methods and processes of the CONSORT Group: example of an extension for trials assessing nonpharmacologic treatments. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 148, n. 4, p. W60-W66, 2008.

---

<sup>1</sup> De acordo com a ABNT NBR 6023 (2018)

BRÅNEMARK, P. I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B. O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, Stockholm, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969. DOI 10.3109/02844316909036699.

BRUNNER, E.; LANGER, F. **Non-parametric analysis of longitudinal data**. 1st ed. Munich: Oldenburgverlag, 1999.

CASADO, P. L.; OTAZU, I. B.; BALDUINO, A.; DE MELLO, W.; BARBOSA, E. P.; DUARTE, M. E. Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 20, n. 3, p. 226-235, 2011. DOI 10.1097/ID.0b013e3182199348.

CHRCANOVIC, B. R.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Reasons for failures of oral implants. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 443-476, 2014. DOI 10.1111/joor.12157.

CHRCANOVIC, B. R.; KISCH, J.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Factors influencing early dental implant failures. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 95, n. 9, p. 995-1002, 2016. DOI 10.1177/0022034516646098.

CHRCANOVIC, B. R.; MARTINS, M. D.; WENNERBERG, A. Immediate placement of implants into infected sites: a systematic review. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 17, p. e1-e16, 2015. Supl 1. DOI 10.1111/cid.12098.

COMPARIN, L. L.; CORÓ, E. R.; 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**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 93-100, 2014.

CORTÉS-ACHA, B.; FIGUEIREDO, R.; SEMINAGO, R.; ROIG, F. J.; LLORENS, C.; VALMASEDA-CASTELLÓN, E. Microbiota analysis of biofilms on experimental abutments mimicking dental implants: an in vivo model. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 88, n. 10, p. 1090-1104, 2017. DOI 10.1902/jop.2017.170051.

DANSER, M.M.; VAN WINKELHOFF, A. J., DE GRAAF, J.; LOSS, B. G.; VAN DER VELDEN, U. Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 21, n. 7, p. 484-489, 1994. DOI 10.1111/j.1600-051x.1994.tb00412.x.

DE OLIVEIRA SILVA, T. S.; DE FREITAS, A. R.; DE ALBUQUERQUE, R. F.; PEDRAZZI, V.; RIBEIRO, R. F.; DO NASCIMENTO, C. A 3-year longitudinal prospective study assessing microbial profile and clinical outcomes of single-unit cement-retained implant restorations: Zirconia versus titanium abutments. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 22, n. 3, p. 301-310, 2020. DOI 10.1111/cid.12888.

DERKS, J.; TOMASI, C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 42, p. S158-S171, 2015. Supl 16. DOI 10.1111/jcpe.12334.

DERKS, J.; SCHALLER, D.; HÅKANSSON, J.; WENNSTRÖM, J. L.; TOMASI, C.;

BERGLUNDH, T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: prevalence of peri-implantitis. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 95, n. 1, p. 43-49, 2016. DOI 10.1177/0022034515608832.

DEVIDES, S. L.; FRANCO, A.T. 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. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 21, n. 2, p. 262-269, 2006.

DIBART, S.; WARBINGTON, M.; SU, M. F.; SKOBE, Z. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: The locking taper system. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 20, n. 5, p. 732-737, 2005.

DO NASCIMENTO, C.; DE ALBUQUERQUE, R. F. Jr.; MONESI, N.; CANCIDO-SILVA, J.A. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3039-3040, 2010. DOI 10.1128/JCM.00390-10.

DO NASCIMENTO, C.; MONESI, N.; ITO, I. Y.; ISSA, J. P. M.; DE ALBUQUERQUE, R. F. Jr. Bacterial diversity of periodontal and implant-related sites detected by the DNA Checkerboard method. **European Journal of Clinical Microbiology And Infectious Diseases**: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, Wiesbaden, v. 30, n. 12, p. 1607-1613, 2011. DOI 10.1007/s10096-011-1267-1.

DO NASCIMENTO, C.; MIANI, P. K.; PEDRAZZI, V.; MULLER, K.; DE ALBUQUERQUE, R. F. Jr. Bacterial leakage along the implant-abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 23, n. 10, p. 1168-1172, 2012. DOI 10.1111/j.1600-0501.2011.02280.x.

