**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

João Paulo Corrêa Barros

**Avaliação dos efeitos de diferentes agentes
condicionadores na descontaminação da superfície de
titânio: estudo *in vitro***

**Bauru
2016**

João Paulo Corrêa Barros

**Avaliação dos efeitos de diferentes agentes condicionadores na
descontaminação da superfície de titânio: estudo *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração reabilitação Oral linha de pesquisa Periodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana C Passanezi Sant'Ana

Versão Corrigida

**Bauru
2016**

Barros, João Paulo Corrêa

B278a Avaliação dos efeitos de diferentes agentes condicionadores na descontaminação da superfície de titânio: estudo *in vitro* / João Paulo Corrêa Barros. – Bauru, 2016.

116p.: il ; 30cm

Tese de Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas – área de concentração Reabilitação Oral linha de pesquisa Periodontia – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Campos Passanezi Sant’Ana

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 20 de março de 2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

JOÃO PAULO CORREA BARROS

Nascimento	14 de novembro de 1986
Naturalidade	São Paulo - SP
Filiação	Carlos Roberto Barros e Maria Isabel Correa Barros
2007 – 2010	Curso de Odontologia – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo – Bauru – SP
2008 – 2010	Bolsista no Programa de Educação Tutorial pertencente à secretaria de ensino Superior (SESu – MEC)
2010 – 2013	Especialização em Prótese Dentária pela FUNBEO em parceria com a Faculdade de Odontologia de Bauru –USP.
2011 – 2013	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Reabilitação Oral linha de pesquisa Periodontia. Bolsista da FAPESP.
2012 – 2012	Bolsista do programa de Estágio em Pesquisa no Exterior da FAPESP, realizado junto à Disciplina de Periodontia da University of Southern California, sob a supervisão do Prof. Dr. HomaZadeh.
2013 – 2016	Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Reabilitação Oral linha de pesquisa Periodontia.

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

**Ao meu pai Carlos Roberto Barros e a minha mãe Maria Isabel
Corrêa Barros, pelo amor e carinho. Mais uma etapa vencida com
todo o apoio de vocês. Amo vocês!**

**A minha esposa Larissa Borges Bressane pelo incentivo e ajuda na
confeção desta tese. Te amo muito.**

A todos que querem o meu sucesso pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Não posso deixar de agradecer aos meus pais Carlos Roberto Barros e Maria Isabel Corrêa Barros, por terem me fornecido condições e educação para me tornar o profissional e homem que sou. Hoje estou finalizando uma fase que demorei anos para realizar. Em todos os passos tive o apoio de vocês com muito carinho. Muito obrigado por toda a atenção financeira. Amo muito vocês!

À minha esposa Larissa Borges Bressane por ser essa pessoa tão companheira e carinhosa! Como te digo, você foi o melhor presente que ganhei de Bauru! Nossos planos e sonhos são intermináveis e tenho certeza que vamos realizar cada um deles! Obrigado por todos momentos maravilhosos que estamos vivendo juntos e por toda ajuda, em conselhos, na confecção desta tese de Doutorado!

Te amo muito!

À Professora Doutora Adriana Campos Passanezi Santana, por todo seu conhecimento, paciência e acima de tudo pela sua amizade. Após 8 anos de convivência muito próxima, estamos com este título de Doutorado em mãos. Só tenho a te agradecer por tudo que fez por mim, por entender meus problemas pessoais, por me apoiar em sempre continuar, por me ouvir e se preocupar. Hoje, estou finalizando esta etapa e uma vida em Bauru, porém sempre saiba que você tem um grande amigo em São Paulo pronto para te ajudar no que for preciso. Obrigado por tudo!

Aos Professores Doutores Sebastião Gregghi, Maria Lúcia Rezende, Euloir Passanezi, Mariana Zangrando e Carla Damante por todos os ensinamentos, pelo convívio diário que tivemos, pela amizade, apoio e pela grande bagagem de ensinamentos que me foi passada durante a graduação e pós-graduação, que me fez crescer muito profissionalmente.

Aos pós-graduandos e funcionários, em especial a minha querida amiga Ivânia, por toda ajuda e conselhos durante todos estes anos. Você é uma pessoa muito querida! Grande beijo.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa da sua diretora Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, pelo apoio institucional.

***“You tell me, and I forget.
You teach me, and I remember.
You involve me, and I learn.”***

Benjamin Franklin

RESUMO

RESUMO

O uso de implantes osseointegrados vem crescendo nas últimas décadas e, juntamente com eles, suas complicações. A periimplantite se apresenta como uma infecção bacteriana que afeta os tecidos moles e duros ao redor do implante, promovendo perda da osseointegração. Assim, o objetivo primário deste estudo foi analisar a efetividade da remoção de bactérias, através do software ImageJ, aderidas às superfícies de titânio por diferentes agentes químicos condicionantes, por meio de análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Juntamente foi analisado a alteração da rugosidade de superfície após a utilização dos agentes. Foi realizado estudo *in vitro*, no qual 70 covers (protótipos de implantes) passaram por preparo das superfícies para adequação do meio à cultura bacteriana, fixação das bactérias; e em seguida, foram divididos em 7 grupos (n=10), de acordo com o tratamento: AF180– aplicação de ácido fosfórico (AF) por 180 segundos; AF90- AF por 90 segundos; EDTA180 – EDTA por 180 segundos; EDTA90 – EDTA por 90 segundos; AC180 – ácido cítrico por 180 segundos; AC90 –AC por 90 segundos; Controle – RAR. A análise comparativa do grau de contaminação bacteriana observado antes e depois do tratamento entre os diferentes grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; e as alterações da rugosidade superficial foram analisadas por meio do teste ANOVA a dois critérios, pós-teste de Dunnett. Através desta metodologia, este trabalho sugere que o tratamento de superfícies de titânio contaminadas por meio do emprego de solução em gel de EDTA a 24% por 90 e 180 segundos e ácido cítrico a 50% por 180 segundos é efetiva para remoção de *A. actinomycetemcomitans*. Além disso, o tratamento por meio de EDTA por 90 e 180 segundos promove alteração significativa dos parâmetros de rugosidade superficial, especialmente quando comparado aos grupos controle e AF180, indicando que este tratamento pode resultar em subtração ácida adicional.

PALAVRAS-CHAVE: condicionamento ácido; periimplantite; descontaminação.

ABSTRACT

ABSTRACT

Evaluation of the effects of different conditioning agents in the decontamination of the implant surface: in vitro study

The use of dental implants has grown in recent decades and, with them, their complications. The periimplantitis is presented as a bacterial infection that affects the soft and hard tissue around the implant, promoting loss of osseointegration. Thus, the primary objective of this study was to analyze the effectiveness of removal of bacteria by means of the ImageJ software, adhered to the titanium surfaces by different chemical conditions, through analysis in scanning electron microscopy (SEM). The change of surface roughness was also analyzed after using the chemical agents. An in vitro study in which 70 covers (implant prototypes) was prepared for the bacteria culture, fixation of the bacterias; and then they were divided into 7 groups (n = 10), according to the surface treatment: AF180- application of phosphoric acid (FA) for 180 seconds; AF90- AF for 90 seconds; EDTA180 - EDTA for 180 seconds; EDTA90 - EDTA for 90 seconds; AC180 - citric acid for 180 seconds; AC90 -AC for 90 seconds; Control - RAR. The comparative analysis of the degree of bacterial contamination was performed using Kruskal-Wallis non parametric test; and changes of surface roughness were analyzed by ANOVA two criteria, post-test Dunnett. Through this method, this work suggests that treatment of titanium contaminated surfaces by means of EDTA gel solution employing 24% for 90 and 180 seconds and citric acid 50% for 180 seconds is effective for removing *A. atinomycetocomitans*. Moreover, treatment using EDTA for 90 to 180 seconds promotes significant change of surface roughness parameters, especially when compared to control groups and AF180, indicating that this treatment can result in additional acidic subtraction.

KEYWORDS: acid etching; periimplantitis; decontamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sequência das etapas da metodologia que foi efetuada.....	51
Figura 2	Ilustração do <i>software</i> de análise de imagens ImageJ, utilizado para determinação bidimensional dos parâmetros de rugosidade superficial	53
Figura 3	Análise do perfil de superfície das amostras antes e depois do tratamento físico-químico no <i>plugin</i> 'Plot Surface'.....	54
Figura 4	Ilustração de <i>plugin</i> 'Interactive 3D Surface Plot', utilizado para obtenção dos gráficos de plotagem das características de rugosidade superficial das amostras antes e depois do preparo físico-químico.....	55
Figura 5	Aspecto macroscópico das colônias de A.a. em ágar TSBV.....	57
Figura 6	Imagem de MEV das colônias de <i>A. actinomycetencomitans</i> sobre a superfície de titânio	58
Figura 7	Conversão da imagem para 8 bits para análise da contaminação bacteriana	60
Figura 8	Delimitação das colônias bacterianas através da função 'threshold' no programa ImageJ	61
Figura 9	Delimitação das colônias bacterianas no <i>software</i> ImageJ	61

Figura 10	Determinação do percentual de área contaminada/não contaminada, através do programa de análise de imagens ImageJ	61
Figura 11	Fotomicrografia após a descontaminação, com a grade de padronização da área do software de análise de imagens ImageJ	62
Figura 12	Seleção da área sem colonização bacteriana para análise exclusiva desta área pelo software de análise de imagens ImageJ	63
Figura 13	Análise da rugosidade da superfície selecionada após o tratamento químico pelo software de análise de imagens ImageJ	63
Figura 14	Fotomicrografia de parafuso de recobrimento previamente ao preparo para cultivo de bactérias	67
Figura 15	Fotomicrografia de parafuso de recobrimento posteriormente ao preparo com broca diamantada, jateamento de óxido de alumínio e banho em HCL.....	67
Figura 16	Imagem A: superfície de titânio sem nenhum preparo prévio. Imagem B: superfície após o tratamento. Imagens C e D: análise de plotagem tridimensional. Imagem E: perfil bidimensional de superfície sem tratamento. Imagem F: plotagem bidimensional do perfil de superfície após o tratamento [Amostra 1].....	69
Figura 17	Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo EDTA90	70

Figura 18	Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo EDTA180	71
Figura 19	Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo AC90	72
Figura 20	Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo AC180	73
Figura 21	Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo AC90	74
Figura 22	Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo AF180	75
Figura 23	Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo CONTROLE	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de rugosidade de superfície (unidade) analisados no <i>plugin</i> parâmetros de rugosidade (ImageJ, NIH, EUA) <i>antes do preparo da superfície</i> [Comprimento da amostra: 100µm, nivelamento de superfície; medida em pixels].....	68
Tabela 2	Características de rugosidade de superfície (unidade) analisados no <i>plugin</i> parâmetros de rugosidade (ImageJ, NIH, EUA) <i>depois do preparo da superfície</i> [Comprimento da amostra: 100µm, nivelamento de superfície].....	68
Tabela 3	Área (%) dos corpos de prova contaminados por bactérias antes e após o tratamento nos diferentes grupos	77
Tabela 4	Características de rugosidade de superfície (unidade) analisados no <i>plugin</i> parâmetros de rugosidade (ImageJ, NIH, EUA) <i>depois dos tratamentos de descontaminação de superfície</i> [Comprimento da amostra: 100µm, nivelamento de superfície].....	78
Tabela 5	Tabela ANOVA dos parâmetros de rugosidade pré e pós-tratamento de descontaminação de superfície.....	79
Tabela 6	Análise estatística dos parâmetros de rugosidade observados após os diferentes tratamentos de superfície comparativamente aos parâmetros de rugosidade iniciais (ANOVA a dois critérios, pós-teste Dunnett)	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Periimplantite.....	27
2.2	Tratamento da peri-implantite.....	33
2.2.1	Descontaminação da superfície dos implantes de titânio.....	34
2.3	Condicionamento ácido das superfícies de implantes: bases científicas	39
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Estudo piloto.....	51
4.2	Obtenção e preparo dos corpos de prova	51
4.3	Caracterização da rugosidade de superfície dos corpos de prova antes e após o preparo inicial das amostras	52
4.4	Contaminação bacteriana das superfícies de implantes	55
4.4.1	Cultura de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	55
4.4.2	Inoculação dos corpos de prova.....	56
4.5	Fixação das bactérias sobre a superfície dos corpos de prova.....	57
4.6	Descontaminação de superfície	59
4.7	Avaliação da contaminação bacteriana das superfícies antes e depois do tratamento.....	60
4.8	Caracterização da rugosidade de superfície dos corpos de prova antes e depois do tratamento químico das superfícies contaminadas	62
4.9	Análise estatística.....	64

5	RESULTADOS.....	65
5.1	Caracterização da microtopografia de superfície	67
5.2	Descontaminação das superfícies de titânio com as diferentes soluções químicas	70
5.2.1	Análise Descritiva	70
5.2.1.1	EDTA90	70
5.2.1.2	EDTA180	71
5.2.1.3	AC90	72
5.2.1.4	AC180	73
5.2.1.5	AF90	74
5.2.1.6	AF180	75
5.2.1.7	Controle	76
5.2.2	Análise quantitativa	77
5.3	Características de rugosidade de superfície após o tratamento químico para descontaminação da superfície dos protótipos de implantes	78
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dos implantes osseointegrados possibilitou o tratamento reabilitador de pacientes parcialmente ou totalmente desdentados, devolvendo aos mesmos função mastigatória eficiente e estética satisfatória. Desde sua descoberta há 50 anos até os dias atuais, os implantes odontológicos sofreram algumas modificações na composição, desenho e características de superfície com o objetivo de melhorar a qualidade da osseointegração (Albrektsson et al. 2005).

Os tecidos moles peri-implantares é, em muitos aspectos, semelhante à gengiva ao redor dos dentes naturais, incluindo epitélio juncional de aproximadamente 2mm de comprimento e zona de tecido conjuntivo supracrestal de aproximadamente 1mm (Charalampakis, Belibasakis 2015). Adicionalmente, as superfícies dos implantes podem ser colonizadas por microbiota na forma de biofilme (Listgarten MA. 1997; Charalampakis, Belibasakis 2015), embora o padrão de colonização dos implantes pareça ser inicialmente mais lenta do que nos dentes naturais devido à ausência de microbiota indígena associada (Quirynen M, et al. 2005; Charalampakis, Belibasakis 2015). Uma vez estabelecido, o biofilme induz a respostas biológicas de tecido mole e duro bastante similar ao que se observa ao redor dos dentes naturais, o que implica no desenvolvimento de complicações biológicas de implantes osseointegrados em longo prazo, mediadas pelo biofilme (Charalampakis, Belibasakis 2015). Assim, similarmente ao que ocorre nos dentes naturais, os tecidos peri-implantares podem ser acometidos por processo inflamatório e infeccioso, resultando em aumento da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, supuração, perda óssea e mobilidade clínica, podendo comprometer o sucesso do tratamento (Mombelli et al., 1987; (Albrektsson, Johansson, Sennerby; 1994; Tonetti, 1996).

As doenças peri-implantares são classificadas em mucosite peri-implantar e peri-implantite (Derks et al. 2015). Enquanto a mucosite peri-implantar é definida como inflamação nos tecidos moles peri-implantares relacionada à presença de placa sem perda óssea, a peri-implantite se caracteriza pela presença de inflamação associada à aprofundamento do sulco peri-implantar, sangramento à sondagem e

perda óssea progressiva ao redor dos implantes (Albrektsson, Johansson, Sennerby; 1994; Zitzmann, Berghlund 2008; Charalampakis, Belibasakis 2015).

A prevalência de mucosite peri-implantar e peri-implantite parece ter aumentado nos últimos anos. Revisão sistemática e meta-análise recentemente publicada (Derks, Tomasi 2015) demonstrou prevalência de 19% a 65% de mucosite peri-implantar e de 1%-47% de peri-implantite, com média de, respectivamente, 43% e 22%. Houve correlação positiva entre a prevalência de peri-implantite e o tempo do implante em função e negativa entre a prevalência de peri-implantite e o limite definido de perda óssea.

O diagnóstico das infecções peri-implantares está amplamente baseado em critérios clínicos e radiográficos (Mombelli A, et al. 1997). As lesões de mucosite peri-implantar se caracterizam pela presença de sangramento à sondagem. As lesões de peri-implantite podem apresentar, além do sangramento à sondagem, supuração, migração apical do epitélio juncional e perda óssea, observada geralmente em imagens radiográficas como um defeito circunferencial ao redor dos implantes (Heitz-Mayfield LJ. 2008), podendo levar à perda (Lindhe J, Meyle J. 2008)

A peri-implantite é uma infecção sítio-específica que apresenta diversas características em comum com a periodontite crônica (Mombelli et al. 1987; Tonetti 1996; Charalampakis, Belibasakis 2015). A microbiota peri-implantar em condições de saúde está composta principalmente de cocos Gram-positivos e bacilos não móveis, além de algumas espécies anaeróbias Gram-negativas (Mombelli et al. 1987), semelhante à microbiota associada a condições de saúde gengival (Mombelli et al. 1987; Quirynen M, Listgarten MA. 1990). As lesões de mucosite peri-implantar estão associadas com aumento na prevalência de cocos, bacilos móveis e espiroquetas, similarmente aos quadros de gengivite (Pontoriero R, et al. 1994). As lesões de peri-implantite estão associadas com a presença de espiroquetas, bacilos móveis, espécies pigmentadas de negro (Mombelli et al. 1987; Mombelli A, Decaillet F. 2011; Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. 1991) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kalykakis GK, et al. 1998; Augthun M, Conrads G. 1997). Análise por PCR permitiu a detecção de patógenos frequentemente associados a lesões de periodontite, como *P. gingivalis* (Devides, Franco 2006; Galassi F et al. 2012), *P. intermedia* (Devides, Franco 2006; Al-Radha AS et al. 2012),

Fusobacterium spp (Al-Radha et al. 2012), além do *A. actinomycetencomitans* (Devides SL, Franco AT. 2006).

