UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE

THALISSON SAYMO DE OLIVEIRA SILVA

Análise genômica do biofilme formado em implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio e seu impacto sobre a saúde dos tecidos peri-implantares: estudo longitudinal de 3 anos

Ribeirão Preto
2018

THALISSON SAYMO DE OLIVEIRA SILVA

Análise genômica do biofilme formado em implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio e seu impacto sobre a saúde dos tecidos peri-implantares: estudo longitudinal de 3 anos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências, junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Reabilitação Oral).

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

Ribeirão Preto

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do *Campus* USP – Ribeirão Preto

Silva, Thalisson Saymo de Oliveira

Análise genômica do biofilme formado em implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio e seu impacto sobre a saúde dos tecidos peri-implantares: estudo longitudinal de 3 anos. Ribeirão Preto, 2018.

172 p. : il. ; 30 cm

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

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

Orientador: do Nascimento, Cássio

1. Implante dentário. 2. Zircônia. 3. Titânio. 4. Conectores protéticos. 5. Avaliação clínica. 6. Microbiologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

THALISSON SAYMO DE OLIVEIRA SILVA

Análise genômica do biofilme formado em implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio e seu impacto sobre a saúde dos tecidos peri-implantares: estudo longitudinal de 3 anos

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

Área de concentração: Reabilitação Oral.

Aprovado em ____/____/2018

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus

Por se fazer presente em todos os momentos, pelas oportunidades concedidas, por guiar minhas escolhas e mostrar que sou capaz. Pela força, coragem e fé que me impulsiona a seguir em busca dos meus sonhos. A ele seja dada toda honra, glória e louvor.

Aos meus pais

Francisco de Assis da Silva e Maria de Fátima Oliveira Silva, pelo incentivo constante, amor, cuidado, confiança e por terem cultivado em mim valores e bons princípios. Obrigado por acreditarem nos meus sonhos, pelo apoio incondicional, pelas orações e suporte emocional, e por me permitir desbravar o mundo. Sem vocês jamais teria chegado até aqui. Um parágrafo é pouco para descrever a minha gratidão frente a tudo que vocês fazem por mim. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs

Marlana e Nayana, por todo carinho, atenção e companheirismo. Obrigado por cuidar dos nossos pais na minha ausência e por sonhar junto comigo por dias melhores.

Aos meus tios

José Luiz e Gilberto, in memoriam, por me amarem como um filho. Cada conquista alcançada era motivo de felicidade e orgulho para vocês. Aonde estiverem, sei que estarão torcendo por mim. Essa conquista também é de vocês!

Às minhas avós

Valdomice (in memoriam) e ***Arimar***, pelo amor concedido, abraço verdadeiro, sorriso sincero e pela simplicidade que me motiva.

Aos meus professores

Se cheguei aonde estou, é porque aproveitei o melhor de cada um de vocês. Muito obrigado por acreditarem no meu potencial!

A vocês, amada família, dedico este trabalho!

Agradecimentos Especiais

Aos meus orientadores,

Prof. Dr. Cássio do Nascimento e Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Junior, agradeço pela oportunidade de trabalharmos juntos, por todos conhecimentos e conselhos transmitidos, pela disponibilidade e paciência ao explicar detalhadamente cada questionamento e por solucionar minhas dúvidas. Com vocês aprendi que foco, responsabilidade e dedicação ao trabalho são essenciais para a formação de um profissional de excelência. A experiência científica de vocês é inspiradora e fazer parte da equipe me proporcionou grande amadurecimento científico e desenvolvendo do senso crítico. Reconheço o esforço em formar orientados resolutivos, preparados para seguirem a carreira acadêmica. O aprendizado é contínuo, levarei para a vida todos os ensinamentos. Grato por tudo!