DO NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE, R. F. Jr.; RIBEIRO, R. F. In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 58, n. 7, p. 853-861, 2013. DOI 10.1016/j.archoralbio.2013.01.014

DO NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; FERNANDES, F. H.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE, R. F. Jr.; RIBEIRO, R. F. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 25, n. 3, p. 337-343, 2014. DOI 10.1111/clr.12093.

DO NASCIMENTO, C.; IKEDA, L. N.; PITA, M. S.; PEDROSO-E-SILVA, R. C.; PEDRAZZI, V., DE ALBUQUERQUE, R. F. Jr.; RIBEIRO, R. F. Marginal fit and microbial leakage along the implant-abutment interface of fixed partial prostheses: An in vitro analysis using Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 114, p. 831-838, 2015. DOI 10.1016/j.prosdent.2015.05.009.

DO NASCIMENTO, C.; PITA, M.S., SANTOS; E. S., MONESI, N.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE, R. F. Jr.; RIBEIRO, R. F. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. **Dental Materials**: official publication of the Academy of Dental Materials, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 93-101, 2016. DOI 10.1016/j.dental.2015.10.014.

DO, T. A.; LE, H. S.; SHEN, Y. W.; HUANG, H. L.; FUH, L. J. Risk Factors related to Late Failure of Dental Implant - A Systematic Review of Recent Studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 17, n. 11, p. 3931, 2020. DOI 10.3390/ijerph17113931.

ESPOSITO, M.; HIRSCH, J. M.; LEKHOLM, U. L. F.; THOMSEN, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants, (I). Success criteria and epidemiology. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagenv. 106, n. 1, p. 527-551, 1998. DOI 10.1046/j.0909-8836..t01-2-.x.

ESPOSITO, M.; GRUSOVIN, M. G.; TALATI, M.; COULTHARD, P.; OLIVER, R.; WORTHINGTON, H. V. Interventions for replacing missing teeth: antibiotics at dental implant placement to prevent complications. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 16, n. 3, p. CD004152, 2008. DOI 10.1002/14651858.CD004152.pub2.

FERREIRA, S. D. ; MARTINS, C. C. ; AMARAL, S. A. ; VIEIRA, T. R. ; ALBUQUERQUE, B. N. ; COTA, L. O. M. ; ESTEVES LIMA, R. P. ; COSTA, F. O. Periodontitis as a risk factor for peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 79, p. 1-10, 2018. DOI 10.1016/j.jdent.2018.09.010.

FERRIGNO, N.; LAURETI, M.; FANALI, S.; GRIPPAUDO, G. A long-term followup study of non-submerged ITI implants in the treatment of totally edentulous jaws: part 1: ten-year life table analysis of a prospective multicenter. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 13, n. 3, p. 260-273, 2002. DOI 10.1034/j.1600-0501.2002.130305.x.

GHERLONE, E. F.; CAPPARÉ, P.; PASCUTA, R.; GRUSOVIN, M. G.; MANCINI, N.; BURIONI, R. Evaluation of resistance against bacterial microleakage of a new conical implant-abutment connection versus conventional connections: an in vitro study. **The New Microbiologica**, Pavia, v. 39, n. 1, p. 49-56, 2016.

GOMES, J.A.; SARTORI, I. A. M.; ABLE, F. B.; DE OLIVEIRA SILVA, T. S.; DO NASCIMENTO, C. Microbiological and clinical outcomes of fixed complete-arch mandibular prostheses supported by immediate implants in individuals with history of chronic periodontitis. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 28, n. 6, p. 734-741, 2017. DOI 10.1111/clr.12871.

GOUVOUSSIS, J.; SINDHUSAKE, D.; YEUNG, S. Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 12, n. 5, p. 666-673, 1997.

GRAETZ, C.; EL-SAYED, K. F.; GEIKEN, A.; PLAUMANN, A.; SÄLZER, S.; BEHRENS, E.; WILTFANG, J.; DÖRFER, C. E. Effect of periodontitis history on implant success: a long-term evaluation during supportive periodontal therapy in a university setting. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 22, n. 1, p. 235-244, 2018. DOI 10.1007/s00784-017-2104-4

GROSS, M.; ABRAMOVICH, I.; WEISS, E. I. Microleakage at the abutment-implant interface of osseointegrated implants: A comparative study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 14, n. 1, p. 94-100, 1999.