A composição da microbiota peri-implantar parece ser influenciada pela microbiota dos dentes remanescentes. Canullo et al. (2015) demonstraram prevalência de peri-implantite em 10.3% dos pacientes e 7.3% dos implantes. Maior porcentagem de indivíduos saudáveis periodontalmente foi encontrada no grupo sem peri-implantite. Os implantes acometidos por peri-implantite apresentaram maior percentual de acúmulo de placa, sangramento à sondagem e número de implantes apresentando <2 mm de gengiva inserida. Adicionalmente, houve maior prevalência de próteses cimentadas e implantes instalados em áreas enxertadas no grupo com peri-implantite. A composição microbiológica dos dentes vizinhos se assemelhou a composição do sulco peri-implantar, com alta frequência de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. micros* e *E. corrodens*. (Canullo L. et al. 2015; Canullo L et al. 2015).

Devido à semelhança entre a doença periodontal e a peri-implantite, as terapias propostas para seu tratamento se baseiam nas evidências obtidas com o tratamento da periodontite e estão direcionadas principalmente à redução da contaminação bacteriana das bolsas peri-implantares e superfície dos implantes, conjuntamente ou não com técnicas visando a regeneração óssea e a reosseointegração. (Heitz-Mayfield LJA, Lang NP. 2004). Os tratamentos propostos incluem remoção mecânica do biofilme por meio de raspagem manual, por ultrassom, com uso de brocas ou escovas, jatos abrasivos e laser (Speelman et al. 1992; Brookshire et al. 1997; Mombelli, Lang 1998; Lang et al. 2000; Suh et al. 2003; Heitz-Mayfield, Lang 2004; Schou et al. 2004), uso de antimicrobianos sistêmicos, descontaminação química da superfície do implante com tetraciclina (Meffert et al. 1992; Schenk et al., 1997; Parma-Benfenati et al. 2015), digluconato de clorexidina (Lang et al., 2000), ácido cítrico (Meffert et al., 1992; Zablotsky et al., 1992; Zablotsky, 1993), peróxido de hidrogênio (Roos-Jansaker et al., 2011) e ácido fosfórico 35% (Subramani K, Wismeijer D. 2012), cirurgia a retalho e regeneração óssea (Jovanovic, 1993; Persson et al. 1996; Hurzeler et al. 1997; Schwarz et al. 2005, 2006a,b; Roos-Jansaker et al. 2006; Kotsovilis et al. 2008; Lindhe, Meyle 2008; Renvert et al. 2008; Máximo et al. 2009; Gosau et al. 2010; Roccuzzo et al.

2011).

Até os dias atuais, o melhor agente químico para descontaminação da superfície do implante ainda não foi determinado (Gosau M, et al. 2010). Lubin et al. (2014) avaliaram a efetividade da descontaminação de implantes Osseotite e Nanotite inoculados com *P. gingivalis* com EDTA, tetraciclina, ácido cítrico ou laser de neodímio (Nd:YAG). Após a descontaminação, os discos implantes foram posicionados em cultura de osteoblastos. Os discos de implantes Osseotite foram descontaminados mais facilmente do que os discos de Nanotite, sendo o ácido cítrico e a tetraciclina as formas de tratamento mais efetivas.

A colonização, estrutura e força do biofilme bacteriano em implantes osseointegrados é influenciada por diversos fatores, como rugosidade superficial, composição química, hidrofobia, carga superficial e energia do material (Tennert et al., 2014). O exame dos biofilmes orais é complicado porque a estrutura do biofilme é influenciada por efeitos mecânicos, físicos e químicos (Robinson C, et al. 1997; Tennert et al., 2014). No biofilme, os organismos diferem consideravelmente em relação ao estado planctônico, pois se caracterizam por células que não estão simplesmente aderidas à superfície, mas que vivem em comunidade microbiana embebidos no glicocálix (Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999; Freire et al. 2011). No biofilme, os microorganismos apresentam fenótipo alterado relativamente à taxa de crescimento, transcrição gênica e resistência bacteriana (Donlan RM, Costerton JW. 2002; Patel R. 2005; Amarasinghe JJ, Scannapieco FA, Haase EM. 2009; Freire et al. 2011). Foi sugerido que o *A. actinomycetencomitans* pode formar biofilme em implantes de titânio, com capacidade de resultar em resposta inflamatória, osteólise e destruição tecidual quando implantados em modelos animais (Freire et al. 2011).

Para testar a eficácia de diferentes substâncias químicas na descontaminação de amostras de implantes de titânio sem influência da composição microbiana, variável de um indivíduo para outro, e da rugosidade do implante, é, portanto, importante a padronização das amostras e das bactérias colonizantes sob condições *in vitro*, permitindo a posterior análise *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Periimplantite

O termo peri-implantite foi introduzido na literatura por Mombelli et al. (1987), estando relacionada com perdas tardias de implantes. Tem caráter multifatorial, sendo descrita como um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos mole e duro ao redor de implantes osseointegrados (MOMBELLI et al., 1999). A peri-implantite foi definida como um processo inflamatório que afeta os tecidos moles e duros ao redor do implante, levando à perda de suporte ósseo em implantes sob função mastigatória (Albrektsson, Johansson, Sennerby; 1994; MOMBELLI et al, 1988). Apresenta tecido muito vascularizado, com grande densidade de células inflamatórias, normalmente associado a um defeito ósseo em forma de cratera (Lindhe et al., 1992).

Essa doença ocorre de forma semelhante à doença periodontal, uma vez que é resultante do desequilíbrio hospedeiro-microrganismo que pode se manifestar por meio de uma série de mudanças inflamatórias levando a duas doenças distintas. A mucosite peri-implantar é uma lesão confinada aos tecidos moles peri-implantares, e a periimplantite, que envolve, além dos tecidos moles, o tecido ósseo adjacente ao implante (Listgarten MA. (1997). Essa correlação entre o acúmulo de biofilme bacteriano e o estabelecimento de uma reação inflamatória foi inicialmente estabelecida por Loe et al. (1965) para o desenvolvimento da doença periodontal.

De acordo com Listgarten MA. (1997) a maioria dos sistemas de implantes dentários endósseos contemporâneos são baseados em desenhos e materiais que, ao longo das últimas três décadas, provaram ser previsivelmente confiável. Com os protocolos cirúrgicos e protéticos adequados, as taxas de perda do implante ao longo de 5 anos tem sido menos de 15%. Estudos experimentais e clínicos têm identificado vários critérios de diagnóstico, incluindo parâmetros de sondagem, avaliação radiográfica e fluido peri-implantar e análise salivar. Análises têm investigado indicadores de riscos potenciais para a doença peri-implantar incluindo a má higiene bucal, tabagismo, história de periodontite, diabetes, características

genéticas, consumo de álcool e de superfície do implante. A profundidade de sondagem, a presença de sangramento e supuração devem ser avaliados regularmente para o diagnóstico de doenças perimplantares. As radiografias são necessários para avaliar os níveis de apoio ósseas ao redor de implantes (Heitz-Mayfield LJ. 2008).

Os critérios clínicos mais aceitos como sucesso/insucesso dos implantes com ênfase em sinais e sintomas que são seguidos principalmente em trabalhos científicos para diagnosticar se o implante apresenta-se saudável são a ausência de mobilidade, ausências de dor e sensação de corpo estranho, ausência de infecção com supuração, ausência de radiolucidez ao redor do implante, ausência de profundidade de sondagem maior que 5mm, ausência de sangramento à sondagem e, após o primeiro ano de função, ausência de perda óssea maior que 0,2mm/ano (Carlsson et al., 1986; BUSER et al., 1997).

As perdas de implantes podem ocorrer em decorrência de trauma oclusal, onde o paciente não apresenta dor, supuração e os implantes que falharam apresentam um perfil microbiológico muito similar aos sítios de implantes saudáveis (ROSENBERG et al., 1991). Outro fator etiológico pode ser a infecção bacteriana e a colonização da superfície do implante e da região peri-implantar, principalmente bacilos Gram- anaeróbios, bactérias fusiformes e espiroquetas (MOMBELLI et al, 1988; Mombelli A, Lang NP, 1998; Kao RT, Curtis DA, Murray PA., 1997, ROSENBERG et al., 1991; LOMBARDO et al, 2015). Essa infecção ocorre geralmente na forma de biofilmes que se instalam na superfície dos implantes promovendo a inflamação dos tecidos periimplantares (VAN DER WEIJDEN et al, 2004; LOMBARDO et al, 2015). A formação de comunidades sésseis e sua resistência inerente aos antimicrobianos estão na raiz de muitas infecções bacterianas persistentes e crônicas. Estudos de biofilmes revelaram grupos diferenciados, estruturadas de células com propriedades comunitárias. Recentes avanços em nossa compreensão da base genética e molecular de bactérias poderá fornecer um meio para o controle de infecções biofilme. (Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999)

Um estudo realizado por Quirynen M, Listgarten MA. (1990) em 24 pacientes parcialmente desdentados (com implantes e dentes na mesma mandíbula), não

puderam ser encontradas diferenças significativas na distribuição dos morfotipos bacterianos entre implantes e dentes naturais. No entanto, quando compararam a placa de implantes de pacientes totalmente desdentados com os de dentes ou implantes de pacientes parcialmente desdentados, apareceram diferenças significativas. Os resultados sugerem que os dentes podem servir como um reservatório para a colonização bacteriana de implantes de titânio na mesma boca.

Análises feitas da microbiota periimplantar em comparação com a microbiota de sulcos de dentes presentes são muito semelhantes (Pontoriero R, 1994; Robinson C, et al., 1997). Diferenças microbianas são mais encontradas dentro das conexões da prótese sobre implante do que no sulco periimplantar. (Canullo L, 2015; Devides SL, Franco AT, 2006).

As análises de amostras com vários métodos indicam que a periimplantite é uma infecção anaeróbica mista. Na maioria dos casos, a composição da flora é semelhante à flora subgengival de periodontite crônica que é dominada por bactérias Gram-negativas. Infecções peri-implantar podem, ocasionalmente, ser ligada a uma microbiota diferente, incluindo um elevado número de peptostreptococci ou estafilococos. (Mombelli A, Decaillet F; 2011)

Além da microbiota bacteriana patogênica, o risco do estabelecimento do quadro de peri-implantite está relacionado a diversos fatores de risco, como hábitos parafuncionais gerando sobrecargas oclusais, falta de assentamento passivo das próteses e respostas imunológicas individuais (Behneke et al., 2000).

Os primeiros autores a estudarem a microbiota do sulco ou bolsa peri-implantar foram Rams et al. (1984). Os autores colheram amostras de 17 implantes inseridos há no mínimo 6 meses em 13 pacientes, valendo-se de microscópio de contraste de fase, observaram altos níveis de espiroquetas e bastonetes móveis em 3 implantes considerados perdidos.

Esses dados foram comprovados por Holt (1986), que observaram, por meio de cultura e microscopia de contraste de fase, uma grande quantidade de espiroquetas e *Bacteroides sp.* ao redor de implantes apresentando sinais de doença peri-implantar.

Até os dias atuais, diversos estudos foram realizados a fim de identificar as bactérias que colonizam a região peri-implantar. Van de Velde et al. (2009) avaliaram clinicamente e microbiologicamente 12 implantes instalados em 10 pacientes. Após 6 meses, pode-se observar perda óssea superior a 3 mm em 3 implantes e colonização por diversas bactérias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Tanarella forsythia*. O *A. actinomycetemcomitans* tem sido encontrado na maioria dos estudos que buscaram identificar a microbiota ao redor de implantes (COSGAREA, et al. 2012; PERSSON; RENVERT, 2014; ZHUANG, et al. 2014; CANULLO, et al. 2015).

Os implantes na falta de suspeita de etiologia traumática demonstraram um perfil de morfotipo compatível com a saúde periodontal e a microflora foi predominada por estreptococos. Ao avaliar o tempo de falha após a inserção inicial, verificou-se que a perda de fixação resultante de infecção ocorreu mais frequentemente entre a colocação inicial e cirurgia de segunda etapa. (Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J, 1991; Kalykakis GK, et al. 1998)

Além de ser encontrada com frequência nos casos de perda óssea ao redor de dentes e implantes, o *A. actinomycetemcomitans* demonstrou potencial de infiltração nos *gaps* das interfaces implante-pilar sem carga (NASCIMENTO et al. 2011). Cosgarea et al. (2012), em estudo comparando pacientes com periodontite crônica e pacientes periodontalmente saudáveis que receberam implantes com relação à colonização bacteriana, observaram que pacientes com periodontite crônica apresentaram colonização da bolsa periodontal e peri-implantar por *P. gingivalis* (Galassi F, 2012) e *A. actinomycetemcomitans*, sendo, portanto, indicada a realização de tratamento periodontal previamente à instalação de implantes.

A colonização microbiana ao redor de implantes segue padrão muito parecido com o que ocorre ao redor dos dentes, ou seja, ocorre uma alteração da microflora na região com o desenvolvimento da doença (LEONHARDT et al. 1992; KLINGE et al., 2005).

Segundo Aoki et al. (2012), a prevenção da peri-implantite é essencial para o sucesso da reabilitação com implantes. Os autores mostraram que a detecção de *A.*

actinomycetemcomitans, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, e *F. nucleatum* nos sulcos gengivais dos dentes adjacentes a implantes eram similares ao sulco peri-implantar, sugerindo que a colonização do sulco do implante foi afetada por estes microrganismos no sulco gengival dos dentes adjacentes. O mesmo foi encontrado por Kalykakis GK, et al. (1998), tendo como principal bactéria associada a periimplantite a *A. actinomycetemcomitans*.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um bastonete Gram negativo, pequeno, não formador de esporos, imóvel, anaeróbico facultativo que se desenvolve melhor em condições de anaerobiose, principalmente na temperatura de 37°C (Slots, 1981), sendo que no seu primeiro isolamento, as colônias apresentam-se translúcidas, brilhantes e com uma estrutura interna em forma de estrela (Slots, Genco, 1984). Em isolamento primário, todas as colônias apresentam-se convexas, ligeiramente irregulares e com diâmetro de um mm, característico da espécie (Fives-Taylor et al, 1999). O gênero *Actinobacillus* é constituído de onze espécies conhecidas atualmente e é membro da família Pasteurellaceae (Zambon, 1985).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans depende de inúmeros fatores para se estabelecer nos tecidos bucais tais como: mecanismos que permitam sua adesão, interação com a microbiota residente e alguns fatores do hospedeiro. A cavidade bucal possui uma anatomia que gera ambientes distintos supra e subgengivais com diferentes pH, potencial de oxidação-redução e disponibilidade de nutrientes. Além disso a mastigação, os hábitos alimentares e os componentes salivares atuam de forma diferente quando se considera um e outro ambiente, selecionando o crescimento bacteriano (Fives-Taylor et al, 1999). A virulência de um microrganismo trata-se da habilidade deste em causar uma infecção. A virulência microbiana inclui vários itens como penetração no hospedeiro, encontro de um nicho ecológico único, escape das defesas do hospedeiro, reprodução e mecanismos patogênicos próprios (Slots, Genco, 1984).

As bactérias Gram-negativas apresentam apêndices filamentosos chamados pili ou fímbrias, relacionados à capacidade de adesão nos tecidos. Estas estruturas parecem ser responsáveis pela adesão do *A. actinomycetemcomitans* à hidroxiapatita do esmalte.

Em outro estudo, foi encontrado *A. actinomycetemcomitans* em frequência semelhante tanto em condições de periodontite quanto de periimplantite (CORTELLI et al. 2013). Zhuang et al (2014) demonstrou que o nível de infecção em tecidos peri-implantares saudáveis é menor do que nos casos de peri-implantite, revelando a importância do controle microbiano para o reestabelecimento da saúde peri-implantar.

Estudo feito por Augthun M, Conrads G. (1997) teve por objetivo examinar o tecido inflamatório de bolsas ósseas profundas de áreas com periimplantite (> 5 mm) para a colonização de bactérias anaeróbias. Foi examinado o tecido inflamatório de defeitos ósseos de 12 pacientes desdentados, com 18 implantes mal sucedidas (tipo IMZ); os quais foram removidos. Foram encontradas as seguintes bactérias dominantes: espécies da família Bacteroidaceae (*Prevotella intermedia*, *Prevotella buccae*, *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella denticola*); *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; *Fusobacterium nucleatum*; *Capnocytophaga* spp; e *Eikenella corrodens*. Bacteroidaceae e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foram encontrados com bastante frequência. Já em outro estudo foram encontradas espécies de *Fusobacterium* e *Prevotella* nos estágios iniciais da doença, enquanto uma maior diversidade de espécies estava presente durante os estágios mais avançados da doença. (Al-Radha AS, Pal A, Pettemerides AP, Jenkinson HF, 2012).

Deve-se diagnosticar as doenças peri-implantares o mais cedo possível. As principais características são vermelhidão e edema dos tecidos moles, porém o sangramento à sondagem é considerado também um fator importante. Já na peri-implantite, além das características descritas acima, pode ocorrer bolsas profundas e supuração, sempre acompanhadas de perda marginal do tecido ósseo de suporte. Para um correto diagnóstico da peri-implantite, a sondagem deve ser realizada com pouca pressão para não causar danos aos tecidos peri-implantares. O sangramento à sondagem indica a presença de inflamação dos tecidos e deve ser considerado como um fator importante na perda de suporte. Além da profundidade de sondagem aumentada, deve-se realizar radiografias a fim associar a condição encontrada clinicamente com as análises radiográficas, que porventura mostrem presença de perda óssea ao redor dos implantes, fechando assim o diagnóstico (Lindhe; Meyle,

2008). Além de uma higiene oral inadequada e a presença de sangramento gengival, a falta de altura suficiente de mucosa queratinizada (<2 mm) e do osso no nível do implante também foram associados à maior incidência de periimplantite (Canullo L., 2015).

A prevalência da peri-implantite é maior em pacientes com histórico de doença periodontal (KONSTANTINIDIS et al, 2015). A peri-implantite afeta uma porcentagem significativa de pacientes, e é dependente de alguns fatores como a predisposição do paciente, e o tempo de função do implante, afetando de em até 47% dos implantes segundo Derks e Tomasi (2015).

2.2 Tratamento da peri-implantite

O objetivo do tratamento das doenças peri-implantares é a redução e eliminação da inflamação tecidual, resultando assim na preservação e/ou regeneração do tecido ósseo de suporte que foi perdido. O sucesso do tratamento da peri-implantite é dependente do tratamento da superfície do implante, com o objetivo de remover os microrganismos e seus subprodutos, a fim de tornar a superfície biocompatível. Dessa forma, pode-se obter uma superfície colonizável por células ósseas e gengivais, propiciando a neoformação óssea e que ocorra regeneração óssea bem sucedida (MOMBELLI, 2002).