*À equipe do Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular (LabDOM), especialmente à doutoranda **Alice Ramos de Freitas**. Fui contemplado com sua amizade, juntos ficamos mais fortes para enfrentar os desafios da pós-graduação. Obrigado por fazer parte dessa história, por me ajudar em todos os experimentos como se fossem seus, por aceitar os desafios com entusiasmo e responsabilidade. À amiga **Marília Lamenha Lins Pinheiro**, mulher forte, corajosa e dedicada. Grato pela parceria firmada e por tornar essa jornada mais tranquila. Ao doutorando **Jefferson Antônio Gomes**, recém integrante da equipe LabDOM, obrigado pela amizade e experiência compartilhada. Trabalhar em equipe foi tão prazeroso, a diversão era garantida em tempo integral, os momentos difíceis eram superados com leveza, positividade e sempre com muitas risadas. Chegou a hora de cada um desbravar novos caminhos, ainda que em lugares distantes, saibam que sempre podem contar comigo! Certamente Deus tem reservado o que há de melhor para vocês!*

Aos voluntários da pesquisa, pela confiança em nosso trabalho e compromisso com o estudo. Sem vocês este trabalho não era possível ser realizado.

Agradecimientos

A Deus, minha fonte inesgotável de força, pelas oportunidades e bênçãos concedidas.

À minha família, por todo apoio, cuidado e amor.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), representada pela Diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, pela oportunidade de aprendizado e acolhimento, essenciais para o meu crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da FORP - USP, representado pelo coordenador Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro, por sua dedicação, competência e empenho em oferecer um programa de excelente qualidade.

À Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza, chefe do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e suporte durante os anos de pós-graduação.

Aos Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelos valiosos ensinamentos, pela disponibilidade e paciência em ajudar e por me prepararem para a vida. Devo esse título a vocês.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa fornecida durante o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelos suportes financeiros para o desenvolvimento da pesquisa, nas modalidades de Auxílio à Pesquisa (Processo MCTI/CNPq/Universal 457941/2014-6; e Processo FAPESP 2014/22876-8).

Aos Professores Rubens Albuquerque, Cláudia Lovato, Valéria Pagnano, Takami Hirono Hotta, Wilson Matsumoto que através do Programa PAE e Programa de monitoria, pude aprender sobre as responsabilidades e vida diária na docência.

*À **Profa. Dra. Fernanda Panzeri**, por me permitir conhecer a FORP/USP antes mesmo de ingressar no doutorado. Obrigado por me incentivar a sair da zona de conforto. Grato pelos conselhos, pela amizade, pelas oportunidades.*

*À **Profa. Dra. Alma Blásida**, pela amizade construída. Você é um ser humano incrível. Seus conselhos são valiosos. Obrigado por me fazer sonhar com dias melhores.*

*Aos **Funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, especialmente ao **Júlio, Eduardo, Henrique, Sérgio, Marcelo, Paulo Sérgio, Fernando, Godoy**, pela inestimável disponibilidade, eficiência e colaboração durante o período do doutorado em **Reabilitação Oral**.*

*Às **Funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Fernanda Talita, Denise Martins e Regiane Tirado**, pela disponibilidade, atenção, paciência e carinho.*

*Aos **Funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Mary Possani e Carlos Feitosa**, pelas informações e orientações disponibilizadas.*

*Aos **funcionários das Clínicas da FORP-USP, Fernando, Karina, Gledson, José, Roberta, Vera, Dani e Silvia**, pela organização, amabilidade, e pelo trabalho incrível que é desenvolvido todos os dias.*

*À **Viviane de Cássia**, técnica do Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral, muito obrigada por toda ajuda concedida durante o desenvolvimento desse trabalho.*

*À **Ana Paula Macedo, Adriana Queiroz, Rafaella Torrieri, Edson Volta e Emerson Santos** pelo auxílio durante os experimentos e acolhida calorosa em seus laboratórios.*

*À **Ana Riul e Millena Manguiera** pela amizade verdadeira construída, pelos momentos inesquecíveis, pela confiança adquirida e por todo aprendizado compartilhado. Saibam que sempre podem contar comigo!*

Aos amigos **Frank Lucarini, Isadora Vilarinho e Bruno Crozeta**, por serem a minha família em Ribeirão Preto. Obrigado pela amizade, convivência harmoniosa, pelos momentos de descontração e aprendizado.