HALLSTRÖM, H.; PERSSON, G. R.; LINDGREN, S.; OLOFSSON, M.; RENVERT, S.

Systemic antibiotics and debridement of peri-implant mucositis. A randomized clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 39, n. 6, p. 574-581, 2012. DOI 10.1111/j.1600-051X.2012.01884.x.

HÄMMERLE, C. H. F.; CORDARO, L.; ALCCAYHUAMAN, K. A. A.; BOTTICELLI, D.; ESPOSITO, M.; COLOMINA, L. E.; GIL, A.; GULJE, F. L.; IOANNIDIS, A.; MEIJER, H.; PAPAGEORGIOU, S.; RAGHOEBAR, G.; ROMEO, E.; RENOUEAU, F.; STORELLI, S.; TORSELLO, F.; WACHTEL, H. Biomechanical aspects: Summary and consensus statements of group 4. The 5<sup>th</sup> EAO Consensus Conference 2018. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 29, p. 326-331, 2018. Supl 18. DOI 10.1111/clr.13284.

HEITZ-MAYFIELD, L. J.; TELES, R.; LANG, N. P. Peri-implant infections. *In*: LANG, N. P.; LINDHE J. (ed). **Clinical periodontology and implant dentistry**. 6th ed. New York: Wiley. p. 222-237, 2015.

JERVØE-STORM, P. M.; JEPSEN, S.; JÖHREN, P.; MERICSKE-STERN, R.; ENKLING, N. Internal bacterial colonization of implants: association with peri-implant bone loss. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 26, n. 8, p. 957-963, 2015. DOI 10.1111/clr.12421.

KERN, J.S.; KERN, T.; WOLFART, S.; HEUSSEN, N. A systematic review and meta-analysis of removable and fixed implant-supported prostheses in edentulous jaws: post-loading implant loss. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 174-195, 2016. doi:10.1111/clr.12531

KOCAR, M.; SEME, K.; HREN, N. I. Characterization of the normal bacterial flora in peri-implant sulci of partially and completely edentulous patients. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 25, n. 4, p. 690-698, 2010.

KORDBACHEH, C. K.; FINKELSTEIN, J.; PAPAPANOU, P. N. Peri-implantitis prevalence, incidence rate, ad risk factors: a study of electronic health records at a U.S. dental school. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 306-314, 2019. DOI 10.1111/clr.13416.

KORSCH, M.; MARTEN, S. M.; STOLL, D.; PRECHTL, C.; DÖTSCH, A. Microbiological findings in Early and late implant loss: an observational clinical case-controlled. **BMC Oral Health**, London, v. 21, n. 1, p. 112, 2021. DOI 10.1186/s12903-021-01439-w.

KOUTOUZIS, T.; GADALLA, H.; LUNDGREN, T. Bacterial colonization of the implant-abutment interface (IAI) of dental implants with a sloped marginal design: an in-vitro study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 18, n. 1, p. 161-167, 2016. DOI 10.1111/cid.12287.

KRÖGER A.; HÜLSMANN C.; FICKL S.; SPINELL, T.; HUTTIG, F.;KAUFMANN, F.; HEIMBACH, A.; HOFFMANN, P.; ENKLING, N.; RENVERT, S.; SCHWARZ, F.; DEMMER, R.T.; PAPAPANOU, P.N.; JDPSEN, S.; KEBSCHULL, M. The severity of human peri-implantitis lesions correlates with the level of submucosal microbial dysbiosis. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 45, n. 12, p. 1498-1509, 2018. DOI 10.1111/jcpe.13023.

LANG, N. P.; BERGLUNDH, T., Working Group 4 of Seventh European Workshop on

Periodontology. Periimplant diseases: where are we now? Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 38, p. 178-181, 2011. Supl 11. DOI 10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x.

LARRUCEA VERDUGO, C.; JARAMILLO NÚÑEZ, G.; ACEVEDO AVILA, A.; LARRUCEA SAN MARTÍN, C. Microleakage of the prosthetic abutment/implant interface with internal and external connection: In vitro study. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 25, n. 9, p. 1078-1083, 2014. DOI 10.1111/clr.12217.

LAURITANO, D.; MOREO, G.; LUCCHESI, A.; VIGANONI, C.; LIMONGELLI, L.; CARINCI, F. The impact of implant-abutment connection on clinical outcomes and microbial colonization: A narrative review. **Materials**, Basel, v. 13, n. 5, p. 1131, 2020. DOI 10.3390/ma13051131.