O tratamento da peri-implante deve incluir medidas de descontaminação (LINDHE, MEYLE, 2008). Diversos protocolos são sugeridos para o tratamento da peri-implantite. Esses podem ser divididos em cirúrgicos e não cirúrgicos, entretanto intervenções não cirúrgicas não se mostram eficientes para a resolução das peri-implantites (RENVERT et al., 2008). Segundo Renvert et al. (2008) os tratamentos não cirúrgicos das doenças peri-implantares podem ser eficazes no tratamento da mucosite peri-implantar e que o uso concomitante de enxaguatórios antimicrobianos auxiliam no tratamento da mucosite. Esse tratamento já não tem a mesma eficácia para o tratamento da peri-implantite. Os tratamentos cirúrgicos com a exposição do defeito e posterior tratamento da superfície do implante é a forma de se proporcionar um tratamento mais eficaz e previsível. (Heitz-Mayfield LJA, Lang NP, 2004)

De acordo com Quirynen M, et al. (2005) o tratamento da periimplantite envolve a redução/ eliminação da implanto/periopatogênese. Após a terapia periodontal, espécies benéficas e patogênicas recolonizam a área subgengival. Este estudo prospectivo de boca dividida selecionou quatro amostras de placa subgengival de bolsas rasas e médias ao redor de implantes (test) e dos dentes vizinhos (como referência) 1, 2 e 4 semanas após a conexão do pilar. A análise destes dados demonstrou que, mesmo com o ambiente supragengival sendo a única fonte para as bactérias colonizarem, uma microbiota complexa subgengival pode desenvolver-se dentro de 1 semana.

O sucesso do tratamento está diretamente relacionado à superfície dos implantes (Albouy et al., 2012). Foi observado que implantes com superfície rugosa apresentam frequentemente maior taxa de re-osseointegração quando comparados aos de superfícies lisas usinadas (PERSSON et al., 2001; HERR et al., 2007). No entanto, superfícies rugosas apresentaram maior facilidade para a formação do biofilme (HERR et al., 2007), o que as torna tecnicamente áreas de difícil descontaminação, (TEUGHELS et al., 2006) quando comparadas com superfícies mais lisas (DENNISON et al., 1994). Segundo Renvert, Polyzois e Claffey (2008) não há evidências científicas de que as características de superfícies dos implantes influenciem no desenvolvimento da peri-implantite. Todavia sem a descontaminação da superfície do implante, não há êxito nas técnicas regenerativas, e diferentes métodos de descontaminação dessas superfícies tem sido estudados.

Apesar dos tratamentos facilitarem a osseointegração e possibilitarem o sucesso do tratamento da peri-implantite, superfícies de implantes descontaminadas com ácido não tem a mesma estrutura que a superfície tinha inicialmente, podendo alterar o processo de diferenciação celular, bem como a adesão das células, e consequentemente a osseointegração, podendo não propiciar as respostas teciduais desejadas (TEUGHELS et al., 2006).

2.2.1 Descontaminação da superfície dos implantes de titânio

O processo de descontaminação da superfície dos implantes de titânio é importante para o sucesso do tratamento das peri-implantites (PARLAR et al., 2009).

Os diversos métodos de descontaminação podem ser classificados em dois grupos principais: químico e físico. Os métodos físicos de descontaminação podem ser subdivididos em descontaminação mecânica ou a laser (MELLADO-VALERO, et al., 2013). Subramani, Wismeijer, (2012) afirmaram que ambos os métodos de contaminação, mecânicos ou químicos, devem ser aplicados ao lado de procedimentos cirúrgicos regenerativos para se obter melhor reosseointegração e tratar com sucesso peri-implantite.

Segundo Mellado-Valero et al (2013) a terapia fotodinâmica, deve receber uma abordagem especial uma vez que combina agentes químicos sensíveis à luz com os lasers usados para promover a sua ação antimicrobiana.

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica que utiliza uma substância de fotossensibilização que se fixa às bactérias do biofilme, e quando irradiado com laser, é capaz de destruir as células bacterianas. O uso de PDT e lasers tem gerado muito interesse devido ao seu potencial para a descontaminação de superfícies de implantes no tratamento da periimplantite (MELLADO-VALERO, et al., 2013).

A realização do PDT possibilita a realização de fotossensibilização que é letal para as bactérias, mas não danifica a superfície do implante e tem se mostrado mais eficiente para eliminar as bactérias de superfícies de implantes do que a irradiação a laser sozinha (ROMANOS, et al., 2009).

As alterações de temperatura na interface osso-implante durante uma simulação de descontaminação da superfície do implante com laser Er:YAG foram investigadas, utilizando implantes com três superfícies diferentes (titânio pulverizado com plasma, titânio jateado e com ácido, e implante revestido com hidroxiapatita). Segundo os autores a temperatura na interface implante-osso não excedeu 47°C após 120 segundos de continua irradiação do laser, sendo que os aumentos mais significativos ocorreram nos implantes revestidos com hidroxiapatita. Essa técnica se mostrou clinicamente segura, pelo menos, quando utilizada com as superfícies estudadas (KREISLER; AL HAJ; D'HOEDT, 2002).

Marotti et al (2013) compararam a eficácia da descontaminação entre quatro abordagens (G1: sem descontaminação; G2: descontaminação usando clorexidina; G3: PDT = laser + corante azul de metileno; G4: laser sozinha). Sendo que os

melhores resultados foram alcançados por G2 e G3, sem diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos.

Além de promover a limpeza e desinfecção da superfície do implante é importante que a superfície dos implantes tratados pela terapia, em longo prazo não permita ou minimize a possibilidade de recolonização. Duarte et al. (2009) avaliou a capacidade de adesão do *S. sanguinis* após o tratamento de superfícies de titânio lisas ou ásperas tratadas com laser érbio:ítrio (Er:YAG), curetas de metal ou plástico ou com um jato de ar/pó abrasivo. As análises em MEV mostraram que as superfícies rugosas não sofreram alterações significativas de rugosidade, enquanto as superfícies lisas foram mais afetadas quando do uso de curetas de metal. Os autores concluíram que as superfícies ásperas quando tratadas com curetas de metal e jato abrasivo de ar/pó apresentaram o menor nível de adesão de bactérias provavelmente devido à redução da rugosidade, já nas superfícies lisas as curetas de metal não foram recomendadas devido à grave alteração da textura.

A remoção mecânica do biofilme da superfície do implante é realizada principalmente com o uso de curetas, jatos de ar/pó, água/pó e até mesmo a implantoplastia, isto é, a eliminação mecânica de rugosidade da superfície em conjunto com a rosca do implante. Segundo Romeo et al. (2005, 2007) esta técnica facilitou a higiene oral do paciente quando as roscas do implante estavam expostas. Em estudo de 3 anos de acompanhamento, a técnica propiciou taxa de 100% de sobrevivência do implante, com melhorias nos parâmetros clínicos e radiológicos em comparação com aqueles não submetidos a implantoplastia.

Fox, Moriarty e Kusy (1990) avaliaram as alterações de rugosidade de superfície de implantes de titânio puro que tratados por meio de raspagem com curetas de titânio, de aço inoxidável e de plástico. Foi observada maior rugosidade em superfícies tratadas por curetas de metais em comparação com superfícies não tratadas ou tratadas com cureta de plástico, sendo que estas não produziram alterações de superfície.

O efeito de procedimentos específicos de limpeza na superfície de implantes foi avaliado por Augthun, Tinschert e Huber em 1998 por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizadas curetas de plástico, cureta de metal,

dispositivo de lapidação de diamantes, removedor de tártaro, spray de pó-ar-água com uma solução de hidrocarboneto de sódio, e clorexidina 0,1%. Este estudo mostrou que o spray de pó-ar-água, a lavagem com clorexidina, e a curetagem com um instrumento de plástico causou pouco ou nenhum dano na superfície, entretanto para implantes revestidos com hidroxiapatita nenhum dos métodos deixou a superfície ileso. Em uma segunda fase implantes revestidos com hidroxiapatita foram retirados e a análise revelou que apenas a pulverização hidrocbonato de sódio propiciou um implante limpo sem danos a sua superfície. E em uma terceira fase, o crescimento de fibroblastos de nas superfícies foi examinado após a limpeza da superfície com curetas de plástico e o sistema de ar abrasivo, que propiciou uma maior quantidade de células vitais.

Louropoulou et al (2012) realizaram uma revisão sistemática sobre os efeitos de diferentes instrumentos nas características superficiais de implantes lisos ou rugosos. A maioria dos estudos eleitos utilizaram o MEV para avaliação. Brocas foram os instrumentos de escolha para a regularização em implantes com superfície rugosa, e os instrumentos de plástico foram vistos como os que não alteravam as superfícies, enquanto os de metal foram os que causaram grandes danos em superfícies lisas.

Pereira da Silva (2005) investigaram a eficácia de um protocolo para a descontaminação bacteriana em superfícies de titânio com três níveis diferentes de rugosidade, utilizando um dispositivo de bicarbonato de sódio de alta pressão, durante 1 minuto sob condições assépticas. As superfícies receberam uma colonização *in vitro* com *Streptococcus sanguis* e após a colonização foram tratadas. Após a aplicação do protocolo de descontaminação, não se detectaram bactérias viáveis. Com o aumento da superfície de rugosidade, foi observado um aumento exponencial em células bacterianas. Os resultados demonstraram que o protocolo de tratamento com um dispositivo de descontaminação de bicarbonato de sódio de alta pressão remove eficientemente todas as células bacterianas em todas as superfícies testadas.

A descontaminação química envolve o uso localizada de soluções anti-microbianas tais como clorexidina tópica, tetraciclina ou minociclina, ácido cítrico, peróxido de hidrogénio, ácido fosfórico a 35%, entre outros (SUBRAMANI,

WISMEIJER, 2012). As comparações de descontaminação a eficácia desses agentes químicos têm sido feito principalmente por meio de estudos *in vitro* sobre diferentes tipos de superfície do implante (MELLADO-VALERO et al., 2013).

Herr (2007) examinou se o tratamento químico com solução de Tetraciclina altera as microestruturas de superfícies modificadas de implantes dentários. Para tal avaliou superfícies de titânio, jateados com areia, condicionadas com ácido e superfície anodizada. Os espécimes foram então processadas rotineiramente para microscopia eletrônica de varredura e as análises mostraram que o tratamento realizado não alterou as características superficiais desses implantes.

Claffey et al. (2008) realizou uma revisão de literatura e em um total de 43 estudos experimentais e clínicos (13 deles realizados em seres humanos), que avaliaram diferentes protocolos de descontaminação usando solução salina estéril, clorexidina, ácido cítrico e o peróxido de hidrogênio, não conseguiram demonstrar que qualquer um método era mais eficaz do que os outros. Gosau et al (2010) avaliaram a eficácia de seis agentes antimicrobianos (hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio a 3%, 0,2% clorexidina, colgate Plax, Listerine, ácido cítrico a 40%) na descontaminação de implantes de titânio. Todos os anti-sépticos se mostraram capazes de reduzir a quantidade total de microrganismos que se acumulam em superfícies de titânio. Além disso, o hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, clorexidina, e Listerine mostrou um maior potencial bactericida.

Schwarz et al. (2011) compararam dois métodos desbridamento/descontaminação de superfície. Vinte e quatro pacientes foram avaliados por 2 anos após a cirurgia. Os tratamentos utilizados foram a terapia a laser com Er: YAG ou curetas de plástico + bolinhas de algodão + solução salina estéril. Esses procedimentos foram seguidos de uma técnica regenerativa utilizando osso particulado e membrana de colágeno. Os tratamentos não diferiram entre si nos parâmetros analisados, mostrando que a estabilidade a longo prazo dos resultados clínicos obtidos pode ser influenciada por outros fatores que não o método de desbridamento/descontaminação.

Gustumhaugen et al (2014) compararam o efeito da combinação química e mecânica na descontaminação de superfícies inoculadas com *Staphylococcus*

epidermidis, em comparação com o efeito químico sozinho. Para o tratamento os espécimes foram caracterizados com relação a rugosidade. O TiBrush foi utilizado como método mecânico, enquanto como métodos químicos foram utilizados NaCl (0,9 vol.%), EDTA (12% vol.), H₂O₂ (3 vol.%) + TiO₂ ou H₂O₂. os melhores resultados com relação a dissolução do biofilme foi encontrado com a combinação do método mecânico com o H₂O₂.

Waal et al. (2015) avaliaram clinicamente, radiograficamente, e os efeitos microbiológicos da descontaminação de superfícies de implantes com 2% de clorexidina, em comparação com 0,12% de clorexidina + 0,05% de cloreto de cetilpiridínio (CPC solução). A análise multinível não apresentaram diferenças significativas em sangramento, supuração, profundidade de sondagem e perda óssea radiográfica entre o controle e grupo de teste de três medições de acompanhamento (3, 6 e 12 meses) a partir da baseline. Ambos os descontaminação procedimentos resultaram em reduções significativas na contagem de bactérias anaeróbicas no implante superfície. Os autores observaram que no geral, o uso adicional de clorexidina reduz a carga bacteriana anaeróbia na superfície do implante, mas não parece aumentar os resultados clínicos.

2.3 Condicionamento ácido das superfícies de implantes: bases científicas

A possibilidade de ocorrer formação de novo tecido ósseo ao redor de implantes que tiveram a sua superfície previamente contaminada foi avaliada por Jovanovic (1993). Para o estudo foram instalados 30 implantes em cães e após o período de osseointegração provocou-se o acúmulo de placa durante um período de 3 meses, que resultaram na formação de defeitos ósseos circunferenciais. Os defeitos ósseos foram debridados e a superfície de cada implante foi tratada com jato de ar abrasivo e a descontaminação feita com solução supersaturada de ácido cítrico por 30 segundos. Os defeitos foram cobertos com membranas não reabsorvíveis de PTFE-e. Os resultados dos cortes histológicos após dois meses mostraram que ocorreu a formação de tecido ósseo ao redor dos implantes de forma organizada, mostrando que existe possibilidade de ocorrer a re-osseointegração na superfície de implantes previamente contaminados.

Dennison et al (1994) avaliaram a relação entre o tratamento de superfície dos implantes e os protocolos de descontaminação. Os implantes utilizados no estudo usinados, pulverizados com plasma de titânio ou revestidos com hidroxiapatita. Os implantes foram revestidos com Endotoxina radioactivo (125I-LPS). Os implantes foram tratados com uma bolinha de algodão embebido em água, solução de ácido cítrico (CA), ou 0,12% de clorexidina, ou com um jato abrasivo pó/água/ar. Na avaliação de tratamento modalidades, verificou-se que os implantes usinados foram mais fáceis de limpar do que as demais superfícies por todos os tratamentos, com exceção do ácido cítrico que foi igualmente eficaz em ambos as superfícies.

Hanisch et al. (1997) avaliaram a formação de novo tecido ósseo e reosseointegração em implantes instalados na região de pré-molares superiores e inferiores de macacos. Após um ano da instalação dos implantes, que permaneceram sobre controle, foram colocadas ligaduras de algodão ao redor dos cicatrizadores para permitir o acúmulo de placa durante o período de 11 meses. Passado o período de acúmulo microbiano obteve-se grandes defeitos horizontais infra-ósseos. Para o tratamento dos defeitos foram realizados procedimentos cirúrgicos onde após o rebatimento dos retalhos os defeitos foram debridados com curetas de aço e as superfícies dos implantes foram tratadas com jato de ar abrasivo e descontaminadas com solução supersaturada de ácido cítrico. Na tentativa de regeneração utilizou-se no lado teste proteína óssea morfogenética humana recombinante-2 (rhBMP-2) e após o período de controle verificaram que ocorreu formação óssea e a re-osseointegração em ambos os lados, porém na área onde houve a utilização do enxerto de rhBMP-2 essa formação foi maior.

Mouhyi et al. (1998) avaliaram a descontaminação de implantes contaminados utilizando 6 métodos diferentes: lavagem com álcool absoluto por 10 minutos; limpeza em banho ultrassônico com tricloroetileno e álcool absoluto por 10 minutos em cada solução; jato de ar abrasivo; limpeza com solução supersaturada de ácido cítrico por 30 segundos; laser de CO₂ em condições secas por 10 segundos e laser CO₂ por 10 segundos com solução salina. Após análise por microscopia eletrônica de varredura e raio-x espectroscopia induzida por fotoelétrons, observaram que o tratamento com ácido cítrico e o tratamento com

banho ultrassônico com tricloroetileno e álcool absoluto por 10 minutos em cada solução mostraram melhores resultados em relação à aparência macroscópica e a composição superficial. Entretanto, comparando-se os implantes tratados aos implantes sem contaminação, os resultados não foram satisfatórios.

Mouhyi (2000) avaliaram em ratos a resposta de diversos protocolos de limpeza (ácido cítrico, água estéril, Peróxido de hidrogênio, e laser de CO₂ sozinho ou com uma combinação destes). Depois de limpar os parafusos contaminados, estes foram implantados nas paredes abdominais de ratos. Partido dos resultados histológicos pode-se concluir que o laser de CO₂ utilizado sozinho ou em combinação com o peróxido de hidrogênio pode ser utilizado clinicamente para a descontaminação suficiente de superfície de titânio.

Lubin J. e colaboradores (2014), em um estudo em oitenta e oito discos de implantes de titânio, foram inoculados com *Porphyromonas gingivalis*. As superfícies dos implantes foram desinfetados com EDTA, tetraciclina e ácido cítrico. Os discos de implantes foram então colocados em culturas de células osteoblásticas. O ácido cítrico e tetraciclina foram mais eficazes para a desinfecção dos discos de implantes.