A todos os meus **amigos da pós-graduação**, pelas experiências compartilhadas, pelas palavras amigas, pelo ótimo convívio. Com vocês os dias tensos foram mais tranquilos.

Aos meus amigos mestres, **Profa. Dra. Maria Ângela e Prof. Dr. Carlos Falcão**, que sempre me incentivaram, e desde a graduação abriram caminhos para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha eterna orientadora, **Profa. Dra. Carmem Dolores**, pela confiança em mim depositada, pela disponibilidade em sempre ajudar e amizade.

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

Meus sinceros agradecimentos!

Resumo

Silva, TSO. **Análise genômica do biofilme formado em implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio e seu impacto sobre a saúde dos tecidos peri-implantares: estudo longitudinal de 3 anos.** [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2018.

Devido à crescente utilização de componentes cerâmicos como estruturas de suporte para restaurações sobre implantes e a ausência de resultados conclusivos, em longo prazo, sobre a influência deste tipo de material no processo de formação e manutenção do biofilme oral e saúde dos tecidos peri-implantares, este estudo teve por objetivo investigar o perfil microbiano do biofilme formado sobre próteses unitárias de implantes com conectores de zircônia (Zr) ou titânio (Ti) e sua implicação clínica nos tecidos de suporte ao longo de 3 anos de função. Vinte indivíduos saudáveis participaram do estudo e foram reabilitados com implantes dentários e coroas protéticas unitárias cimentadas sobre conectores de zircônia (n=10; região anterior de maxila) ou conectores de titânio (n=10; região posterior da mandíbula). Amostras de biofilmes supra e subgengival, e dados de indicadores clínicos (profundidade e sangramento à sondagem, recessão gengival e nível ósseo marginal) foram coletados dos sítios peri-implantares e dentes contralaterais em 4 períodos distintos, na instalação da prótese (T0) e após 12 (T1), 24 (T2) e 36 (T3) meses de função mastigatória. Trinta e sete espécies microbianas foram identificadas e quantificadas pelo método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Os dados foram submetidos à análise estatística não-paramétrica de regressão linear mista (Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments) e múltiplas comparações foram realizadas por meio do teste de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg False Discovery Rate* (FDR). Para análise da reabsorção óssea marginal foi utilizado o teste *Two-Way ANOVA*. Todas as análises foram realizadas com um nível de significância de 5%. O perfil microbiano detectado nos implantes restaurados com conectores de zircônia, titânio e seus respectivos dentes contralaterais foi semelhante a partir do período de 12 meses de investigação. Espécies patogênicas e não-patogênicas foram detectadas nos biofilmes supra e subgengival dos dois substratos, com um aumento significativo da quantificação das espécies ao longo do tempo. Apesar do perfil semelhante, os substratos investigados influenciaram na quantidade total de micro-organismos identificados ($p<0,05$). Os conectores de Zr apresentaram maior quantificação de genomas totais nas amostras subgengivais quando comparadas aos conectores de Ti ($p<0,05$). A profundidade de sondagem reduziu nos implantes com Zr após 12 meses, enquanto nos implantes com Ti aumentou no mesmo período ($p<0,05$). O sangramento à sondagem e a recessão gengival aumentaram ao longo do tempo para Zr e Ti. Não houve

diferença significativa nos valores da reabsorção óssea marginal, entre os dois materiais, após 36 meses ($p>0,05$). De modo geral, pode-se concluir que o perfil microbiano dos biofilmes supra e subgengival dos implantes com Zr ou Ti foi semelhante, com um aumento da quantificação das espécies ao longo do tempo. A microbiota investigada neste estudo parece não ter influenciado os indicadores clínicos ao longo dos 36 meses de acompanhamento. Os resultados clínicos sugerem a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares nos diferentes substratos investigados.

Palavras-chave: Implantes dentários; Conectores protéticos; Titânio; Zircônia; Avaliação clínica; Microbiologia.