LEE, K. H.; MAIDEN, M. F.; TANNER, A. C.; WEBER, H. P. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 70, n. 2, p. 131-138, 1999. DOI 10.1902/jop.1999.70.2.131.

LOVE, R. M.; JENKINSON, H. F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Critical reviews in oral biology and medicine**: an official publication of the American Association of Oral Biologists, Boca Raton, v. 13, n. 2, p. 171-183, 2002. DOI 10.1177/154411130201300207.

MALÓ, P.; NOBRE, M. A.; LOPES, A.; FERRO, A.; GRAVITO, I. Immediate loading of implants placed in patients with untreated periodontal disease: a 5-year prospective cohort study. **European Journal of Oral Implantology**, Surrey, v. 7, n. 3, p. 295-304, 2014.

MENINI, M.; DELUCCHI, F.; BAGNASCO, F.; PERA, F.; TULIO, N. D.; PESCE, P. Analysis of the subgingival microbiota in implant-supported full-arch rehabilitations. **Dentistry Journal**, Basel, v. 8, n. 3, p. 104, 2020. DOI 10.3390/dj8030104.

MOHER, D.; SCHULZ, K. F.; ALTMAN, D.; CONSORT Group. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 285, n. 15, p. 1987-1991, 2001. DOI 10.1001/jama.285.15.1987.

MOMBELLI, A.; BUSER, D.; LANG, N.P. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. **Oral Microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 3, n. 3, p. 113-120, 1988. DOI 10.1111/j.1399-302x.1988.tb00095.x.

MOMBELLI, A. Microbiology and antimicrobial therapy of periimplantitis. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 28, p. 177-189, 2002. DOI 10.1034/j.1600-0757.2002.280107.x.

MOMBELLI, A.; DÉCAILLET, F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 38, p. 203-213, 2011. Supl 11. DOI 10.1111/j.1600-051X.2010.01666.x

MOMBELLI, A.; MÜLLER, N.; CIONCA, N. The epidemiology of peri-implantitis. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 23, p. s67-s76, 2012. Supl 6. DOI 10.1111/j.1600-0501.2012.02541.x.

MONJE, A.; ARANDA, L.; DIAZ, K. T. ; ALARCÓN, M. A.; BAGRAMIAN, R. A.; WANG, H. L.; CATENA, A. Impact of Maintenance Therapy for the Prevention of Peri-implant Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 95, n. 4, p. 372-379, 2016. DOI 10.1177/0022034515622432

MORASCHINI, V.; POUBEL, L. A.; FERREIRA, V. F.; BARBOZA, E. DOS S. P. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 44, n. 3, p. 377-388, 2015. DOI 10.1016/j.ijom.2014.10.023

NOROWSKI, P. A. Jr; BUMGARDNER, J. D. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied biomaterials**, Hoboken, v. 88, n. 2, p. 530-543, 2009. DOI 10.1002/jbm.b.31152.

ONG, C. T.; IVANOVSKI, S.; NEEDLEMAN, I. G.; RETZEPI, M.; MOLES, D. R.; TONETTI, M. S.; DONOS, N. Systematic review of implant outcomes in treated periodontitis subjects. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 35, n. 5, p. 438-462, 2008. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01207.x.

PANDOLFI, A.; RINALDO F.; PASQUALOTTO, D.; SORRENTINO, F.; LA TORRE, G.; GUERRA, F. A retrospective cohort study on peri-implant complications in implants up to 10 years of functional loading in periodontally compromised patients. **Journal of Periodontology**, Chicago, vol. 91, n. 8, p. 995-1002, 2020. DOI 10.1002/JPER.18-0715.

PAYNE, J. B.; JOHNSON, P. G.; KOK, C. R.; GOMES-NETO, J. C.; RAMER-TAIT, A. E.; SCHMID M. J.; HUTKINS, R. W. Subgingival microbiome colonization and cytokine production during early dental implant healing. **mSphere**, Washington, v. 2, n. 6, p. e00527-17, 2017. DOI 10.1128/mSphereDirect.00527-17.

PERSSON, L. G.; LEKHOLM, U.; LEONHARDT, A.; DAHLÉN, G.; LINDHE, J. Bacterial colonization on internal surfaces of Brånemark system implant components. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 90-95, 1996. DOI 10.1034/j.1600-0501.1996.070201.x.