Kolonidis e colaboradores (2003), em um estudo realizado em cães, verificou a possibilidade de ocorrer osseointegração em uma superfície que foi previamente contaminada com placa. Os 8 pré-molares inferiores foram extraídos e após um período de cicatrização de 3 meses foram instalados 3 implantes de cada lado, porém no lado controle, os implantes foram parcialmente inseridos a fim de que ocorresse a contaminação por placa das roscas dos implantes. Passadas 5 semanas, foram realizados 3 tratamentos: com ácido cítrico; com escova de dentes com soro fisiológico e, por último, tratamento com peróxido de hidrogênio 10%. Os implantes foram instalados no lado contralateral juntamente com um implante não contaminado, utilizado para controle. Após o período de cicatrização de 11 semanas foram feitas biópsias dos implantes. Observou-se que ocorreu osseointegração nas áreas anteriormente contaminadas, demonstrando que pode ocorrer osseointegração nestas regiões, independente do tratamento. Outros estudos têm observado a osseointegração após o tratamento com ácido cítrico mostrando uma boa biocompatibilidade, bem como eficiência na desinfecção de sítios contaminados possibilitando a adesão de celular (UNGVÁRI et al.; 2010) e a osseointegração

(ALHAG et al., 2008). Novos ácidos vêm surgindo como alternativas ao ácido cítrico, mas até o momento atual, com a falta de estudos, o ácido cítrico vem sendo utilizado como padrão ouro como agente químico com o maior potencial para a remoção de biofilmes de implantes contaminados *in vitro*, apesar de não conseguir a remoção completa (NTROUKA et al., 2011).

Com o objetivo de comparar as propriedades de limpeza mecânica com utilização de curetas de carbono e polimento com taça de borracha com a descontaminação com gel de ácido fosfórico para o tratamento de doenças periimplantares, a equipe de Strooker (1998) avaliaram em 16 pacientes totalmente edêntulos, sendo que na mandíbula possuíam overdentures. No lado teste foi aplicado gel de ácido fosfórico 35% durante o período de 1 minuto diretamente no sulco periimplantar, em seguida foi completamente lavado com spray de água por um período de 15 segundos. No lado controle, foi realizado debridamento supra e subgingival com curetas de carbono e polimento com taça de borracha. Após o período de 5 meses foram observados parâmetros clínicos, nos quais foi possível notar que ocorreu diminuição na média do índice gengival e profundidade de sondagem média no período. A redução do índice gengival foi maior no lado teste, o que levou os autores a concluírem que a aplicação local de gel de ácido fosfórico a 35% pode ser tão eficaz quanto a terapia de suporte mecânico convencional.

A utilização de ácido fosfórico a 35% para o tratamento de mucosite periimplante parece conseguir a redução microbiana; mas outros estudos, tanto *in vitro* e em seres humanos afirmam que são necessários mais trabalhos para comprovar sua eficácia para a descontaminação de superfícies de implantes (SUBRAMANI, WISMEIJER, 2012).

Sculean et al (2004) relataram casos clínicos de 3 pacientes (um do sexo feminino e dois do sexo masculino) com diagnóstico tardio de periimplantite, que apresentaram defeitos profundo e foram tratados com uma abordagem cirúrgica, com o desbridamento e a descontaminação do implante com EDTA. Um ano após a terapia uma redução substancial da profundidade de sondagem e um ganho significativo de nível de inserção clínica, além do preenchimento radiográfico do defeito foram observados em todos os três casos. Os resultados obtidos foram mantidas a um nível estável para todos os 3 pacientes ao longo de 4 anos. Os

resultados indicam que o EDTA tem potencial para ser utilizado na descontaminação de superfícies de implantes.

Em um trabalho recente, Roccuzzo et al. (2011) realizaram o tratamento cirúrgico da peri-implantite com debridamento do defeito e o tratamento químico da superfície do implante com gel de EDTA 24% e gel de Clorexidina a 1%. Em seguida, o defeito foi preenchido com osso bovino liofilizado e o retalho suturado. Após o acompanhamento de 1 ano, ocorreu melhora clínica e radiográfica em relação à profundidade de sondagem, ocorreu também uma diminuição de 3,4mm em média e, em 3 implantes, ocorreu o completo preenchimento do defeito. O sangramento à sondagem diminuiu de 75,0% dos sítios para 14,6%. A utilização do procedimento de 2 passos (EDTA e Clorexidina) o qual foi empregado neste artigo foi descrita pela primeira vez e mostrou bons resultados, porém para avaliar a real eficácia desta técnica são necessários mais estudos, apesar da mesma ter se mostrado eficaz no tratamento da peri-implantite.

Microorganismos que crescem em um biofilme periimplantar são altamente resistentes aos agentes antimicrobianos por um ou mais mecanismos. Embora evidência epidemiológica aponte para os biofilmes como fonte de várias doenças infecciosas, os mecanismos exatos pelos quais os microrganismos associados a biofilmes provocam doença são mal compreendidos. Estratégias eficazes para prevenir ou controlar o biofilme devem ter em consideração a natureza única e tenaz de biofilmes. Estratégias de intervenção atuais são projetados para prevenir a colonização inicial, minimizar a fixação celular microbiana, penetrar na matriz do biofilme e matar as células associadas. No futuro, os tratamentos podem ser baseada na inibição de genes envolvidos na ligação e formação de biofilmes (Donlan RM, Costerton JW., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos primários deste estudo são:

- Analisar a efetividade da remoção de bactérias aderidas às superfícies de titânio por diferentes agentes químicos condicionantes, por meio de análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os objetivos secundários deste estudo são:

- Determinar qual das soluções promove melhor descontaminação de superfície (redução ou eliminação das colônias bacterianas);
 - Determinar o melhor tempo de aplicação das diferentes substâncias, dentre dois investigados, para alcançar o maior grau de descontaminação da superfície do implante;
 - Investigar se os tratamentos químicos realizados para descontaminação da superfície dos implantes promovem alterações nas características de superfície dos implantes.
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo piloto

Inicialmente foi realizado um estudo piloto na University of Southern California, sob supervisão do Prof. Dr. Homma Zadeh, seguindo uma das linhas de pesquisa realizada nesta instituição. Foram doados 7 parafusos de recobrimento de implantes, os quais foram submetidos à cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), seguido de fixação e posterior preparo para análise em MEV, conforme posteriormente descrito. Após a obtenção das fotomicrografias foi realizado uma análise visual e feito o delineamento da pesquisa, como: método de preparo da superfície de titânio, seleção dos agentes descontaminantes que seriam utilizados e métodos de avaliação das imagens.

Figura 1: Sequência das etapas da metodologia que foi efetuada

4.2 Obtenção e preparo dos corpos de prova

Foram doados pelo departamento de Prótese, disciplina de Periodontia, 70 parafusos de recobrimento de implantes (Titanium Fix, São José dos Campos, São Paulo, Brasil), compostos por titânio comercialmente puro grau IV, de plataforma regular e conexão do tipo hexágono externo. Para determinar as características de

superfície dos parafusos de recobrimento previamente ao preparo para cultivo de bactérias, foram obtidas fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura em microscópio JEOL JSM-6610 (Los Angeles, Califórnia, Estados Unidos).

As superfícies dos parafusos de recobrimento foram preparadas para cultivo bacteriano por meio da confecção de canaletas superficiais com broca diamantada em alta rotação, provocando ranhuras superficiais, aumentando as áreas de retenção bacteriana (Bollen et al. 1996). Posteriormente, os parafusos de recobrimento foram submetidos a tratamento com jato de óxido de alumínio (Microjato, BioArt, São Carlos, São Paulo, Brasil) e tratamento com ácido clorídrico (USIQUÍMICA DO BRASIL LTDA, Osasco, São Paulo, Brasil), pH 3, a 80°C, durante 20 minutos (Freire et al. 2011). Em seguida, os espécimes foram lavados com água destilada por 1 minuto e esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Previamente à contaminação dos espécimes com bactérias, foram obtidas fotomicrografias de MEV para caracterização da rugosidade de superfície.

4.3 Caracterização da rugosidade de superfície dos corpos de prova antes e após o preparo inicial das amostras

Foram selecionadas 7 amostras aleatórias para avaliar as características de rugosidade superficial antes e depois do preparo mecânico e químico dos corpos de prova. Para tanto, foram obtidas fotomicrografias de MEV (JEOL JSM-6610), no laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP de todas as amostras. Foi obtida de cada corpo de prova uma imagem em aumento de 50 vezes (1000µm), da área central, antes e depois do preparo da superfície, com o objetivo de permitir a observação da maior área do corpo de prova sem expor margens externa (100% da área evidenciando a superfície de titânio). As imagens foram analisadas quanto aos parâmetros de rugosidade superficial por meio do *software* ImageJ (NIH, USA), disponível para *download* no endereço: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>. O *plugin* utilizado para análise das imagens foi o ‘Roughness Calculation’ ou ‘Cálculo de Rugosidade’, disponível para *download* no mesmo *site* (Figura 2). O *plugin* permite a avaliação dos parâmetros de rugosidade: Ra (desvio médio aritmético), Rq (desvio da raiz quadrada média), Rsk (assimetria),

Rkv (achatamento do perfil), Rv (vale mais baixo), Rp (pico mais alto) e Rt (altura total do perfil). Os resultados obtidos foram analisados comparativamente entre os grupos (pré e pós-tratamento) por meio do teste t pareado, com nível de significância de 5%.

Figura 2: Ilustração do software de análise de imagens ImageJ, utilizado para determinação bidimensional dos parâmetros de rugosidade superficial por meio do *plugin* 'Roughness calculation'

Para padronizar a área e tamanho da linha utilizada para descrição dos parâmetros de rugosidade, foi criada uma escala de linhas horizontais e verticais (*Plugins> Analyse> Grid*) com 0.15 inches em cada área. A segunda linha vertical completa foi delimitada de forma a não atingir a região central do parafuso de titânio. Sobre esta, foi desenhada outra linha para delimitação da área superficial a ser examinada, utilizando, a seguir, a função "plot profile" para aquisição do gráfico (Figura 3). Foram obtidos 7 gráficos pré- e pós-tratamento, os quais foram analisados descritivamente.

Figura 3: Análise do perfil de superfície das amostras antes e depois do tratamento físico-químico no *plugin* 'Plot Surface' do software de análise de imagens ImageJ, NIH

A plotagem tridimensional das superfícies foi realizada no programa ImageJ. Para adquirir estes gráficos foi utilizado o *plugin* "Iterative 3D surface Plot". Para padronização, para todas as imagens dos gráficos foram dadas as mesmas coordenadas (Figura 4).

- ✓ Tamanho da tela (grid size): 128
- ✓ Suavizamento (Smoothing): 2,5
- ✓ Perspectiva (Perspective): 0,0
- ✓ Iluminação (Lighting): 0,5
- ✓ Escala (Scale): 1,0
- ✓ Escala z (z-Scale): 0,58
- ✓ Máximo (Max): 100%
- ✓ Mínimo (Min): 0%

Figura 4: Ilustração de *plugin* 'Interactive 3D Surface Plot', utilizado para obtenção dos gráficos de plotagem das características de rugosidade superficial das amostras antes e depois do preparo físico-químico

4.4 Contaminação bacteriana das superfícies de implantes

4.4.1 Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A cepa de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 foi gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, da disciplina de Patologia, departamento de Estomatologia, da FOB-USP, e manipulada nas dependências do Centro Integrado de Pesquisas (CIP), da FOB – USP, com auxílio do técnico Marcelo Milanda.

Um volume de 20 uL da solução estoque (previamente preservada a -80°C) de *A. actinomycetemcomitans* foi transferido para uma placa de ágar BHI e incubada em estufa a 36°C por 2 dias. Após esse período, uma colônia de bactérias foi removida da placa com auxílio de alça de platina e colocada em tubo com 5mL do meio de cultura caldo BHI (*Brain Heart Infusion Agar*, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA). O tubo foi incubado em ambiente de microaerofilia com aproximadamente 5 - 10% de CO₂, em estufa a 37°C por 3 a 4 dias.

4.4.2 Inoculação dos corpos de prova

Após 4 dias de crescimento bacteriano, o tubo foi centrifugado a 2.000rpm durante 10 minutos. O meio foi desprezado, mantendo o 'pellet' no fundo do tubo. Foi adicionado ao tubo 5ml de PBS, o qual foi posicionado em vórtex para homogeneização. A centrifugação foi repetida nas mesmas condições, desprezando-se o PBS com auxílio de ponteira e preservando-se o 'pellet'. A lavagem foi repetida 2 vezes. Após a última lavagem, foi acrescentado 5ml de PBS para homogeneização em vórtex e posterior padronização da quantidade de inóculo.

A partir dessa suspensão bacteriana em tampão fosfato (PBS), foi realizada a leitura em espectrofotômetro (DU 730, Beckman Coulter, Germany) a 580 nm. A turbidez do inóculo foi comparada com o padrão 0,5 da escala de MacFarland. Essa turvação é semelhante àquela padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 1990; NCCLS, 2002). Como *blank* (controle negativo), foi utilizado o PBS.

Com o resultado da leitura da escala 0,5 de MacFarland e da suspensão bacteriana, o crescimento bacteriano foi quantificado através de regra de três simples:

$$\begin{array}{lcl} \text{Absorbância da escala 0,5 de MacFarland} & \text{-----} & 1,5 \times 10^8 \text{UFC/ml} \\ \text{Absorbância da suspensão bacteriana} & \text{-----} & x \end{array}$$

A partir da determinação da concentração da suspensão bacteriana, a concentração foi ajustada em $1,5 \times 10^8$ UFC/ml para realização do experimento. Em seguida, os corpos de prova foram colocados em placa de cultura de células de 24 poços. A suspensão bacteriana foi colocada sobre os mesmos, com volume total de 2 ml da suspensão concentrada com bactérias. A placa contendo a suspensão bacteriana e os corpos de prova permaneceu incubada em estufa de microaerofilia (com 5% de CO₂) por 4 dias, antes da realização dos experimentos (Figuras 5).

Figura 5: Aspecto macroscópico das colônias de A.a. em ágar TSBV. Imagem cedida pela Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, da disciplina de Patologia, departamento de Estomatologia, da FOB-USP, e manipulada nas dependências do Centro Integrado de Pesquisas (CIP), da FOB – USP, com auxílio do técnico Marcelo Milanda.

4.5 Fixação das bactérias sobre a superfície dos corpos de prova

As bactérias presentes na superfície dos corpos de prova foram fixadas, seguindo protocolo criterioso (Freire et al. 2011), permitindo assim a posterior análise de superfície contaminada em MEV, conforme descrito a seguir:

1. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (3% de glutaraldeído e 2% paraformaldeído em 0,1M de tampão de Cacodilato) por 12 horas;
 2. Enxágue em 1M de tampão cacodilato por 10 minutos;
 3. Pós-fixação em 2M de tetróxido de ósmio por 2 horas;
 4. Enxágue em 1M de tampão cacodilato por 10 minutos;
 5. Lavagem delicada com água destilada por 10 minutos;
 6. Desidratação em soluções crescentes de álcool 50%, 70%, 85%, 95% por 10 minutos em cada solução;
-

7. Desidratação em solução de álcool 100% por 30 minutos, trocando o solvente a cada 10 minutos;
8. Submersão em solução de 50% de HMDS e 50% de Álcool por 10 minutos;
9. Submersão em solução de 75% de HMDS e 25% de Álcool por 10 minutos;
10. Submersão em solução de 85% de HMDS e 15% de Álcool por 10 minutos;
11. Submersão em solução de 95% de HMDS e 5% de Álcool por 10 minutos;
12. Secagem em temperatura ambiente por 12 horas.

Após a fixação, foram obtidas fotomicrografias de MEV para análise da quantidade de colônias de bactérias aderidas de todas as amostras. Foi obtida uma imagem de cada corpo de prova, em aumento de 50 vezes, da área central, antes e depois do preparo da superfície com o objetivo de permitir a observação da maior área do corpo de prova sem expor margens externas, permitindo a identificação das áreas colonizadas por bactérias (Figura 6). As imagens obtidas foram analisadas pelo *software* ImageJ para determinação da colonização bacteriana, conforme posteriormente descrito.

Figura 6: Imagem de MEV das colônias de *A. actinomycetencomitans* sobre a superfície de titânio [aumento de 1000 vezes; 50µm].

4.6 Descontaminação de superfície

Os corpos de prova contendo as colônias bacterianas fixadas (n= 70) foram aleatoriamente divididos em 7 grupos, de acordo com o tipo de tratamento químico realizado para descontaminação de superfície:

- EDTA90** – aplicação de solução de EDTA a 24% por 90 segundos (n=10);
- EDTA180** – aplicação de solução de EDTA a 24% por 180 segundos (n=10);
- AC90** – aplicação de solução de ácido cítrico pH 1.0 a 50% por 90 segundos (n=10);
- AC180** – aplicação de solução de ácido cítrico pH 1.0 a 50% por 180 segundos (n=10);
- AF90** – aplicação de solução de fosfórico pH 1.0 a 50% por 90 segundos (n=10);
- AF180** – aplicação de solução de fosfórico pH 1.0 a 50% por 180 segundos (n=10);
- Controle** – aplicação de soro fisiológico por 180 segundos (n=10).

O operador não tinha conhecimento do percentual de área contaminada em cada corpo de prova previamente à realização dos experimentos de descontaminação da superfície com os diferentes agentes químicos. A descontaminação das superfícies dos corpos de prova foi realizada por meio da aplicação passiva do agente químico selecionado pelos períodos de tempo determinados, seguido de lavagem com solução de soro fisiológico durante 60 segundos.

Após o tratamento, novas imagens de MEV foram obtidas da área central dos corpos de prova, conforme anteriormente descrito, para avaliação da descontaminação de superfície.

4.7 Avaliação da contaminação bacteriana das superfícies antes e depois do tratamento

As imagens de MEV obtidas antes (n= 70) e depois (n= 70) da aplicação das diferentes substâncias foram analisadas no programa de análise de imagens ImageJ.

Para isso, primeiramente, as imagens foram convertidas em 8 bits (Figura 7). Em seguida, foi utilizada a função '*threshold*' do programa, permitindo que, através da alteração de contraste, fosse possível distinguir as colônias de bactérias sobre a superfície de titânio. Além disso, pequenas alterações do que é dado pelo programa com relação as colônias podem ser realizado um refinamento deixando bem precisa a área contaminada (Figura 8).

Após a área contaminada delimitada (Figura 9), foi medido em porcentagem o quanto de superfície de titânio estava com colônias/ bactérias. Com este resultado pôde ser obtido a porcentagem de área contaminada e não contaminada (Figura 10).

Figura 7: Conversão da imagem para 8 bits para análise da contaminação bacteriana

Figura 8: Delimitação das colônias bacterianas através da função 'threshold' no programa ImageJ, NIH.

Figura 9: Delimitação das colônias bacterianas no software ImageJ.