Abstract

Silva, TSO. **Genomic analysis of biofilm formed on implant restorations with zirconia or titanium abutments and its impact on the health of peri-implant tissues: 3-year follow-up.** [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2018.

Due to the increasing use of ceramic abutments as support structures for implant restorations and the lack of long-term conclusive results on the influence of this type of material on the oral biofilm formation and maintenance of peri-implant tissue health, the purpose of this study was to investigate the microbial biofilm profiles of single-implant restorations using zirconia (Zr) or titanium (Ti) abutments and their clinical implications in the supporting tissues over a 3-year period. Twenty healthy subjects participated in the study and were rehabilitated with single-unit implant restorations cemented on zirconia ($n = 10$; anterior maxilla) or titanium abutments ($n = 10$; posterior mandible). Supra and subgingival biofilm samples, and clinical parameters data (probing depth and bleeding on probing, gingival recession and marginal bone level) were collected from the peri-implant sites and contralateral teeth at 4 different time-periods, at the prosthesis installation (T0) and after 12 (T1), 24 (T2) and 36 (T3) months of loading. Thirty-seven microbial species were identified and quantified by DNA-DNA Checkerboard hybridization method. The data were submitted to Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments followed by Friedman-Conover multiple comparisons test, corrected by Benjamin-Hockberg False Discovery Rate (FDR). Two-Way repeated ANOVA was used to analyze marginal bone resorption. Statistical significance was set at 0.05 probability level. The microbial profiles detected in the implants restored with zirconia or titanium abutments and their respective contralateral teeth were similar from the 12-month follow-up. Pathogenic and non-pathogenic species were detected in the supra and subgingival biofilms of the two substrates, with a significant increase in the microbial counts over time. Despite the similar profile, the investigated substrates influenced the total amount of microorganisms identified ($p < 0.05$). The Zr abutments presented higher total genome counts in the subgingival samples when compared to Ti abutments ($p < 0.05$). The probing depth reduced in the implants with Zr after 12 months, whereas in the implants with Ti increased in the same period ($p < 0.05$). Bleeding on probing and gingival recession increased over time for both Zr and Ti. There was no significant difference in marginal bone resorption values between the two materials after 36 months ($p > 0.05$). Overall, it can be concluded that the microbial profile of supra and subgingival biofilms of the implants with Zr or Ti was quite similar, and the microbial counts increased over time. The microbiota investigated in this study does not

seem to have influenced the clinical parameters during the 36 months of follow-up. The clinical results suggest the maintenance of peri-implant tissue health in the different substrates investigated.

Key words: Dental implants; Prosthetic abutments; Titanium; Zirconia; Clinical evaluation; Microbiology.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Delineamento experimental do estudo.....	62
Figura 2-	Guias cirúrgicos confeccionados para auxiliar no correto posicionamento dos implantes dentários. A: Guia cirúrgico para instalação de implante na região anterior de maxila; B: Guia cirúrgico para instalação de implante na região posterior de mandíbula.....	65
Figura 3-	Coleta do biofilme supragengival aderido na superfície externa das coroas protéticas e coroas dos dentes contralaterais com auxílio de escova do tipo <i>microbrush</i> . A: Coleta na região vestibular; B: Coleta na região palatina; C: armazenamento da amostra em microtubo individual contendo 150µL de TE e 150µL de NaOH.....	66
Figura 4-	Coleta do biofilme subgengival com auxílio de cones de papel esterilizados. A: Cones de papel inseridos na parte mais apical do sulco vestibular (regiões mesial, central e distal); B: Cones de papel inseridos no sulco palatino (regiões mesial, central e distal); C: Cones com biofilme sendo armazenados em um mesmo microtubo contendo 150µL de TE e 150µL de NaOH.....	67
Figura 5-	Extração do DNA genômico. A: Centrifugação da cultura a 6000 rpm por 5 minutos; B: Obtenção do precipitado (<i>Pellet</i>) da cultura líquida; C: Transferência do precipitado para microtubos e centrifugação a 13200 rpm por 7 minutos; D e E: Precipitado ressuspensionado em 700 µL de tampão de extração com proteinase K; F: Incubação a 65°C durante 30 minutos em banho-maria.....	70
Figura 6-	Extração do DNA genômico. A: Adição de 650 µL de CIA (Clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1) e homogeneização até a formação de duas fases na solução, com posterior centrifugação a 13200 rpm, por 7 minutos; B: Transferência da fase aquosa para um novo microtubo, adição de 250 µL de tampão de extração sem proteinase K e 650 µL de CIA, homogeneização e centrifugação a 13200 rpm, durante 7 minutos; C: Transferência da fase aquosa para outro microtubo, adição de 650 µL de CIA, homogeneização e centrifugação a 13200 rpm, por 7 minutos.....	71
Figura 7-	Extração do DNA genômico. A: Precipitação do DNA com 1 volume de isopropanol; B: Lavagem do DNA do micro-organismo com 50 µL de etanol a 70%; C: Ressuspensão do DNA precipitado com 20 µL de tampão TE, 1 µL de RNase 10 µg/mL e incubação em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos.....	72