PIMENTEL, A. C.; MANZI, M. R.; SARTORI, S. G.; DA GRAÇA NACLÉRIO-HOMEM, M.; SENDYK, W. R. In vivo effectiveness of silicone gel sheets as barriers at the inner microgap between a prosthetic abutment and an external-hexagon implant platform. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 29, n. 1, p. 121-126, 2014. DOI 10.11607/jomi.3177.

POKROWIECKI, R.; MIELCZAREK, A.; ZAREBA, T.; TYSKI, S. Oral microbiome and peri-implant diseases: where are we now? **Therapeutics and Clinical Risk Management**, Albany, v. 13, p. 1529-1542, 2017. DOI 10.2147/TCRM.S139795.

RAFFAINI, F.C.; FREITAS, A. R.; SILVA, T. S. O.; CAVAGIONI, T.; OLIVEIRA, J. F.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; PEDRAZZI, V.; RIBEIRO, R. F.; DO NASCIMENTO, C. Genome analysis and clinical implications of the bacterial communities in early biofilm formation on dental implants restored with titanium or zirconia abutments. **Biofouling**, Chur, v. 34, n. 2, p. 173-182, 2018. DOI 10.1080/08927014.2017.1417396.

RAVALD, N.; DAHLGREN, S.; TEIWIK, A.; GRÖNDAHL, K. Long-term evaluation of Astra Tech and Brånemark implants in patients treated with full-arch bridges. Results after 12-15 years. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 24, n. 10, p. 1144-1151, 2013. DOI 10.1111/j.1600-0501.2012.02524.x

RENVERT, S.; QUIRYNEN, M. Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 26, p. 15-44, 2015. Supl 11. doi: 10.1111/clr.12636.

ROCCUZZO, M.; BONINO, L.; DALMASSO, 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. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 25, n. 10, p. 1105-1112, 2014. DOI 10.1111/clr.12227.

ROOS-JANSKER, A. M.; LINDAHL, C.; RENVERT, H.; RENVERT, S. Nine-to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 33, n. 4, p. 290-295, 2006a. DOI 10.1111/j.1600-051X.2006.00906.x.

ROOS-JANSKER, A. M.; RENVERT, H.; LINDAHL, C.; RENVERT, S. Nine-to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 33, n. 4, p. 296-301, 2006b. DOI 10.1111/j.1600-051X.2006.00908.x.

SAKKA, S.; BAROUDI, K.; NASSANI, M. Z. Factors associated with early and late failure of dental implants. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, Richmond, v. 3, n. 4, p. 258-261, 2012. DOI 10.1111/j.2041-1626.2012.00162.x.

SALCETTI, J. M.; MORIARTY, J. D.; COOPER, L. F.; SMITH, F.W.; COLLINS, J. G.; SOCRANSKY, S. S.; OFFENBACHER, S. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 12, n. 1 p. 32-42, 1997.

SANZ, M.; CHAPPLE, I. L. Working Group 4 of the VIII European Workshop on Periodontology. Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 39, p. 202-206, 2012. Supl 12. DOI 10.1111/j.1600-051X.2011.01837.x.

SARTORI, I. A. M.; SILVEIRA JUNIOR, C. D.; FONTÃO, F. N. G. K.; MATTOS, M. G. C. Evaluation of radiographic technique using a new customized film holder for dental implant assessment. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 23, n. 1, p. 13-17, 2014. DOI 10.1097/ID.000000000000010.

SBORDONE, L.; BARONE, A.; RAMAGLIA, L.; CIAGLIA, R. N.; IACONO, V. J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathic bacteria associated with failing implants. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 66, n. 1, p. 69-74, 1995. DOI 10.1902/jop.1995.66.1.69.

SBORDONE, L.; BARONE, A.; CIAGLIA, R. N.; RAMAGLIA, L.; IACONO, V. J.