Figura 10: Determinação do percentual de área contaminada/não contaminada, através do programa de análise de imagens ImageJ.

4.8 Caracterização da rugosidade de superfície dos corpos de prova antes e depois do tratamento químico das superfícies contaminadas

Para caracterização da rugosidade de superfície dos corpos de prova antes e depois do tratamento químico para descontaminação da superfície dos implantes, foram selecionadas aleatoriamente 7 amostras, sendo uma de cada grupo. Foram obtidas de cada corpo de prova imagens em aumento de 50 vezes (1000 μ m), da área central, antes (n=1) e depois (n= 1) do preparo da superfície, com o objetivo de permitir a observação da maior área do corpo de prova sem expor margens externa (100% da área evidenciando a superfície de titânio). As imagens foram analisadas quanto aos parâmetros de rugosidade superficial por meio do *software* ImageJ (NIH, USA), disponível para *download* no endereço: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

Para padronizar o tamanho da área utilizada para a descrição dos parâmetros de rugosidade, foi criada uma escala de linhas horizontais e verticais (*Plugins> Analyse> Grid*) com 0.15 inches em cada área (Figura11). Esse guia foi utilizado para demarcação da área de interesse, não apresentando bactérias, em cada amostra analisada (Figura 12).

Figura 11: Fotomicrografia após a descontaminação, com a grade de padronização da área do software de análise de imagens ImageJ, NIH

Figura 12: Seleção da área sem colonização bacteriana para análise exclusiva desta área pelo software de análise de imagens ImageJ, NIH

O *plugin* utilizado para análise das imagens foi o 'Roughness Calculation' ou 'Cálculo de Rugosidade', disponível para *download* no mesmo *site* (Figura 13). O *plugin* permite a avaliação dos parâmetros de rugosidade: Ra (desvio médio aritmético), Rq (desvio da raiz quadrada média), Rsk (assimetria), Rkv (achatamento do perfil), Rv (vale mais baixo), Rp (pico mais alto) e Rt (altura total do perfil). Os resultados obtidos foram analisados comparativamente entre os grupos "não contaminado" e "após descontaminação" por meio do teste t pareado, com nível de significância de 5%.

Figura 13: Análise da rugosidade da superfície selecionada após o tratamento químico pelo software de análise de imagens ImageJ, NIH

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente no *software* GraphPad Prism 6.0 para Mac, adotando-se em todos os testes o nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$).

As diferenças nos parâmetros de rugosidade superficial observados antes e depois do preparo dos corpos de prova para a contaminação bacteriana foram analisadas por meio do teste t pareado.

A análise quantitativa da presença de colônias bacterianas pré e pós-tratamento de descontaminação superficial nos diferentes grupos foi realizada por meio do teste pareado e não paramétrico de Wilcoxon.

A análise comparativa do grau de contaminação bacteriana observado antes e depois do tratamento entre os diferentes grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

As características de rugosidade superficial observadas após as diferentes formas de descontaminação das superfícies de titânio comparativamente aos parâmetros pré-tratamento foram analisadas por meio do teste ANOVA a dois critérios, pós-teste de Dunnett.

As características de rugosidade superficial observadas após a descontaminação de superfície foram comparadas entre os grupos por meio do teste ANOVA a dois critérios, pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da microtopografia de superfície

As características da microtopografia de superfície dos espécimes investigados foram investigadas em fotomicrografias de MEV obtidas antes (Figura 14) e depois (Figura 15) do preparo de superfície realizado para aumento da rugosidade superficial. As imagens obtidas foram analisadas no software ImageJ (NIH, EUA) através do *plugin* “Parâmetros de rugosidade. Os dados obtidos estão descritos nas Tabela 1 e 2.”

Figura 14: Fotomicrografia de parafuso de recobrimento previamente ao preparo para cultivo de bactérias. Em (A), observa-se a superfície do parafuso de recobrimento usinado em aumento de 30X. A área delimitada pelo quadrado identifica o local de obtenção da imagem ilustrada em (B), com aumento de 100X e em (C), com aumento de 500X. Nota-se uma superfície lisa, sem ranhuras e retenções.

Figura 15: Fotomicrografia de parafuso de recobrimento posteriormente ao preparo com broca diamantada, jateamento de óxido de alumínio e banho em HCL. Em (A), observa-se a superfície do parafuso de recobrimento modificado pelo tratamento físico e químico em aumento de 30X. A área delimitada pelo quadrado identifica o local de obtenção da imagem ilustrada em (B), com aumento de 100X e em (C), com aumento de 500X. Nota-se superfície mais rugosa, com aumento da rugosidade superficial.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as amostras antes e depois do tratamento para aumento das áreas de retenção dos corpos de prova nos parâmetros Rsk ($p=0.0002$; teste t pareado), Rkv ($p=0.0005$; teste t pareado), Rp ($p<0.0001$; teste t pareado), Rv ($p=0.0025$; teste t pareado) e Rt ($p=0.0004$; teste t pareado). Esses achados sugerem que o tratamento de superfície alterou a superfície do implante por subtração, resultando em depressões superficiais mais profundas, favorecendo a adesão e retenção bacteriana.

Tabela 1- Características de rugosidade de superfície (unidade) analisados no *plugin* parâmetros de rugosidade (ImageJ, NIH, EUA) **antes do preparo da superfície** [Comprimento da amostra: 100 μ m, nivelamento de superfície; medida em pixels]

	Ra	Rq	Rsk	Rkv	Rp	Rv	Rt
1	138,263	144,363	1,112	1,302	255,000	17,000	272,000
2	126,812	133,138	1,124	1,345	255,000	6,000	261,000
3	147,530	154,791	1,124	1,405	255,000	6,000	261,000
4	148,078	154,798	1,110	1,290	255,000	18,000	273,000
5	169,783	174,373	1,073	1,194	255,000	39,000	294,000
6	138,675	145,252	1,123	1,194	255,000	18,000	273,000
7	164,866	172,687	1,188	1,310	255,000	7,000	262,000
Média	147,7	154,2	1,122	1,29	255	15,86	270,9
(dp)	(15,22)	(15,11)	(0,03)	(0,07)	(0)	(11,68)	(11,68)

Tabela 2- Características de rugosidade de superfície (unidade) analisados no *plugin* parâmetros de rugosidade (ImageJ, NIH, EUA) **depois do preparo da superfície** [Comprimento da amostra: 100 μ m, nivelamento de superfície]

	Ra	Rq	Rsk	Rkv	Rp	Rv	Rt
1	144,568	145,581	1,019	1,050	190,000	48,000	238,000
2	159,092	159,844	1,012	1,030	175,000	58,000	233,000
3	149,050	150,268	1,022	1,057	175,000	52,000	227,000
4	148,663	149,852	1,021	1,053	177,000	46,000	221,000
5	148,027	149,701	1,028	1,071	175,000	44,000	219,000
6	147,346	149,058	1,029	1,075	173,000	34,000	209,000
7	143,174	145,401	1,040	1,103	163,000	46,000	221,000
Média	148,6	150,0	1,124	1,06	175,4	46,86	224,00
(dp)	(5,13)	(4,80)	(0,008)	(0,02)	(7,91)	(7,38)	(9,60)

Na Figura 16, são observadas as imagens em MEV do corpo de prova previamente (A) e posteriormente (B) ao tratamento para aumento das retenções superficiais. As imagens C e D mostram, respectivamente, a plotagem tridimensional da superfície antes e depois do tratamento de superfície, enquanto as imagens E e F representam, respectivamente, o perfil de superfície da amostra antes e depois do tratamento físico e químico.

Figura 16: Na imagem A (aumento de 50X e 1000um), nota-se superfície de titânio sem nenhum preparo prévio apresentando-se lisa e sem ranhuras. Na imagem B, a mesma superfície após o tratamento da superfície, notando-se diversas ranhuras e nítida rugosidade. Nas figuras C e D, observa-se a análise de plotagem tridimensional da superfície demonstrada nas figuras A e B, respectivamente. A Figura E representa o perfil bidimensional de superfície sem tratamento, enquanto que a Figura F representa a plotagem bidimensional do perfil de superfície após o tratamento [Amostra 1].

5.2 Descontaminação das superfícies de titânio com as diferentes soluções químicas

5.2.1 Análise Descritiva

5.2.1.1 EDTA90

A análise das fotomicrografias de MEV pré- e pós-tratamento demonstrou redução notável das áreas contaminadas por bactérias após a aplicação de gel de EDTA a 24% durante 90 segundos, conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17 – Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo EDTA90. Em (A), a imagem de MEV ilustra a presença de colônias de bactérias fixadas sobre a superfície antes da aplicação do agente químico [setas vermelhas]. Em (B), observa-se a fotomicrografia de MEV após preparo de contraste no *software* ImageJ evidenciando as áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (C), observa-se a fotomicrografia de MEV obtida após o tratamento químico, notando-se a presença de algumas áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (D), observa-se na fotomicrografia de MEV tratada para contraste a presença de colônias bacterianas remanescentes após o tratamento [setas vermelhas].

5.2.1.2 EDTA180

As fotomicrografias de MEV de superfícies tratadas por solução em gel de EDTA 24% por 180 segundos evidenciaram boa descontaminação de superfície, conforme observado na Figura 18.

Figura 18 – Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo EDTA180. EM (A), a imagem de MEV ilustra a presença de colônias de bactérias fixadas sobre a superfície antes da aplicação do agente químico [setas vermelhas]. Em (B), observa-se a fotomicrografia de MEV após preparo de contraste no *software* ImageJ evidenciando as áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (C), observa-se a fotomicrografia de MEV obtida após o tratamento químico, notando-se a presença de algumas áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (D), observa-se na fotomicrografia de MEV tratada para contraste a presença de colônias bacterianas remanescentes após o tratamento [setas vermelhas].

5.2.1.3 AC90

Neste grupo, as imagens (Figura 19) evidenciam diminuição do número de colônias sobre as superfícies dos corpos de prova, porém de forma menos expressiva do que observado nos espécimes tratados por EDTA, por 90 e 180 segundos.

Figura 19 – Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo AC90. EM (A), a imagem de MEV ilustra a presença de colônias de bactérias fixadas sobre a superfície antes da aplicação do agente químico [setas vermelhas]. Em (B), observa-se a fotomicrografia de MEV após preparo de contraste no *software* ImageJ evidenciando as áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (C), observa-se a fotomicrografia de MEV obtida após o tratamento químico, notando-se a presença de algumas áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (D), observa-se na fotomicrografia de MEV tratada para contraste a presença de colônias bacterianas remanescentes após o tratamento [setas vermelhas].

5.2.1.4 AC180

As imagens de MEV (Figura 20) dos espécimes tratados por ácido cítrico durante 180 segundos evidenciam maior descontaminação do que observado com o tratamento pela substância por 90 segundos, embora seja possível observar remanescentes bacterianos sobre as superfícies, especialmente nas áreas de maior retentividade.

Figura 20 – Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo **AC180**. EM (A), a imagem de MEV ilustra a presença de colônias de bactérias fixadas sobre a superfície antes da aplicação do agente químico [setas vermelhas]. Em (B), observa-se a fotomicrografia de MEV após preparo de contraste no *software* ImageJ evidenciando as áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (C), observa-se a fotomicrografia de MEV obtida após o tratamento químico, notando-se a presença de algumas áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (D), observa-se na fotomicrografia de MEV tratada para contraste a presença de colônias bacterianas remanescentes após o tratamento [setas vermelhas].

5.2.1.5 AF90

As imagens em MEV obtidas dos espécimes tratados por meio de ácido fosfórico durante 90 segundos demonstraram a presença de colônias bacterianas antes e depois da descontaminação com o agente químico (Figura 21).

Figura 21 – Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo AC90. EM (A), a imagem de MEV ilustra a presença de colônias de bactérias fixadas sobre a superfície antes da aplicação do agente químico [setas vermelhas]. Em (B), observa-se a fotomicrografia de MEV após preparo de contraste no *software* ImageJ evidenciando as áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (C), observa-se a fotomicrografia de MEV obtida após o tratamento químico, notando-se a presença de algumas áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (D), observa-se na fotomicrografia de MEV tratada para contraste a presença de colônias bacterianas remanescentes após o tratamento [setas vermelhas].

5.2.1.6 AF180

Os espécimes tratados por meio de ácido fosfórico durante 180 segundos apresentaram menor área colonizada por bactérias após o tratamento, quando comparado com o grupo AF90. No entanto, as imagens em MEV evidenciam a presença de extensas áreas de remanescentes bacterianos após o tratamento (Figura 22).

Figura 22 – Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo AF180. EM (A), a imagem de MEV ilustra a presença de colônias de bactérias fixadas sobre a superfície antes da aplicação do agente químico [setas vermelhas]. Em (B), observa-se a fotomicrografia de MEV após preparo de contraste no *software* ImageJ evidenciando as áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (C), observa-se a fotomicrografia de MEV obtida após o tratamento químico, notando-se a presença de algumas áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (D), observa-se na fotomicrografia de MEV tratada para contraste a presença de colônias bacterianas remanescentes após o tratamento [setas vermelhas].

5.2.1.7 Controle

Os espécimes do grupo controle, tratados por lavagem com soro fisiológico, apresentaram extensas áreas contaminadas por bactérias, antes e depois do tratamento, como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 – Avaliação da descontaminação de superfície de amostra do grupo CONTROLE. EM (A), a imagem de MEV ilustra a presença de colônias de bactérias fixadas sobre a superfície antes da aplicação do agente químico [setas vermelhas]. Em (B), observa-se a fotomicrografia de MEV após preparo de contraste no *software* ImageJ evidenciando as áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (C), observa-se a fotomicrografia de MEV obtida após o tratamento químico, notando-se a presença de algumas áreas contaminadas por bactérias [setas vermelhas]. Em (D), observa-se na fotomicrografia de MEV tratada para contraste a presença de colônias bacterianas remanescentes após o tratamento [setas vermelhas].

5.2.2 Análise quantitativa

Na tabela 3, estão descritos os percentuais de área dos corpos de prova contaminados por bactérias antes e após o tratamento. Os resultados obtidos não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos antes do tratamento. Os grupos EDTA90, EDTA180 e AC180 demonstraram redução significativa ($p < 0.05$) da contaminação bacteriana após o tratamento, de acordo com o teste pareado e não paramétrico de Wilcoxon. O grupo AF90 apresentou ligeiro aumento no percentual de área contaminada por bactérias ($p = 0.55$), enquanto os grupos AF180 e controle apresentaram percentual de área contaminada estável, considerando-se os dados pré-tratamento. A análise comparativa entre os grupos após o tratamento por meio do teste Kruskal-Wallis demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p = 0.0002$). De acordo com o pós-teste Dunn, diferenças significantes foram observadas entre o grupo EDTA180 e os grupos AC90, AF90, AF180 e controle. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos.

Tabela 3 - Área (%) dos corpos de prova contaminados por bactérias antes e após o tratamento nos diferentes grupos

	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Wilcoxon
EDTA90	33,36 ± 10,08 ^a	16,91 ± 10,42 ^{a,b}	0.0059
EDTA180	29,70 ± 5,95 ^a	10,02 ± 5,06 ^b	0.0273
AC90	31,85 ± 8,93 ^a	28,30 ± 8,81 ^a	0.27
AC180	32,49 ± 4,23 ^a	18,71 ± 6,83 ^{a,b}	0.0020
AF90	27,42 ± 6,84 ^a	30,61 ± 16,51 ^a	0.55
AF180	30,43 ± 5,40 ^a	30,12 ± 13,04 ^a	0.92
CONTROLE	24,41 ± 5,23 ^a	23,85 ± 4,01 ^a	0.90
Kruskal-Wallis	0.06	0.0002	---

Significante se $p < 0.05$ (em negrito). Letras diferentes nas colunas representam diferenças significantes entre os grupos (pós-teste de Dunn).