Figura 8-	Análise da integridade do DNA extraído. A: Depositar no primeiro casulo do gel de agarose 0,8% o marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III, 500 µg/mL) e nos demais casulos, a mistura contendo DNA de cada espécie, <i>Loading Buffer</i> , <i>Gel Red</i> e tampão TE; B: Aplicação de corrente 70v e 100 mA sobre a cuba de eletroforese por 90 minutos.....	73
Figura 9-	Marcação das sondas de DNA genômico. A: Reagentes de marcação (água ultrapura, <i>cross-linker solution</i> , <i>reaction buffer</i> e <i>labelling reagent</i> , respectivamente); B: Conjunto de sondas marcadas das 37 espécies-alvo do estudo.....	74
Figura 10-	Amostras de DNA genômico das 37 espécies-alvo de detecção nas concentrações de 10 ⁵ e 10 ⁶ células microbianas (Padrões)	75
Figura 11-	Processamento das amostras. A: Desnaturação do DNA das amostras de biofilme; B: Neutralização das amostras com adição 800 µL de acetato de amônio 5 M.....	76
Figura 12-	A: Aparelho <i>Minislot</i> 30 aberto; B: Posicionamento da membrana de nylon sobre uma das placas do aparelho; C: Membrana posicionada no <i>Minislot</i> 30 fechado; D: Aplicação das amostras de DNA e padrões de comparação 10 ⁵ e 10 ⁶ em canaletas individuais; E: Membrana posicionada em um invólucro de papel kraft; F: fixação do DNA das amostras e padrões na membrana por meio de calor em estufa (120°C durante 20 minutos)	77
Figura 13-	A: Reagentes para o preparo da solução de pré-hibridização (<i>Blocking reagent</i> , NaCl 1 M e <i>Hybridization Buffer</i> , respectivamente); B: Aplicação da solução preparada sobre a membrana; C: Membrana embalada em um invólucro de plástico; D: Pré-hibridização em forno a 63,5°C, durante 6 horas.....	78
Figura 14-	A: <i>Miniblotter</i> 45 para aplicação das sondas genômicas marcadas; B: Membrana posicionada no interior do <i>Miniblotter</i> 45; C: Sondas aplicadas individualmente nas canaletas do dispositivo; D: Embalagem do dispositivo e posicionamento para a reação de hibridização em forno a 63,5°C, durante 16 horas.....	79
Figura 15-	Lavagem das membranas sob agitação vigorosa, em forno de hibridização....	80
Figura 16-	A: Aplicação do reagente de detecção sobre a membrana; B: Membrana embalada com filme plástico de Policloreto de Vinila (PVC)	81
Figura 17-	A: Membrana posicionada no cassete de autorradiografia; B: Exposição do filme autorradiográfico durante 1 hora.....	82