- Longitudinal study of dental implants in a periodontally compromised population. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 70, n. 11, p. 1322-1329, 1999. DOI 10.1902/jop.1999.70.11.1322.
- SEN, N.; SERMET, I. B.; GÜRLER, N. Sealing capability and marginal fit of titanium versus zirconia abutments with different connection designs. **The Journal of Advanced Prosthodontics**, Seoul, v. 11, n. 2, p. 105-111, 2019. DOI 10.4047/jap.2019.11.2.105.
- SGOLASTRA, F.; PETRUCCI, A.; SEVERINO, M.; GATTO, R.; MONACO, A. Periodontitis, implant loss and peri-implantitis. A meta-analysis. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 26, n. 4, p. e8-e16, 2015. DOI 10.1111/clr.12319.
- SMITH, M. M.; KNIGHT, E. T.; AL-HARTHI, L.; LEICHTER, J. W. Chronic periodontitis and implant dentistry. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 74, n. 1, p. 63-73, 2017. DOI 10.1111/prd.12190.
- SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; LEVIN, A. E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, London, v. 17, n. 4, p. 788-792, 1994.
- SUBRAMANI, K.; JUNG, R. E.; MOLENBERG, A.; HAMMERLE, C. H. Biofilm on dental implants: a review of the literature. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 24, n. 4, p. 616-626, 2009.
- TOMASI, C.; DERKS, J. Clinical research of peri-implant diseases-quality of reporting, case definitions and methods to study incidence, prevalence and risk factors of peri-implant diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 39, p. 207-223, 2012. Supl 12. DOI 10.1111/j.1600-051X.2011.01831.x.
- VERDUGO, C. L.; NUNEZ, G. J.; AVILA, A. A.; SAN MARTIN, C. L. Microleakage of the prosthetic abutment/implant interface with internal and external connection: in vitro study. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 25, n. 9, p. 1078-1083, 2014. DOI 10.1111/clr.12217.
- WEART, R. B.; LEE, A. H.; CHIEN, A. C.; HAEUSSER, D. P.; HILL, N. S.; LEVIN, P. A. A metabolic sensor governing cell size in bacteria. **Cell**, Cambridge, v. 130, n. 2, p. 335-347, 2007. DOI 10.1016/j.cell.2007.05.043.
- WERBELOW, L.; WEISS, M.; SCHRAMM, A. Long-term follow-up of full-arch immediate implant-supported restorations in edentulous jaws: a clinical study. **International Journal of Implant Dentistry**, Heidelberg, v. 6, n. 1, p. 34, 2020. DOI 10.1186/s40729-020-00232-8.
- WINDAEL, S.; VERVAEKE, S.; WIJNEN, L.; JACQUET, W.; DE BRUYN, H.; COLLAERT, B. Ten-year follow-up of dental implants used for immediate loading in the edentulous mandible: A prospective clinical study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 20, n. 4, p. 515-517, 2018. DOI 10.1111/cid.12612.
- YU, X. L.; CHAN, Y.; ZHUANG, L.; LAI, H. C.; LANG, N. P.; KEUNG LEUNG, W.; WATT, R. M. Intra-oral single-site comparisons of periodontal and peri-implant microbiota in health and disease. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 30, n. 2, p. 760-776, 2019. DOI 10.1111/clr.13459.



*Anexo*

---

---



## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP - FORP/USP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ACOMPANHAMENTO CLÍNICO, RADIOGRÁFICO E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES QUE RECEBERAM PRÓTESE MANDIBULAR IMPLANTOSSUPORTADA COM HISTÓRICO DE DOENÇA PERIODONTAL

**Pesquisador:** Cássio do Nascimento

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 63508116.0.1001.5419

**Instituição Proponente:** Universidade de Sao Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.903.541

**Apresentação do Projeto:**

O projeto propõe a execução de um estudo clínico longitudinal prospectivo com uma avaliação microbiológica e clínica em 3 tempos distintos em um grupo de 16 indivíduos que já foram investigados em um estudo prévio de curto prazo. As amostras de biofilme provenientes dos sulcos periimplantares e os dados dos parâmetros clínicos serão comparados nos tempos: T0= Instalação dos implantes/prótese (Baseline), e após 36 (T1) e 48 meses da instalação dos implantes e próteses (T2).

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

O presente estudo tem como objetivo avaliar, em longo prazo, a microbiota peri-implantar de indivíduos com história prévia de doença periodontal e que foram reabilitados com próteses totais fixas mandibulares.