5.3 Características de rugosidade de superfície após o tratamento químico para descontaminação da superfície dos protótipos de implantes

A análise dos parâmetros de rugosidade superficial pelo *plugin* “Parâmetros de Rugosidade” do programa de análise de imagens ImageJ não demonstrou diferenças significantes (ANOVA a dois critérios pós-teste Dunnet) entre os diferentes grupos de tratamento e os parâmetros de rugosidade observados após o preparo de superfície previamente à contaminação bacteriana e descritos na Tabela 2. Os parâmetros de rugosidade obtidos após os diferentes tipos de tratamento estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4- Características de rugosidade de superfície (unidade) analisados no *plugin* parâmetros de rugosidade (ImageJ, NIH, EUA) **depois dos tratamentos de descontaminação de superfície** [Comprimento da amostra: 100µm, nivelamento de superfície]

	EDTA90	EDTA180	AC90	AC180	AF90	AF180	CONT
Rq	145,581	159,844	150,268	149,852	149,701	149,058	145,401
Ra	144,568	159,092	149,050	148,663	148,027	147,346	143,174
Rsk	1,019	1,012	1,022	1,021	1,028	1,029	1,040
Rku	1,050	1,030	1,057	1,053	1,071	1,075	1,103
Rp	190,000	175,000	175,000	177,000	175,000	173,000	163,000
Rv	48,000	58,000	52,000	46,000	44,000	34,000	46,000
Rt	238,000	233,000	227,000	221,000	219,000	209,000	221,000

Os dados da análise estatística realizada para análise da variação dos parâmetros de rugosidade observados antes e depois do tratamento de descontaminação estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5- Tabela ANOVA dos parâmetros de rugosidade pré e pós-tratamento de descontaminação de superfície

Fonte de variação	% da variação total	P	Resumo valor P	Significante?	
Linha	99,60	< 0,0001	****	Yes	
Coluna	0,1465	0,0056	**	Yes	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P
Linha	384092	6	64015	F (6, 42) = 2712	P < 0,0001
Coluna	565,0	7	80,72	F (7, 42) = 3,419	P = 0,0056
Residual	991,5	42	23,61		

Tabela 6- Análise estatística dos parâmetros de rugosidade observados após os diferentes tratamentos de superfície comparativamente aos parâmetros de rugosidade iniciais (ANOVA a dois critérios, pós-teste Dunnett)

Teste de Dunnet	≠ média	95% CI	Significante?	Valor de p ajustado
Rq				
Inicial vs. EDTA90	3,019	-15,71 a 21,74	Não	0,9974
Inicial vs. EDTA180	-11,24	-29,97 a 7,482	Não	0,4245
Inicial vs. AC90	-1,668	-20,39 a 17,06	Não	0,9997
Inicial vs. AC180	-1,252	-19,98 a 17,47	Não	0,9997
Inicial vs. AF90	-1,101	-19,83 a 17,62	Não	0,9998
Inicial vs. AF180(3)	-0,4580	-19,18 a 18,27	Não	> 0,9999
Inicial vs. CONTROLE	3,199	-15,53 a 21,92	Não	0,9971
Ra				
Inicial vs. EDTA90	5,432	-13,29 a 24,16	Não	0,9472
Inicial vs. EDTA180	-9,092	-27,82 a 9,634	Não	0,6408
Inicial vs. AC90	0,9500	-17,78 a 19,68	Não	0,9998
Inicial vs. AC180	1,337	-17,39 a 20,06	Não	0,9997
Inicial vs. AF90	1,973	-16,75 a 20,70	Não	0,9996
Inicial vs. AF180(3)	2,654	-16,07 a 21,38	Não	0,9994
Inicial vs. CONTROLE	6,826	-11,90 a 25,55	Não	0,8591
Rsk				
Inicial vs. EDTA90	0,1050	-18,62 a 18,83	Não	> 0,9999
Inicial vs. EDTA180	0,1120	-18,61 a 18,84	Não	> 0,9999
Inicial vs. AC90	0,1020	-18,62 a 18,83	Não	> 0,9999
Inicial vs. AC180	0,1030	-18,62 a 18,83	Não	> 0,9999
Inicial vs. AF90	0,09600	-18,63 a 18,82	Não	> 0,9999
Inicial vs. AF180(3)	0,09500	-18,63 a 18,82	Não	> 0,9999
Inicial vs. CONTROLE	0,08400	-18,64 a 18,81	Não	> 0,9999
Rku				
Inicial vs. EDTA90	0,01000	-18,72 a 18,74	Não	> 0,9999
Inicial vs. EDTA180	0,03000	-18,70 a 18,76	Não	> 0,9999
Inicial vs. AC90	0,003000	-18,72 a 18,73	Não	> 0,9999
Inicial vs. AC180	0,007000	-18,72 a 18,73	Não	> 0,9999
Inicial vs. AF90	-0,01100	-18,74 a 18,71	Não	> 0,9999
Inicial vs. AF180(3)	-0,01500	-18,74 a 18,71	Não	> 0,9999
Inicial vs. CONTROLE	-0,04300	-18,77 a 18,68	Não	> 0,9999
Rp				
Inicial vs. EDTA90	-14,60	-33,33 a 4,126	Não	0,1829
Inicial vs. EDTA180	0,4000	-18,33 a 19,13	Não	> 0,9999

...continua

...continuação

Inicial vs. AC90	0,4000	-18,33 a 19,13	Não	> 0,9999
Inicial vs. AC180	-1,600	-20,33 a 17,13	Não	0,9997
Inicial vs. AF90	0,4000	-18,33 a 19,13	Não	> 0,9999
Inicial vs. AF180(3)	2,400	-16,33 a 21,13	Não	0,9995
Inicial vs. CONTROLE	12,40	-6,326 a 31,13	Não	0,3256

Rv				
Inicial vs. EDTA90	-1,140	-19,87 a 17,59	Não	0,9997
Inicial vs. EDTA180	-11,14	-29,87 a 7,586	Não	0,4341
Inicial vs. AC90	-5,140	-23,87 a 13,59	Não	0,9596
Inicial vs. AC180	0,8600	-17,87 a 19,59	Não	0,9998
Inicial vs. AF90	2,860	-15,87 a 21,59	Não	0,9977
Inicial vs. AF180(3)	12,86	-5,866 a 31,59	Não	0,2908
Inicial vs. CONTROLE	0,8600	-17,87 a 19,59	Não	0,9998

Rt				
Inicial vs. EDTA90	-14,00	-32,73 a 4,726	Não	0,2160
Inicial vs. EDTA180	-9,000	-27,73 a 9,726	Não	0,6504
Inicial vs. AC90	-3,000	-21,73 a 15,73	Não	0,9974
Inicial vs. AC180	3,000	-15,73 a 21,73	Não	0,9974
Inicial vs. AF90	5,000	-13,73 a 23,73	Não	0,9647
Inicial vs. AF180(3)	15,00	-3,726 a 33,73	Não	0,1633
Inicial vs. CONTROLE	3,000	-15,73 a 21,73	Não	0,9974

A análise dos dados permitiu identificar que o fator *Linha* é responsável por 99,6% da variação total ($F = 2711.74$; $DFn = 6$; $DFd = 42$; $p < 0.0001$), o que implica que o efeito é considerado como extremamente significativo. Como essas diferenças não podem ser creditadas à comparação com os parâmetros de rugosidade observados previamente à descontaminação bacteriana, pode-se inferir que existem diferentes nos parâmetros de rugosidade entre os grupos após o tratamento químico para descontaminação de superfície. A análise estatística por meio de ANOVA a dois critérios pós-teste Tukey para comparação dos parâmetros de rugosidade pós-descontaminação entre os grupos de tratamento demonstrou diferenças significantes entre os grupos EDTA90 vs. controle no parâmetro R_p ($p < 0.05$), EDTA180 vs. AF180 no parâmetro R_v ($p < 0.005$) e entre os grupos EDTA90 vs. AF180 e EDTA180 vs. AF180 no parâmetro R_t ($p < 0.05$), indicando que o tratamento por EDTA a 90 ou 180 segundos resulta em maior variação de altura total (diferença vale-pico) do que o tratamento por meio de AF180.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi investigar os efeitos da descontaminação da superfície de implantes por diferentes agentes químicos usados por 90 e 180 segundos, observando-se que, dentre as soluções testadas para descontaminação, a mais efetiva é o EDTA a 24%, o qual apresenta capacidade de descontaminação significativa da superfície dos implantes quando aplicado por, no mínimo, 90 segundos.

Uma vez expostos à cavidade bucal, as superfícies dos implantes são colonizadas por bacilos Gram-negativos anaeróbios, bactérias fusiformes e espiroquetas (Holt; Newman, 1986; Mombelli et al, 1988; Rosenberg et al., 1991; Van de velde et al, 2009; Lombardo et al, 2015), podendo resultar em inflamação dos tecidos peri-implantares (Rams et al 1984; Shibli et al, 2002; Van der weijden et al, 2004; Lombardo et al, 2015).

A colonização microbiana ao redor de implantes segue um padrão semelhante ao que ocorre ao redor dos dentes naturais, com alteração da composição microbiana com o desenvolvimento da doença (Leonhardt et al. 1992; Klinge et al., 2005; Cosgarea et al., 2012; Cortelli et al. 2013), levando à inflamação dos tecidos moles (Loe et al., 1965), com possível perda de tecido duro de sustentação quando não tratadas. Em implantes saudáveis, a composição microbiana do sulco peri-implantar parece não diferir daquela existente no sulco gengival dos dentes adjacentes (Canullo et al. 2015_{a,b}).

A investigação da adesão inicial de bactérias *in situ* a superfícies de implantes de diferentes rugosidades e materiais (titânio usinado e com dois tipos de tratamentos de superfície e zircônia usinada e zircônia enriquecida com alumina com dois tratamentos de superfície diferentes demonstrou que não existe diferença na proporção de bactérias colonizando inicialmente a superfície dos discos, entre os grupos e em relação ao esmalte bovino, utilizado como controle. No entanto, maior quantidade de bactérias foi observada em amostras de superfície mais rugosa, sugerindo que estas superfícies são mais propensas à contaminação por bactérias (Al-ahmad et al. 2013).

Recentemente, estudo (Zhuang et al. 2016) realizado em chineses com sinais clínicos e radiográficos de peri-implantite, gengivite ou periodontite demonstrou que, nos mesmos indivíduos, patógenos periodontais mais prevalentes eram semelhantes entre os grupos com periodontite e peri-implantite, independente da condição de saúde. A prevalência e níveis de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* estavam positivamente associadas à periodontite, mas não à peri-implantite, enquanto que níveis elevados e mais prevalentes de *A. actinomycetemcomitans* estavam associados positivamente com periodontite e peri-implantite, mas não com gengivite ou saúde gengival ou da mucosa peri-implantar.

Diferentes estudos (Hultin et al. 2002; Perrson et al. 2006; Shibli et al. 2008; Maximo et al. 2009; Persson et al. 2010; Koyanagi et al. 2013; Bassetti et al. 2014) identificaram, por meio de sonda de DNA, em implantes apresentando PS $\geq$ 4mm perda óssea $\geq$ 2 mm a presença de bactérias do complexo verde (*A. actinomycetemcomitans*), laranja (*F. nucleatum*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*) e vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*), além de, em alguns estudos, bactérias do complexo amarelo (*S. gordonii*, *S. sanguinis*) e roxo (*V. parvula*).

A *A. actinomycetemcomitans* tem sido encontrada na maioria dos estudos que buscaram identificar a microbiota ao redor de implantes afetados pelas doenças peri-implantares (Van Winkelhoff, Wolf 2000; Cosgarea, et al. 2012; Cortelli et al. 2013; Persson; Renvert, 2014; Zhuang, et al. 2014; Canullo, et al. 2015). Além disso, essa espécie bacteriana demonstra potencial de infiltração nos *gaps* das interfaces implante-pilar sem carga, demonstrando alto potencial de colonização (Nascimento et al. 2011; Canullo et al. 2015_{a,b}).

Em implantes de titânio, essas bactérias tem capacidade de desenvolver biofilme tanto sobre superfícies lisas quanto rugosas, sendo maior para as superfícies mais rugosas. A instalação das superfícies modificadas e contaminadas em ratos resultou na ocorrência de sangramento espontâneo, ulceração e necrose dos tecidos moles adjacentes após 3 semanas, além de hiperplasia e instabilidade dos implantes após 6 semanas, acompanhada de perda óssea peri-implantar, conforme observado em micro-tomografias. Esses achados sugerem que amostras de Ti modificadas e contaminadas por *A. actinomycetemcomitans* podem ser usadas

como superfície colonizante, permitindo a persistência bacteriana e da resposta inflamatória do hospedeiro quando implantada *in vivo* (Freire et al. 2011).

Com base nessas informações, foi definido para este estudo que o desafio bacteriano para avaliação da descontaminação de superfícies de titânio por métodos químicos seria desenvolvido sob a forma de biofilme monoespécie de *A. actinomycetemcomitans*. As bactérias foram cultivadas sobre as amostras de titânio por 4 dias antes da fixação. Após 3 dias de cultivo do *A. actinomycetemcomitans* sobre superfícies de titânio modificadas, 75% das bactérias estavam viáveis, sem comprometimento da integridade da membrana celular, conforme demonstrado por imunofluorescência por Freire et al. 2011. Assim, neste período, temos contaminação bacteriana adequada para formação do biofilme monoespécie utilizado para os experimentos. Gosau et al. (2010) testaram a eficácia de descontaminação de discos de titânio contaminados *in situ* em quatro voluntários pela aplicação de solução tampão salina, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, clorexidina, Plax, Listerine e ácido cítrico. Os resultados demonstraram que todas as substâncias reduziram a contaminação bacteriana, investigada por meio de proporção de bactérias mortas/total de bactérias aderidas, com efeito bactericida significativo para as soluções de hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, clorexidina e Listerine. Resultados diferentes foram encontrados pelo grupo de pesquisa (Burgers et al. 2012) quando avaliaram a descontaminação de discos de titânio contaminados *in vitro* por monoculturas de *S. epidermidis*, *S. sanguinis* e *C. albicans*. Os resultados obtidos demonstraram que nenhuma das soluções testadas, com exceção do hipoclorito de sódio que é tóxica para ser utilizada em pacientes na concentração testada, foi significativamente efetiva contra os agentes bacterianos testados. De forma geral, resultados de estudos *in vitro* com biofilmes monoespécie podem ser utilizados para interpretação de interações mais complexas dos biofilmes *in vivo* (Burgers et al. 2012).

Alguns estudos utilizaram biofilme cultivado *in situ* para contaminação de discos de titânio com o objetivo de avaliar diferentes métodos de descontaminação da superfície (Gosau et al. 2010; Al-ahmad et al. 2013; Salmeron et al. 2013). I-Ahmad et al. investigaram a contaminação por *Streptococcus sp.*, *Eubacteria*, *Veilonella spp.*, *F. nucleatum* e *A. naeslundii* de discos de titânio e zircônia de superfícies lisas ou rugosas. As bactérias foram identificadas por meio de uso de

sondas de oligonucleotídeos, o que impediu a identificação da maioria dos espécimes bacterianos contaminando a superfície e encareceu o custo da pesquisa. Por outro lado, Salmeron et al. (2013) não se propuseram a identificar a composição microbiana dos discos tratados por meio de terapia fotodinâmica, laser de baixa intensidade ou azul de toluidina, mas sim investigar a resposta inflamatória reacional à inserção dos discos em conjuntivo de ratos.

Sabe-se ainda que outras bactérias do complexo vermelho, como a *P. gingivalis* e *T. denticola*, são encontradas em quantidade significativamente mais elevadas no sulco peri-implantar e conexões protéticas de implantes peri-implantite (Canullo et al. 2015_{a,b}), mas as condições de cultivo em anaerobiose são mais críticas, o que inviabilizou seu uso no presente estudo.

A proposta inicial do estudo era realizar o preparo de superfície proposto por Freire et al. (2011), onde superfícies de implantes usinados de 1.2 mm de espessura e 4.5 mm de diâmetro foram modificadas por meio de jateamento com partículas de óxido de alumínio (100 mm) e condicionamento com ácido clorídrico pH 3, 20 minutos a 80°C, com o objetivo de produzir superfícies rugosas adequadas para a inoculação do *A. actinomycetencomitans*. No entanto, em estudo piloto realizado previamente à pesquisa, observou-se que a rugosidade de superfície dos parafusos de recobrimento dos implantes utilizados como substrato e sua convexidade não permitiram a adesão da cepa de *A. actinomycetencomitans* cultivada.

Assim, o protocolo de tratamento das amostras de implantes utilizadas foi modificado com a criação de rugosidades superficiais com pontas diamantadas em alta rotação, jateamento com óxido de alumínio por 30 segundos e tratamento com ácido clorídrico pH 3, a 80°C por 20 minutos. O aumento da rugosidade obtido, demonstrado por meio de análise da rugosidade no *plugin* “parâmetros de rugosidade” do software de análise de imagens ImageJ, aumentou a rugosidade superficial e proporcionou maior aderência bacteriana, achados que estão de acordo com outros estudos (Herr et al. 2007; Duarte et al. 2009; Al-Hamad et al. 2013) que demonstraram que superfícies mais rugosas são favorecem a colonização bacteriana.

Diferentes métodos podem ser utilizados para investigar as características de rugosidade superficial, incluindo: microscopia de força atômica e confocal

(Wennerberg 1996, 1998), microscopia eletrônica de varredura (Mustafa et al. 2001; Calvo-guirado et al. 2015), perfilometria (Mustafa et al. 2001; Liu et al. 2013; Elias et al. 2015) e interferometria de luz branca (Gasik et al. 2015; Calvo-guirado et al. 2015). Neste estudo, a investigação das características de rugosidade superficial foi realizada por meio do *plugin* “Parâmetros de rugosidade” do *software* de análise de imagens ImageJ. Embora não convencional, a análise das características de superfície dos implantes por meio de fotomicrografias de MEV pode dar um panorama das superfícies dos implantes do ponto de vista topográfico (Sartoretto et al. 2015; Naddeo et al. 2015; Tuna et al. 2015).

Louropoulou et al (2012) realizaram uma revisão sistemática sobre os efeitos de diferentes instrumentos nas características superficiais de implantes lisos ou rugosos. A maioria dos estudos eleitos utilizaram se do MEV para avaliação. Adicionalmente, este estudo teve a vantagem de utilizar MEV de baixo vácuo, o qual permite a captura de imagens no mesmo ponto, pré e pós tratamento, do mesmo espécime, sendo mais fiel nas respostas obtidas pelo método empregado no estudo.

A contaminação bacteriana da superfície dos implantes pode levar ao desenvolvimento de processos inflamatórios que acometem os tecidos moles ao redor dos implantes (mucosite peri-implantar) ou que afeta também os tecidos duros (peri-implantite), podendo levar à perda do implante. Estudo retrospectivo investigando a contaminação bacteriana de implantes removidos de pacientes em decorrência de peri-implantite demonstrou a presença de grande quantidade de bactérias nas porções internas dos implantes (Scarano et al. 2005; Cosyn et al. 2011), com composição semelhante ao sulco peri-implantar (Cosyn et al. 2011), o que sugere que podendo servir como reservatório para contaminação bacteriana de outros sítios.

O nível de infecção em tecidos peri-implantares saudáveis clinicamente é menor do que nos casos de peri-implantite (Zhuang et al. 2014), revelando a importância do controle microbiano para o reestabelecimento da saúde peri-implantar, por meio da obtenção de uma superfície colonizável por células ósseas e gengivais, propiciando a neoformação óssea e que ocorra regeneração óssea bem sucedida (Schwartz et al., 1997; Mombelli, 2002).

Revisão sistemática publicada recentemente apontou prevalência de mucosite variável entre 19% a 65% dos casos e de peri-implantite entre 1% e 47%. Análise por meta-análise demonstrou prevalência média de 43% (CI: 32-54%) e 22% (CI: 14-30%), respectivamente, para as duas condições, estando positivamente correlacionada ao tempo em função (Derks et al. 2015).