Figura 18-	Esquema ilustrando uma reação de hibridização pelo método DNA-DNA <i>Checkerboard</i>	82
Figura 19-	A: Imagem da membrana vista no software CLIQS 1D®; B: Delimitação das 37 canaletas em que foram aplicadas as sondas; C: Delimitação dos sinais de hibridização a serem quantificados; D: Comparação de todos os sinais delimitados com os padrões contendo 10^5 e 10^6 células de cada espécie-alvo, e obtenção dos resultados.....	83
Figura 20-	A: Sistema computadorizado de sondas periodontais Florida Probe®; B: Imagem representativa da avaliação da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival por meio do sistema Florida Probe®.....	84
Figura 21-	A: Técnica do paralelismo para obtenção de radiografias periapicais; B: Mensuração do nível ósseo marginal (região mesial e distal) por meio do <i>Software ImageJ-Fiji 1.43</i> . Seta vermelha: calibração da escala (em mm) com paquímetro digital. A: ponto de referência na plataforma do implante. B: ponto sobre a região mais alta da crista óssea alveolar.....	86
Figura 22-	Fluxograma contendo os dados de recrutamento, alocação e acompanhamento dos participantes ao longo do estudo.....	92
Figura 23-	Gráfico de linhas ilustrando o efeito relativo dos fatores substrato, tempo (barras verticais) e suas interações na profundidade de sondagem.....	95
Figura 24-	Gráfico de linhas ilustrando o efeito relativo dos fatores substrato, tempo (barras verticais) e suas interações no sangramento à sondagem.....	97
Figura 25-	Gráfico de linhas ilustrando o efeito relativo dos fatores substrato, tempo (barras verticais) e suas interações na recessão gengival.....	99
Figura 26-	Análise da integridade do DNA extraído de algumas espécies em gel de agarose 0,8%. O primeiro casulo do gel de agarose 0,8% contém o marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III,) e nos demais casulos, a mistura contendo DNA de cada espécie, <i>Load Buffer</i> , <i>Gel Red</i> e tampão TE. Marcação em vermelho: posicionamento dos fragmentos de DNA no gel de agarose 0,8%.....	101
Figura 27-	Teste de hibridização demonstrando a sensibilidade das sondas marcadas. Vertical: os números de 1 a 28 representam amostras de biofilme supragengival; as duas últimas colunas contêm uma mistura dos padrões de referência das 37 espécies-alvo nas concentrações de 10^5 e 10^6 células microbianas; Horizontal: sondas marcadas com o mesmos DNA usados para a confecção dos padrões de referência.....	102

Figuro 28-	Gráfico <i>Box Plot</i> da quantificação de genomas totais ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo de detecção identificadas no biofilme supragengival e subgengival dos sítios relacionados aos conectores protéticos de zircônia, titânio e dentes contralaterais ao longo do tempo.....	104
Figura 29-	Gráfico de linhas contendo o efeito relativo dos fatores sítio, substrato, tempo e suas interações na quantificação de genomas totais ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo de detecção.....	105
Figura 30-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival formado sobre as coroas protéticas dos implantes restaurados com conectores de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	109
Figura 31-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival dos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	110
Figura 32-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	111
Figura 33-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	112
Figura 34-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival formado sobre as coroas protéticas dos implantes restaurados com conectores de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	113
Figura 35-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival de implantes restaurados com conectores protéticos de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	114

Figura 36-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	115
Figura 37-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.....	116
Figura 38-	Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme supragengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia ou titânio.....	118
Figura 39-	Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme subgengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia ou titânio.....	119
Figura 40-	Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme supragengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia e dentes contralaterais (controle)	120
Figura 41-	Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme subgengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia e dentes contralaterais (controle)	121
Figura 42-	Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme supragengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de titânio e dentes contralaterais (controle)	122
Figura 43-	Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme subgengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de titânio e dentes contralaterais (controle)	123