**Objetivo Secundário:**

Por meio de um ensaio clínico longitudinal prospectivo, as seguintes variáveis de desfecho serão investigadas:• Identificação e quantificação, por meio do método de hibridização DNA Checkerboard, dos micro-organismos presentes no sulcos peri-implantares ao longo do tempo (T0:Baseline, T1: 36 meses e T2: 48 meses);•

**Endereço:** Avenida do Café s/n°

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-904

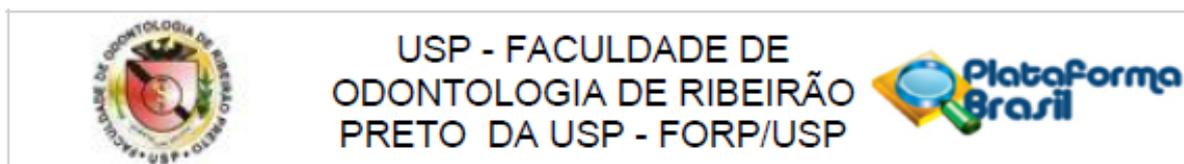
**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-0493

**Fax:** (16)3315-4102

**E-mail:** cep@forp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.903.541

Avaliação dos parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e reabsorção óssea marginal nos tempos T0, T1 e T2)

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A metodologia proposta para este presente estudo não trará nenhum custo adicional ao tratamento dos participantes. Não há previsão de desconfortos ou riscos em participar deste estudo. Pelo contrário, o comportamento clínico dos implantes e próteses será monitorado durante todo o período do estudo/tratamento.

**Benefícios:**

O maior benefício deste estudo será a identificação das bactérias presentes nos implantes e próteses, e desta forma, avaliar a importância clínica da presença destes micro-organismos e contribuir para sua redução em tratamentos futuros, auxiliando no desenvolvimento de métodos de higienização/descontaminação dos implantes/próteses, reduzindo desta forma o risco de desenvolvimento de reações inflamatórias e perda dos implantes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante, de interesse clínico e com perspectivas de desdobramentos futuros.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os termos obrigatórios requeridos. No TCLE, com papel timbrado do ILAPEO, há a menção de que o CEP da FORP/USP foi designado pela CONEP para acompanhamento ético da pesquisa, portanto, indicativo de que foi enviado à CONEP, provavelmente pelo fato de ter sido considerado Multicêntrico. Se assim o for, está correto, no entanto, gostaria que fosse verificado se este projeto pode ser realmente caracterizado como multicêntrico, tendo em vista que os procedimentos realizados não serão os mesmos em ambas as instituições.

**Recomendações:**

Aprovado.

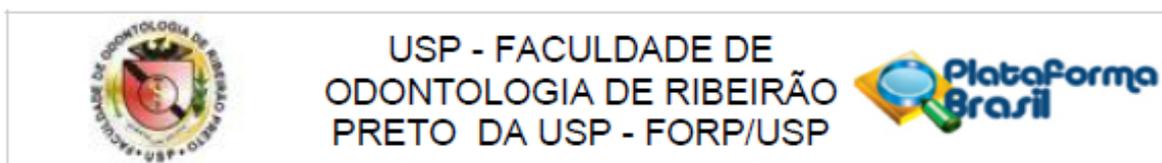
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de pesquisa aprovado conforme deliberado na 200ª Reunião do CEP/FORP/USP, em 25/01/2017.

Endereço: Avenida do Café s/n°  
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.903.541

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_845244.pdf	20/12/2016 16:37:44		Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	20/12/2016 16:36:52	Cássio do Nascimento	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Registros.pdf	16/12/2016 11:36:06	Cássio do Nascimento	Aceito
Outros	ParticipacaoVoluntarios.pdf	16/12/2016 11:35:40	Cássio do Nascimento	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InfraestruturalLAPEO.pdf	16/12/2016 11:34:50	Cássio do Nascimento	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InfraestruturaFORP.pdf	16/12/2016 11:34:39	Cássio do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/12/2016 11:33:32	Cássio do Nascimento	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	16/12/2016 11:33:18	Cássio do Nascimento	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 30 de Janeiro de 2017

Assinado por:  
Simone Cecilio Hallak Regalo  
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/n°  
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br



*Apêndice*

---

---



## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Nós, Prof. Dr. Cássio do Nascimento (pesquisador responsável) e Jefferson Antonio Gomes (pesquisador colaborador), convidamos você, \_\_\_\_\_, a participar da pesquisa **"Acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico de pacientes que receberam prótese mandibular implantossuportada com histórico de doença periodontal"**.