A mucosite peri-implantar é uma lesão inflamatória que pode ser revertida por meio de tratamento não cirúrgico e atenção aos cuidados de higiene bucal; entretanto, o tratamento da peri-implantite é mais complexo, podendo ser realizado por métodos não cirúrgicos ou cirúrgicos, porém dificilmente resultando em formação de novo osso em contato direto com a superfície do implante previamente contaminada, em nível histológico (Valderrama, Wilson Jr. 2013). Assim, basicamente, o tratamento das doenças peri-implantares deve incluir medidas de descontaminação (Lindhe, Meyle 2008), as quais podem ser realizadas por meio de diferentes protocolos mecânicos e/ou químicos (Jovanovic et al., 1993; Persson et al., 1996; Hanish et al., 1997; Hurzeler et al., 1997; Augthun; Tinschert, Huber, 1998; Mombelli; Lang, 1998; Lang et al., 2000; Kreisler; Al Haj; D'hoedt, 2002; Kreisler et al., 2002; Suh et al., 2003; Heitz-Mayfield et al., 2004; Schou et al. 2004; Takasaki et al., 2007; Renvert et al., 2008; Alhag et al., 2008; Romanos, et al., 2009; Stubinger et al., 2010; Subramani, Wismeijer, 2012; Marotti et al., 2013; Mellado-valero et al., 2013). Superfícies de implantes contaminadas são incompatíveis com a adesão dos tecidos peri-implantares (Albrektsson; Isidor, 1994; Mombelli et al., 1999; Mombelli, 2002; Cerbasi et al, 2010).

O tratamento nano e macroestrutural das superfícies dos implantes realizado para proporcionar a osseointegração dificulta a descontaminação mecânica das superfícies dos implantes (Burgess et al. 2012), especialmente em superfícies mais rugosas (Dennison et al. 1994; Teughels et al. 2006), embora essas sejam melhores na obtenção de osseointegração (Persson et al., 2001; Herr et al., 2007; Albouy et al. 2011). Superfícies lisas, embora de mais fácil descontaminação, apresentam menores taxas de reosseointegração, uma vez que as características de superfície dos implantes estão diretamente relacionadas à taxa de osseointegração (Parlar et al. 2009), enquanto que superfícies mais rugosas apresentam melhores índices de sucesso após o tratamento da peri-implantite (Persson et al. 2001).

Tendo em vista a relação entre a superfície contaminada dos implantes e a necessidade de tratamentos superficiais para que ocorra a formação de toda estrutura de suporte e proteção dos implantes, é necessária a descontaminação de sua superfície (Meffert, 1996). A descontaminação química envolve o uso localizado de soluções anti-microbianas tais como clorexidina tópica, tetraciclina ou minociclina, ácido cítrico, peróxido de hidrogénio, ácido fosfórico a 35%, entre outros (Subramani, Wismeijer, 2012; Valderrama, Wilson Jr. 2013). As comparações de descontaminação a eficácia desses agentes químicos têm sido feitas principalmente por meio de estudos *in vitro* sobre diferentes tipos de superfície do implante (Mellado-valero et al., 2013) e, embora existam vários estudos investigando a descontaminação da superfície dos implantes, ainda há inconsistência sobre qual o melhor método de descontaminação a ser utilizado e a determinação de um padrão ouro de desinfecção (Claffey et al. 2008; Schwarz et al. 2011).

A substância mais testada para a descontaminação da superfície dos implantes no tratamento não cirúrgico e cirúrgico da peri-implantite é o ácido cítrico (Gosau et al., 2010; Meffert, 1992; Meffert et al., 1992; Zablotsky et al., 1992; Jovanoovic et al., 1993; Zablotsky, 1993; Meffert, 1994; Hanisch et al., 1997; Mouhyi et al. 1998; Kolonidis et al., 2003; Alhag et al., 2008) demonstrando capacidade de descontaminação da superfície dos implantes, com remoção do biofilme bacteriano, resultando em reosseointegração em implantes de superfície rugosa (Alhag et al. 2008). No entanto, ainda não existe um consenso na literatura quanto ao tempo e forma de aplicação.

Neste estudo, as soluções químicas foram aplicadas pelo método passivo, durante 90 ou 180 segundos. Os tempos e forma de aplicação foram baseados em estudo prévio (Barros 2013) realizado para investigar os efeitos do condicionamento ácido na descontaminação das superfícies radiculares. Os resultados obtidos demonstraram superioridade do EDTA na capacidade de descontaminação das superfícies dos implantes, sendo significativamente melhor do que o controle (soro fisiológico) e do que o tratamento com ácido fosfórico, além do ácido cítrico aplicado durante 90 segundos. Não houve diferenças entre os grupos EDTA 90 e 180 e o grupo AC180, o que sugere que, se o tratamento das superfícies de implantes contaminados for realizada por meio de tratamento por ácido cítrico, o tempo ideal

de aplicação, de acordo com a metodologia proposta neste estudo, é de 180 segundos, enquanto que o EDTA pode ser aplicado por 90 segundos, no mínimo.

Neste estudo, o ácido cítrico foi utilizado na concentração de 50%, superior aos demais estudos descritos na literatura (Zablotsky et al. 1992; Dennison et al. 1994; Mouhyl et al. 1998; Schou et al. 2003; Gosau et al. 2010). Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram capacidade de descontaminação da superfícies de implantes contaminados com *A. actinomycetencomitans* com a aplicação passiva do ácido cítrico, pH 1, por 3 minutos, embora os estudos anteriores tenham sugerido efetividade após aplicação por 30 segundos a 2 minutos, sendo adotado como padrão-ouro devido as suas características de biocompatibilidade (Ntrouka et al., 2011), permitindo a adesão celular (Kolonidis et al. 2003; Ungvari et al.; 2010).

Por outro lado, o ácido fosfórico não mostrou boa capacidade de descontaminação de superfície, mesmo quando comparado ao grupo controle. Entretanto, outros estudos demonstraram que utilização de ácido fosfórico a 35% para o tratamento de mucosite peri-implante pode resultar em redução da contaminação microbiana (Subramani, Wismeijer, 2012). Strooker et al. (1998) demonstraram que a aplicação de gel de ácido fosfórico durante 1 minuto em implantes osseointegrados, seguido por lavagem com jato de água, resultou em melhora dos parâmetros clínicos de índice gengival e profundidade média de sondagem. Essa diminuição pareceu ser tão eficaz quanto a terapia de suporte mecânico convencional com curetas de carbono, devendo ser realizados outros estudos para comprovação desses resultados.

O processo de osseointegração é influenciado pela composição da camada de óxidos superficiais e por características de superfície dos implantes (Albrektsson et al. 1981, 1987, 2008; Wennerberg et al. 1996, 2009_{a,b}). Assim, tratamentos mecânicos ou químicos que modificam as características de superfície dos implantes poderiam dificultar ou impedir o processo de reosseointegração (Mouhyi et al. 1998).

Neste estudo, as características de rugosidade de superfície foram investigadas previamente e posteriormente aos tratamentos químicos investigados em imagens de MEV. Os parâmetros de rugosidade determinados pelo *plugin* 'Parâmetros de Rugosidade' do programa ImageJ não mostraram diferenças significativas nos parâmetros de rugosidade antes e depois dos tratamentos

químicos para descontaminação de superfície. Esses resultados estão de acordo com estudo recentemente publicado que demonstrou alterações mínimas na rugosidade superficial de espécimes de Ti c.p. e Ti₆Al₄V tratados por soluções químicas de diferentes pH (Wheelis et al. 2015). Segundo Bollen et al. (1996), se superfícies usinadas são alteradas, os ranhuras provocadas na superfície não afetam significativamente a quantidade de placa que se adere mecanicamente à superfície. A redução do Ra abaixo de limite crítico (0.2 microns) não tem impacto significativo na composição microbiana sub e supragengival.

No entanto, os tratamentos com soluções ácidas resultaram em alteração da camada de óxidos superficiais, resultando em descoloração de superfície e modificação do pH das substâncias após tratamento por imersão e aumento das irregularidades superficiais (picos, vales e pontas) no tratamento por esfregaço (Wheelis et al. 2015), e aumento da quantidade de carbono, oxigênio e nitrogênio na superfície (Bollen et al. 1996). Entretanto, essas alterações não são observadas quando se utilizou substâncias de pH > 5.5 (Wheelis et al. 2015), o que justifica a proposta de uso do EDTA para descontaminação das superfícies de implantes de titânio.

O EDTA foi investigado em alguns estudos in vitro e in vivo na descontaminação de superfície dos implantes (Sculean 2004; Putzer et al. 2008; Rocuzzo et al. 2011; Lubin et al. 2014). A descontaminação de discos de implantes de titânio Osseotite e Nanotite contaminados por monocultura de *P. gingivalis* por meio de submersão dos discos em EDTA 24% (pH 7.0), ácido cítrico 12,5%, tetraciclina (100mg/mL) ou laser Nd:YAG 20mJ por 5 minutos foi investigada recentemente (Lubin et al. 2014). Durante 5 minutos, a face externa dos discos foi esfregada com ponta de algodão. Os discos Osseotite descontaminados com tetraciclina e ácido cítrico apresentaram redução semelhante de descontaminação de superfície, sendo superiores ao EDTA e ao laser. Os discos Nanotite apresentaram área de contaminação bacteriana maior e de mais difícil remoção, com maior efetividade de descontaminação por tetraciclina, seguido de ácido cítrico, laser de Nd:YAG e EDTA. Esses resultados divergentes do nosso estudo podem ser explicados por diferenças na espécie bacteriana e nos discos de implantes utilizados. Os implantes Nanotite e Osseotite apresentam características de superfície mais rugosas, que facilitam o acúmulo de biofilme e, por outro lado,

dificultam sua remoção, enquanto que, no presente estudo, as amostras foram obtidas a partir de parafusos de recobrimento de implantes de Ti c.p. que receberam tratamento de superfície para aumento da rugosidade, sendo originalmente mais lisos do que as superfícies Osseotite e Nanotite.

Esses achados poderiam sugerir que a resposta ao tratamento de descontaminação das superfícies de implantes contaminados não estaria relacionada apenas ao tempo, modo e tipo de agente químico realizado, mas também da composição microbiana mais sensível a determinado agente químico, o que deve ser futuramente explorado. A propriedade de descontaminação do EDTA estaria relacionada às propriedades antibacterianas e fungicidas (Putzer et al. 2008), o que poderia explicar sua maior efetividade no presente estudo.

O uso do EDTA para descontaminação da superfície dos implantes foi descrito por Sculean (2004) e Rocuzzo et al. (2011), para o tratamento de defeitos peri-implantares em seres humanos. Wohlfhardt et al. (2012) realizaram a descontaminação de superfície dos implantes com cureta de titânio, seguido da aplicação de gel de EDTA 24% por 2 minutos (controle; n= 16) e implantação de grânulos de titânio poroso (teste; n= 16). O acompanhamento clínico e radiográfico dos casos pelo período de 12 meses e demonstraram mudanças na altura radiográfica dos defeitos e percentual de preenchimento dos defeitos nos grupos teste e controle, porém sem diferenças entre os grupos. No entanto, o grupo teste apresentou maior quociente de estabilidade dos implantes, aumentada em 1.6 unidades, enquanto o grupo controle demonstrou diminuição de 0.7 unidades do mesmo índice. Esses achados demonstraram que a propriedade de descontaminação dos implantes por meio do uso de EDTA pode favorecer o preenchimento ósseo de defeitos peri-implantares, sem implicar necessariamente na obtenção de reosseointegração.

Considerando-se as limitações desse estudo, principalmente o emprego de contaminação das superfícies por uma espécie bacteriana apenas e a realização de análises in vitro apenas, outros estudos deverão ser realizados para comprovar a eficiência clínica da descontaminação da superfície dos implantes por gel de EDTA a 24% ou ácido cítrico a 50% no tratamento das doenças peri-implantares.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Dentro dos limites metodológicos deste estudo, pode-se concluir que:

- O tratamento de superfícies de titânio contaminadas por meio do emprego de solução em gel de EDTA a 24% por 90 e 180 segundos e ácido cítrico a 50% por 180 segundos é efetiva para remoção de *A. atinomycesetncomitans*;
 - A solução de gel de EDTA a 24% promove a maior descontaminação bacteriana das superfícies de titânio;
 - Há maior descontaminação da superfície com o emprego das soluções de EDTA e ácido cítrico por 180 segundos. No entanto, não há diferenças significantes entre o emprego de EDTA por 90 e 180 segundos, indicando que essa substância é efetiva na descontaminação bacteriana quando aplicada por, no mínimo, 90 segundos;
 - O tratamento por meio de EDTA por 90 e 180 segundos promove alteração significativa dos parâmetros de rugosidade superficial R_p , R_v e R_t , especialmente quando comparado aos grupos controle e AF180, indicando que este tratamento pode resultar em subtração ácida adicional.
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahamad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M, Hannig C, Han J-S, Molkewitz M, Kodal R. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol* 2013; 11: 39-1147.
 2. Albouy JP, Abrahamsson I, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2012 Feb;39(2):182-7.
 3. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 155–170.
 4. Albrektsson T, Jacobsson M. Bone–metal interface in osseointegration. *J Prosthet Dent* 1987; 57: 597–607.
 5. Albrektsson T, Sennerdy L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontology* 2000. 2008; 47: 15-26.
 6. Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants - past and future, 1966-2042. *J Can Dent Assoc*. 2005 May;71(5):327.
 7. Albrektsson TO, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontol* 2000. 1994 Feb;4:58-73.
 8. Alhag M, Renvert S, Polyzois I, Claffey N. Re-osseointegration on rough implant surfaces previously coated with bacterial biofilm: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Feb;19(2):182-7.
 9. Al-Radha AS, Pal A, Pettemerides AP, Jenkinson HF. Molecular analysis of microbiota associated with periimplant diseases. *J Dent* 2012; 40:989-98
 10. Amarasinghe JJ, Scannapieco FA, Haase EM. Transcriptional and translational analysis of biofilm determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental perturbation. *Infect Immun* 2009;77:2896-2907.
 11. Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Kuroda K, Ueda M. Design of a novel antimicrobial peptide activated by virulent proteases. *Chem Biol Drug Des*. 2012 Nov;80(5):725-33.
-

12. Augthun M, Conrads G. Microbial findings of deep peri-implant bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12:106-12.
 13. Augthun M¹, Tinschert J, Huber A. In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces. *J Periodontol.* 1998 Aug;69(8):857-64.
 14. Barros J, Santana A. Avaliação de diferentes agentes descontaminantes em superfícies radiculares. Dissertação de Mestrado. 2013. Faculdade de Odontologia de Bauru. São Paulo.
 15. Bassetti M, Schar D, Wicki B, et al. Anti-infective therapy of periimplantitis with adjunctive drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2014;25:279-287.
 16. Behneke A¹, Behneke N, d'Hoedt B. The longitudinal clinical effectiveness of ITI solid-screw implants in partially edentulous patients: a 5-year follow-up report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Sep-Oct;15(5):633-45.
 17. Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden J, Mol BW, Lammes FB, ten Kate FW, ter Schegget J, Bleker OP. Human papillomavirus DNA after treatment of cervical dysplasia: low prevalence in normal cytologic smears. *Cancer.* 1996 Jun 15;77(12):2538-43.
 18. Brookshire FV, Nagy WW, Dhuru VB, Ziebert GJ, Chada S. The qualitative effects of various types of hygiene instrumentation on commercially pure titanium and titanium alloy implant abutments: an in vitro and scanning electron microscope study. *J Prosthet Dent.* 1997 Sep;78(3):286-94.
 19. Burgers R, Wittey C, Hahnel S, Gosau M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 940-947.
 20. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Jun;8(3):161-72.
 21. Calvo-Guirado JL, Satorres-Nieto M, Aguilar-Salvatierra A; Delgado-Ruiz RA; de Val JEM-S; Gargallo-Albiol J, Gómez-Moreno G; Romanos GE. Influence of surface treatment on osseointegration of dental implants: histological, histomorphometric and radiological analysis in vivo. *Clin Oral Invest* 2015; 19: 509-517.
-

22. Canullo L, Tallarico M, Radovanovic S, Delibasic B, Covani U, Rakic M. Distinguishing predictive profiles for patient-based risk assessment and diagnostics of plaque induced, surgically and prosthetically triggered peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Nov 20.
 23. Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Brånemark PI. Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthop Scand*. 1986 Aug;57(4):285-9.
 24. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*. 2015;6(3):183-7.
 25. Claffey N¹, Clarke E, Polyzois I, Renvert S. Surgical treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):316-32.
 26. Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, McGuire JA, Charles CA. Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2013 Jun;26(3):149-55.
 27. Cosgarea R, Dannewitz B, Sculean A, Bran S, Rotaru H, Baciut G, Eick S. Bacterial and inflammatory behavior of implants in the early healing phase of chronic periodontitis. *Quintessence Int*. 2012 Jun;43(6):491-501.
 28. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
 29. Cosyn J, Raes S, De Meyer S, Raes F, Buyl R, Coomans D, De Bruyn H. An analysis of the decision-making process for single implant treatment in general practice. *J Clin Periodontol*. 2012 Feb;39(2):166-72.
 30. de Waal YC, Raghoobar GM, Meijer HJ, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Prognostic indicators for surgical peri-implantitis treatment. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Mar 29.
 31. Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Caffesse RG. Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *J Periodontol*. 1994 Oct;65(10):942-8.
-

32. Derks J, Tomasi C, Wennström JL, Berglundh T. Response to Letter to the Editor, "Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Early and Late Implant Loss". *J Dent Res*. 2015 Sep;94(9 Suppl):234S.
 33. Devides SL¹, Franco AT. Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Mar-Apr;21(2):262-9.
 34. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-193.; Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:41-47.
 35. Donlan RM¹, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93.
 36. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*. 2010 Feb;55(2):142-7.
 37. Elias CN, Fernandes DJ, Resende CRS, Roestelb J. Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure high strength titanium alloy for dental implants. *Dental Mat* 2015; 31: e1-e13.
 38. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:136-67.
 39. Fox SC¹, Moriarty JD, Kusy RP. The effects of scaling a titanium implant surface with metal and plastic instruments: an in vitro study. *J Periodontol*. 1990 Aug;61(8):485-90.
 40. Freire MO, Sedghizadeh PP, Schaudinn C, Gorur A, Downey JS, Choi JH, Chen W, Kook JK, Chen C, Goodman SD, Zadeh HH. Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. *J Periodontol*. 2011 May;82(5):778-89.
 41. Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, van der Horst J, Wismeijer D, Crielaard W, Laine ML, Veerman EC, Bikker FJ, Loos BG. Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri-implant infections. *J Periodontal Res* 2012; 47:616-25
-