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Caracterização da amostra quanto ao gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, por grupo (zircônia ou titânio), nos diferentes períodos investigados.....	93
Tabela 2-	Média e desvio padrão ($\pm$ DP) dos indicadores clínicos dos sítios periodontais e peri-implantares dos indivíduos reabilitados com conectores protéticos de zircônia ou titânio ao longo do tempo.....	94
Tabela 3-	Análises estatísticas sobre o efeito dos fatores substrato, tempo e suas interações na profundidade de sondagem.....	95
Tabela 4-	Análise dos fatores substrato, tempo e suas interações no sangramento à sondagem.....	96
Tabela 5-	Análise dos fatores substrato, tempo e suas interações na recessão gengival.....	98
Tabela 6-	Valores de reabsorção óssea marginal (mm, média $\pm$ DP) dos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia ou titânio após 12, 24 e 36 meses de função.....	99
Tabela 7-	Concentração e grau de pureza dos DNAs extraídos obtidos por meio de leitura em espectrofotômetro.....	100
Tabela 8-	Análise do efeito relativo dos fatores sítio de coleta do biofilme, substrato, tempo e suas interações.....	108
Tabela 9-	Mediana e Intervalo de Confiança (IC 95%) da quantificação de genomas totais ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo de detecção, identificadas no biofilme formado sobre as coroas cerâmicas e coroas de dentes contralaterais (biofilme supragengival), e no sulco peri-implantar dos implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio, e sulco periodontal dos dentes contralaterais (biofilme subgengival), ao longo do tempo.....	106
Tabela 10-	Análise dos efeitos relativos dos fatores espécie microbiana, tempo, substrato e suas interações.....	124
Tabela 11-	Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme supragengival formado sobre as coroas protéticas cimentadas sobre os conectores de zircônia e titânio.....	125
Tabela 12-	Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme subgengival dos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio.....	127
Tabela 13-	Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme supragengival dos dentes contralaterais aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio.....	129

Tabela 14-	Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme subgingival dos dentes contralaterais aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio.....	131
-------------------	--	------------

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	47
2. PROPOSIÇÃO	57
3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1. Delineamento experimental	61
3.2. Cálculo do tamanho da amostra	63
3.3. Seleção dos participantes	63
3.4. Instalação dos implantes e próteses	64
3.5. Avaliação microbiológica	65
3.5.1. Coleta das amostras de biofilme supragengival e subgengival	65
3.5.2. Processamento microbiológico pela técnica de hibridização DNA-DNA <i>Checkerboard</i>	67
3.6. Avaliação dos indicadores clínicos	83
3.7. Avaliação radiográfica	85
3.8. Análise dos Dados	86
4. RESULTADOS	91
4.1. População amostral	91
4.2. Indicadores clínicos	93
4.2.1. Profundidade de sondagem	95
4.2.2. Sangramento à sondagem	96
4.2.3. Recessão gengival	98
4.3. Reabsorção óssea marginal	99
4.4. Resultados microbiológicos	100
4.4.1. Extração do DNA genômico das espécies-alvo	100
4.4.2. Avaliação da integridade dos DNAs genômicos extraídos em gel de agarose 0,8%	100
4.4.3. Resultado do teste de sensibilidade das sondas marcadas	101
4.4.4. Quantificação microbiana total	102
4.4.5. Quantificação das espécies microbianas	107
5. DISCUSSÃO	135
6. CONCLUSÕES	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
ANEXO	167
APÊNDICE	171

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O uso de implantes dentários para reabilitação de pacientes parcialmente ou totalmente desdentados é um tratamento seguro e previsível em longo prazo (PJETURSSON et al., 2004; PJETURSSON et al., 2012; MUDDUGANGADHAR et al., 2015). Revisões sistemáticas e meta-análises de estudos prévios publicados relatam taxas de sobrevivência de 96,8% a 97,2% para implantes restaurados com coroas unitárias em 5 anos de acompanhamento (JUNG et al., 2008; JUNG et al., 2012) e de 95,2% aos 10 anos (JUNG et al., 2012). De modo semelhante, altas taxas de sobrevivência foram verificadas para coroas unitárias implanto-suportadas, variando de 94,5% a 96,36% em 5 anos (JUNG et al., 2012; MUDDUGANGADHAR et al., 2015) e 89,4% após 10 anos de função (JUNG et al., 2012). O tratamento com implantes dentários também pode ser utilizado com sucesso em pacientes com diagnóstico de periodontite que foram submetidos a adequada terapia periodontal e terapia de manutenção periódica (taxa de sobrevivência de 92,1% após 10 anos de acompanhamento) (ZANGRANDO et al., 2015). No entanto, a instalação de implantes em locais com periodontite previa está associada com maior incidência de complicações biológicas. Além disso, formas severas de doença periodontal estão associadas a maiores taxas de perda de implantes (ONG et al., 2008; SOUSA et al., 2016; VEITZ-KEENAN; KEENAN, 2017).