O uso dos implantes dentários tem-se tornado cada vez mais frequente nas clínicas odontológicas. Sobre o parafuso colocado no osso (implante), são colocadas próteses (dentes artificiais) para repor os dentes perdidos. Este estudo avaliará, por meio de identificação de DNA, as bactérias que se formam ao redor dos implantes e próteses e que podem causar problemas de saúde e perda dos implantes.

Você participante está sendo selecionado dentre os pacientes que já estão em tratamento nas clínicas do ILAPEO e que se enquadram no objetivo deste estudo. Você participante continuará o tratamento que lhe foi proposto na clínica do ILAPEO sem nenhuma alteração ou prejuízo no seu planejamento e execução. Para participar desta pesquisa, somente será realizada a coleta de placa bacteriana ao redor dos dentes e implantes e acompanhamento clínico e radiográfico. A placa bacteriana será coletada com cones de papel absorvente que serão colocados em contato com a sua gengiva por 30 segundos. O acompanhamento clínico será realizado por meio da verificação da saúde do tecido gengival ao redor dos implantes. O acompanhamento radiográfico será feito por meio de radiografias dos implantes. Estas análises serão realizadas em 2 consultas, após os períodos de 36 e 48 meses da cirurgia de colocação dos implantes e próteses. Estas análises não lhe trarão complicações nem prejuízos, uma vez que serão realizadas nos mesmos dias das consultas programadas para o seu tratamento. O tempo médio necessário para a coleta da placa e avaliações clínicas e radiográficas será de aproximadamente 15 minutos. Este estudo não tem nenhuma relação com o seu tratamento no ILAPEO. Você participante que aceitar participar deste projeto de pesquisa não terá nenhum custo adicional. Todos os gastos relacionados à realização deste estudo (materiais para coleta da placa bacteriana, radiografias e análises microbiológicas) serão custeados por nós pesquisadores.

Não há previsão de desconfortos ou riscos em participar deste estudo. Pelo contrário, o comportamento clínico dos implantes e próteses será monitorado durante todo o período do estudo/tratamento. O maior benefício deste estudo será a identificação das bactérias presentes nos implantes e próteses, e desta forma, avaliar a importância clínica da presença destes micro-organismos e contribuir para sua redução em tratamentos futuros, auxiliando no desenvolvimento de métodos de higienização/ descontaminação dos implantes/próteses, reduzindo desta forma o risco de desenvolvimento de reações inflamatórias e perda dos implantes.

As coletas serão realizadas nas consultas rotineiras de atendimento evitando assim que algum custo desnecessário, além do programado, seja gerado para você. Caso haja alguma condição excepcional de necessidade de comparecimento, você será informado e, apenas nesse caso, as despesas de transporte serão custeadas por nós pesquisadores.

Você terá acompanhamento e assistência dos pesquisadores durante toda a realização do estudo, inclusive no caso de necessidade de interrupção da pesquisa, e também garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Todos os dados relacionados com você serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados será realizada, preservando a sua identidade, pois não serão publicadas fotografias, nomes e/ou documentos dos participantes, nos artigos a serem publicados ou apresentados em reuniões científicas.

A sua participação não é obrigatória, e você poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não participação neste projeto de pesquisa não trará prejuízo algum em sua relação com os pesquisadores ou com o ILAPEO.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**Você pode entrar em contato com a Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Designado pelo CONEP para acompanhamento ético desta pesquisa), caso necessite de algum esclarecimento. Telefone: (16) 3315-0493, e-mail: cep@forp.usp.br e horário de atendimento: das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira (exceto feriados e pontos facultativos).**

Este termo será confeccionado em duas vias de igual teor, será assinado na última página e rubricado nas demais pelos pesquisadores e pelo participante da pesquisa, ficando uma via com os pesquisadores e a outra com o participante da pesquisa.

---

PROF. DR. CÁSSIO DO NASCIMENTO

Telefones para contato: (16) 3315-4095 E-mail: cassionasc@forp.usp.br

---

Jefferson Antônio Gomes

Telefones para contato: (41) 3595-6051 E-mail: jvgo@uai.com.br

Endereço e telefone do ILAPEO: Rua Jacarezinho, 656, Mercês, Curitiba-PR  
(41) 3595-6051

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

---

Participante da pesquisa

RG: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_