-
-
42. Gasik M, Braem A, Chaudhari A, Duyck J, Vleugels J. Titanium implants with modified surfaces: meta-analysis of in vivo osseointegration. *Mat Sci Engin C* 2015; 49: 152-258.
 43. Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Aug;21(8):866-72.
 44. Gustumhaugen E¹, Lönn-Stensrud J, Scheie AA, Lyngstadaas SP, Ekfeldt A, Taxt-Lamolle S. Effect of chemical and mechanical debridement techniques on bacterial re-growth on rough titanium surfaces: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Jun;25(6):707-13.
 45. Hanisch O, Tatakis DN, Rohrer MD, Wöhrle PS, Wozney JM, Wikesjö UM. Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Nov-Dec;12(6):785-92.
 46. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol* 2008; 35:292-304.
 47. Heitz-Mayfield LJA, Lang NP. Antimicrobial Treatment of Peri-implant Diseases. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19:128-139.
 48. Herr AE, Hatch AV, Throckmorton DJ, Tran HM, Brennan JS, Giannobile WV, Singh AK. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5268-73.
 49. Holt R Jr. Dental implants. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr*. 1986;34(2):49-55.
 50. Hultin M, Gustafsson A, Hallstrom M, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with periimplantitis. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:349-35.
 51. Hürzeler MB, Quiñones CR, Kirsch A, Schüpbach P, Krausse A, Strub JR, Caffesse RG. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part III. Evaluation of autogenous bone combined with porous hydroxyapatite. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Oct;8(5):401-11.
-
-

52. Jovanovic SA. The management of peri-implant breakdown around functioning osseointegrated dental implants. *J Periodontol.* 1993 Nov;64(11 Suppl):1176-83.
 53. Kalykakis GK, Mojon P, Nisengard R, Spiekermann H, Zafiropoulos GG. Clinical and microbial findings on osseointegrated implants; comparisons between partially dentate and edentulous subjects. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1998; 6:155-9.
 54. Kao RT¹, Curtis DA, Murray PA. Diagnosis and management of peri-implant disease. *J Calif Dent Assoc.* 1997 Dec;25(12):872-80.
 55. Klinge B, Norlund A. A socio-economic perspective on periodontal diseases: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:314-25.
 56. Kolonidis SG¹, Renvert S, Hämmerle CH, Lang NP, Harris D, Claffey N. Osseointegration on implant surfaces previously contaminated with plaque. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Aug;14(4):373-80.
 57. Konstantinidis IK, Kotsakis GA, Gerdes S, Walter MH. Cross-sectional study on the prevalence and risk indicators of peri-implant diseases. *Eur J Oral Implantol.* 2015 Spring;8(1):75-88.
 58. Kotsovilis S, Karoussis IK, Trianti M, Fourmouis I. Therapy of peri-implantitis: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008 Jul;35(7):621-9.
 59. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Maruyama N, Ohkuma M, Izumi Y. Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2013;40:218-226.
 60. Kreisler M, Al Haj H, d'Hoedt B. Temperature changes at the implant-bone interface during simulated surface decontamination with an Er:YAG laser. *Int J Prosthodont.* 2002 Nov-Dec;15(6):582-7.
 61. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11 Suppl 1:146-55.
 62. Leonhardt A, Berglundh T, Ericsson I, Dahlén G. Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Sep;3(3):112-9.
-

-
-
63. Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res*. 1992 Mar;3(1):9-16.
 64. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: consensus report of the sixth european workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35:282-5.)
 65. Listgarten MA. Clinical trials of endosseous implants: issues in analysis and interpretation. *Ann Periodontol*. 1997 Mar;2(1):299-313.
 66. Liu R, Lei T, Dusevich V, Yao X, Liu Y, Walker MP, Wang Y, Ye L. Surface characteristics and cell adhesion: a comparative study of four commercial dental implants. *J Prosthodontol* 2013; 22: 641-651.
 67. LOE H, THEILADE E, JENSEN SB. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *J Periodontol*. 1965 May-Jun;36:177-87.
 68. Lombardo G, Corrocher G, Pighi J, Mascellaro A, Marincola M, Nocini PF. Esthetic outcomes of immediately loaded locking taper implant in the anterior maxilla: a case series study. *J Oral Implantol*. 2015 Dec 11.
 69. Louropoulou A¹, Slot DE, Van der Weijden FA. Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Jun;23(6):643-58.
 70. Lubin J, Hernandez MA, Drukteinis SE, Parker WB, Murray PE. Effectiveness of disinfection therapies and promotion of osteoblast growth on osseointegrated and nanotite implant surfaces. *Implant Dent*. 2014 Aug;23(4):426-33.
 71. Mangano F, Shibli JA, Sammons RL, Veronesi G, Piattelli A, Mangano C. Clinical outcome of narrow-diameter (3.3-mm) locking-taper implants: a prospective study with 1 to 10 years of follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Mar-Apr;29(2):448-55.
 72. Marotti J, Heger S, Tinschert J, Tortamano P, Chuembou F, Radermacher K, Wolfart S. Recent advances of ultrasound imaging in dentistry--a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Jun;115(6):819-32.
 73. Máximo MB, de Mendonça AC, Renata Santos V, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant
-
-

- diseases before and after mechanical anti-infective therapies. Clin Oral Implants Res. 2009 Jan;20(1):99-108.
74. Meffert RM, Langer B, Fritz ME. Dental implants: a review. J Periodontol. 1992 Nov;63(11):859-70.
75. Meffert RM. Guided tissue regeneration/guided bone regeneration: a review of the barrier membranes. Pract Periodontics Aesthet Dent. 1996 Mar;8(2):142-4.
76. Meffert RM. Maintenance and treatment of the ailing and failing implant. J Indiana Dent Assoc. 1994 Fall;73(3):22-4; quiz 25.
77. Mellado-Valero A¹, Buitrago-Vera P, Solá-Ruiz MF, Ferrer-García JC. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013 Nov 1;18(6):e869-76.
78. Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. Oral Microbiol Immunol. 1988 Sep;3(3):113-20.
79. Mombelli A, Decaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. J Clin Periodontol 2011; 38 Suppl 11:203-13;
80. Mombelli A, Gmür R, Lang NP, Corbert E, Frey J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. J Clin Periodontol. 1999 Aug;26(8):505-10.
81. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. Periodontol 2000 1998; 17:63-76; Kao RT, Curtis DA, Murray PA. Diagnosis and management of peri-implant disease. J Calif Dent Assoc 1997; 25:872-80.
82. Mombelli A, Lehmann B, Tonetti M, Lang NP. Clinical response to local delivery of tetracycline in relation to overall and local periodontal conditions. J Clin Periodontol. 1997 Jul;24(7):470-7.
83. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. Oral Microbiol Immunol. 1987 Dec;2(4):145-51.
-

-
-
84. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2002;28:177-89.
 85. Mouhyi J, Sennerby L, Wennerberg A, Louette P, Dourov N, van Reck J. Re-establishment of the atomic composition and the oxide structure of contaminated titanium surfaces by means of carbon dioxide laser and hydrogen peroxide: an in vitro study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2000;2(4):190-202.
 86. Mouhyi J¹, Sennerby L, Pireaux JJ, Dourov N, Nammour S, Van Reck J. An XPS and SEM evaluation of six chemical and physical techniques for cleaning of contaminated titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Jun;9(3):185-94.
 87. Mustafa K¹, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Oct;12(5):515-25.
 88. Naddeo P, Laino L, La Noce M, Piattelli A, De Rosa A, Iezzi G, Laino G, Paino F, Papaccio G, Tirino V. Surface biocompatibility of differently textured titanium implants with mesenchymal stem cells. *Dent Mater*. 2015 Mar;31(3):235-43.
 89. Nascimento Cd, Scarabel TT, Miani PK, Watanabe E, Pedrazzi V. In vitro evaluation of the microbial contamination on new toothbrushes: a preliminary study. *Microsc Res Tech*. 2012 Jan;75(1):42-5.
 90. Nascimento MM, Gordan VV, Qvist V, Bader JD, Rindal DB, Williams OD, Gewartowski D, Fellows JL, Litaker MS, Gilbert GH; Dental Practice-Based Research Network Collaborative Group. Restoration of noncarious tooth defects by dentists in The Dental Practice-Based Research Network. *J Am Dent Assoc*. 2011 Dec;142(12):1368-75.
 91. Ntrouka V¹, Hoogenkamp M, Zaura E, van der Weijden F. The effect of chemotherapeutic agents on titanium-adherent biofilms. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Nov;22(11):1227-34.
 92. Parlar A, Bosshardt DD, Cetiner D, Schafroth D, Unsal B, Haytaç C, Lang NP. Effects of decontamination and implant surface characteristics on re-osseointegration following treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Apr;20(4):391-9.
-
-

93. Parma-Benfenati S, Roncati M, Galletti P, Tinti C. Peri-implantitis Treatment with a Regenerative Approach: Clinical Outcomes on Reentry. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2015 Sep-Oct;35(5):625-36.
 94. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Aug;(437):41-7.
 95. Pereira da Silva CH, Vidigal GM Jr, de Uzeda M, de Almeida Soares G. Influence of titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. *Implant Dent*. 2005 Mar;14(1):88-93.
 96. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014 Dec;16(6):783-93. doi: 10.1111/cid.12052. Epub 2013 Mar 25.
 97. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014 Dec;16(6):783-93.
 98. Persson GR, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Antimicrobial therapy using a local drug delivery system (Arestin) in the treatment of peri-implantitis. I: Microbiological outcomes. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:386-393.
 99. Persson GR, Samuelsson E, Lindahl C, Renvert S. Mechanical nonsurgical treatment of peri-implantitis: A single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results. *J Clin Periodontol* 2010;37:563-573.
 100. Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Dec;12(6):595-603.
 101. Persson LG, Ericsson I, Berglundh T, Lindhe J. Guided bone regeneration in the treatment of periimplantitis. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Dec;7(4):366-72.
 102. Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced periimplant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 1994; 5:254-9.
 103. Putzer P, Hoy L, Günay H. Highly concentrated EDTA gel improves cleaning efficiency of root canal preparation in vitro. *Clin Oral Investig*. 2008 Dec;12(4):319-24.
-

-
-
104. Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res* 1990; 1:8-12
 105. Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, van Steenberghe D. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res* 2005; 84:340-4.
 106. Rams TE, Keyes PH, Jenson AB. Morphological effects of inorganic salts, chloramine-T, and citric acid on subgingival plaque bacteria. *Quintessence Int Dent Dig*. 1984 Aug;15(8):835-44.
 107. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):305-15.
 108. Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, et al. A method for the quantitative site-specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed in vivo. *Caries Research* 1997;31:194-200
 109. Roccuzzo M, Bonino F, Bonino L, Dalmaso P. Surgical therapy of peri-implantitis lesions by means of a bovine-derived xenograft: comparative results of a prospective study on two different implant surfaces. *J Clin Periodontol*. 2011 Aug;38(8):738-45.
 110. Romanos G, Ko HH, Froum S, Tarnow D. The use of CO(2) laser in the treatment of peri-implantitis. *Photomed Laser Surg*. 2009 Jun;27(3):381-6.
 111. Romeo E, Ghisolfi M, Murgolo N, Chiapasco M, Lops D, Vogel G. Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part I: clinical outcome. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Feb;16(1):9-18.
 112. Romeo E, Lops D, Chiapasco M, Ghisolfi M, Vogel G. Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: radiographic outcome. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Apr;18(2):179-87.
 113. Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Persson GR, Renvert S. Long-term stability of surgical bone regenerative procedures of peri-implantitis lesions in a prospective case-control study over 3 years. *J Clin Periodontol*. 2011 Jun;38(6):590-7.
-
-

114. Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors. *J Clin Periodontol*. 2006 Apr;33(4):283-9.
 115. Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *J Clin Periodontol*. 2006 Apr;33(4):290-5.
 116. Roos-Jansåker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol*. 2006 Apr;33(4):296-301.
 117. Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res* 1991; 2: 135-44;
 118. Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res*. 1991 Jul-Sep;2(3):135-44.
 119. Salmeron s, Rezende MLR, Consolaro A, Sant'Ana ACP, Damante CA, Gregghi SLA, Passanezi E. Laser therapy as an effective method for implant surface decontamination: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol* 2013; 84: 641-649.
 120. Sartoretto SC, Alves AT, Resende RF, Calasans-Maia J, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci*. 2015 May-Jun;23(3):279-87.
 121. Scarano A, Assenza B, Piattelli M, et al. A 16-year study of the microgap between 272 human titanium implants and their abutments. *J Oral Implantol* 2005;31:269-275.
 122. Schenk G, Flemmig TF, Betz T, Reuther J, Klaiber B. Controlled local delivery of tetracycline HCl in the treatment of periimplant mucosal hyperplasia and mucositis. A controlled case series. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Oct;8(5):427-33.
 123. Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19 Suppl:140-9.
-

-
-
124. Schou S, Holmstrup P, Jørgensen T, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Wenzel A. Implant surface preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Aug;14(4):412-22.
 125. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997 Jun;14:158-72.
 126. Schwarz F, Nuesry E, Bieling K, Herten M, Becker J. Influence of an erbium, chromium-doped yttrium, scandium, gallium, and garnet (Er,Cr:YSGG) laser on the reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium implant surfaces. *J Periodontol.* 2006 Nov;77(11):1820-7.
 127. Schwarz F, Sahm N, Mihatovic I, Golubovic V, Becker J. Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis. *J Clin Periodontol.* 2011 Oct;38(10):939-49.
 128. Schwarz F, Sculean A, Romanos G, Herten M, Horn N, Scherbaum W, Becker J. Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants. *Clin Oral Investig.* 2005 Jun;9(2):111-7.
 129. Sculean A, Schwarz F, Berakdar M, Romanos GE, Arweiler NB, Becker J. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to ultrasonic instrumentation: a pilot study. *J Periodontol.* 2004 Jul;75(7):966-73.
 130. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra-and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:975-982.
 131. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res.* 1984 Mar;63(3):412-21.
 132. Slots J. Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. *J Clin Microbiol.* 1981 Sep;14(3):288-94.
 133. Speelman JA, Collaert B, Klinge B. Evaluation of different methods to clean titanium abutments. A scanning electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Sep;3(3):120-7.
-
-

134. Strooker H¹, Rohn S, Van Winkelhoff AJ. Clinical and microbiologic effects of chemical versus mechanical cleansing in professional supportive implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 Nov-Dec;13(6):845-50.
 135. Stubinger S, Etter C, Miskiewicz M, Homann F, Saldamli B, Wieland M, Sader R. Surface alterations of polished and sandblasted and acid-etched titanium implants after Er:YAG, carbon dioxide, and diode laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 Jan-Feb;25(1):104-11.
 136. Subramani K, Wismeijer D. Decontamination of Titanium Implant Surface and Re-osseointegration to treat Peri-implantitis: A Literature Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27:1043-1054.
 137. Suh JJ, Simon Z, Jeon YS, Choi BG, Kim CK. The use of implantoplasty and guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis: two case reports. *Implant Dent*. 2003;12(4):277-82.
 138. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Kikuchi S, Oda S, Ishikawa I. Er:YAG laser therapy for peri-implant infection: a histological study. *Lasers Med Sci*. 2007 Sep;22(3):143-57. Epub 2007 Jan 12.
 139. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014 May;40(5):670-7.
 140. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17 Suppl 2:68-81.
 141. Tonetti MS, Prato GP, Cortellini P. Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery. *J Clin Periodontol*. 1996 Jun;23(6):548-56.
 142. Tuna T, Wein M, Altmann B, Steinberg T, Fischer J, Att W. Effect of ultraviolet photofunctionalisation on the cell attractiveness of zirconia implant materials. *Eur Cell Mater*. 2015 Jan 23;29:82-94; discussion 95-6.
 143. Ungvári K, Pelsöczy IK, Kormos B, Oszkó A, Rakonczay Z, Kemény L, Radnai M, Nagy K, Fazekas A, Turzó K. Effects on titanium implant surfaces of chemical agents used for the treatment of peri-implantitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jul;94(1):222-9. doi: 10.1002/jbm.b.31644.
-

-
-
144. Valderrama P, Wilson TG Jr. Detoxification of implant surfaces affected by peri-implant disease: an overview of surgical methods. *Int J Dent.* 2013;2013:740680.
 145. Van de Velde T, Collaert B, Sennerby L, De Bruyn H. Effect of implant design on preservation of marginal bone in the mandible. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010 Jun 1;12(2):134-41.
 146. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Piscoer M, IJzerman Y, Van der Velden U. Plaque removal by professional electric toothbrushing compared with professional polishing. *J Clin Periodontol.* 2004 Oct;31(10):903-7.
 147. Van Winkelhoff AJ¹, Wolf JW. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. *J Clin Periodontol.* 2000 Jul;27(7):531-5.
 148. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone. *Impl Res.* 2009a; 20(Suppl 4): 172-184.
 149. Wennerberg A, Albrektsson T. On implants surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009b; 24: 63-74.
 150. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9:11–19.
 151. Wennerberg A. On surface roughness and implant incorporation. Tese (Doutorado). Department of Biomaterial/Handicap Research, University of Göteborg. Göteborg, Sweden, 1996.
 152. Wheelis SE, Gindri IM, Valderrama P, Wilson TG Jr, Huang J, Rodrigues DC. Effects of decontamination solutions on the surface of titanium: investigation of surface morphology, composition, and roughness. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2015, 1–12.
 153. Wohlfahrt JC, Lyngstadaas SP, Ronold HJ, Saxegaard E, Elligesen JE, Karlsson S, Aass AM. Porous titanium granules in the surgical treatment of peri-implant osseous defects: a randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2012; 27: 401-410.
 154. Zablotsky M, Meffert R, Mills O, Burgess A, Lancaster D. The macroscopic, microscopic and spectrometric effects of various chemotherapeutic agents
-
-

- on the plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implant surface. Clin Oral Implants Res. 1992 Dec;3(4):189-98.
155. Zablotsky M. HA coatings in implant dentistry: hype, hysteria, or clinical reality? J Dent Symp. 1993 Aug;1:70-2.
156. Zambon JJ, Reynolds HS, Chen P, Genco RJ. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Bacteroides gingivalis*. J Periodontol. 1985 Nov;56(11 Suppl):32-40.
157. Zhuang L-F, Watt RM, Mattheos N, Si M-S, Lai H-C, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. Clin. Oral Impl. Res. 2016; 27: 13–21.
158. Zhuang LF, Watt RM, Mattheos N, Si MS, Lai HC, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. Clin Oral Implants Res. 2014 Nov 14.
159. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):286-91.
-