Apesar das altas taxas de sobrevivência reportadas na literatura, o tratamento com implantes dentários está propenso a complicações biológicas e consequente falha, mesmo após a osseointegração (KLINGE; MEYLE; WORKING, 2012). As complicações tardias são atribuídas a resposta biológica do hospedeiro frente a presença de biofilme bacteriano (LANG; WILSON; CORBET, 2000; KLINGE; MEYLE; WORKING, 2012), e sobrecarga oclusal em sítios peri-implantares não saudáveis (NAERT; DUYCK; VANDAMME, 2012). Os implantes dentários e seus componentes protéticos são propensos à colonização bacteriana e à formação de biofilme em curto tempo (FURST et al., 2007). O biofilme oral consiste em comunidades polimicrobianas complexas, com função e estrutura bem organizadas, que sintetizam matriz polimérica extracelular (DO; DEVINE; MARSH, 2013; SAMARANAYAKE; MATSUBARA, 2017). A adesão bacteriana nas diversas superfícies da cavidade oral é precedida pela formação da película adquirida, constituída por glicoproteínas, fosfoproteínas e lipídios (MARSH et al., 2016; LARSEN; FIEHN, 2017). Interações físico-químicas fracas (força de van der Waals) entre os micro-organismos e a película adquirida são inicialmente estabelecidas, seguidas de interações mais fortes entre as adesinas bacterianas e os receptores glicoproteicos da película (MARSH et al., 2016). A diversidade microbiana aumenta gradativamente por meio da co-

agregação de colonizadores tardios aos receptores dos micro-organismos já aderidos, formando um biofilme multiespécie (MARSH; ZAURA, 2017). Os colonizadores iniciais associados ao biofilme oral pertencem predominantemente aos gêneros *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Veillonella* (DIAZ et al., 2006). Espécies de *Fusobacterium* desempenham importante função na formação do biofilme oral maduro, uma vez que estas bactérias se agregam tanto à colonizadores iniciais (predominantemente Gram-positivos), quanto a colonizadores tardios (bactérias Gram-negativas, incluindo espécies periodonto-patogênicas) (LARSEN; FIEHN, 2017).

Uma limitação inerente aos sistemas de implantes dentários é a presença de micro espaços na interface entre o implante e conector protético (PASSOS et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015). Estudos *in vivo* tem demonstrado a presença de colonização bacteriana na parte interna dos implantes dentários, como consequência do fluxo bidirecional de fluídos e bactérias através da interface implante/conector (COSYN et al., 2011; CANULLO; PENARROCHA-OLTRA; SOLDINI; et al., 2015; MAWHINNEY et al., 2015). A infiltração microbiana através da interface é aumentada pela presença de carga mecânica (DO NASCIMENTO; MIANI; et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2015) e ocorre independentemente do tipo de conexão (PASSOS et al., 2013), uma vez que ainda não existe sistemas de implantes dentários que forneçam completa vedação da interface (SCHMITT et al., 2014). No entanto, o sistema de conexão cônico parece ser mais eficiente em relação aos aspectos biológicos, permitindo menor penetração bacteriana e perda óssea em implantes unitários (SCHMITT et al., 2014; GOIATO et al., 2015). Espécies bacterianas periodonto-patogênicas foram detectadas no compartimento interno de implantes dentários e superestruturas, que podem atuar como reservatório de patógenos e impactar na recolonização do sulco peri-implantar (COSYN et al., 2011). Além disso, a colonização interna de implantes demonstrou estar associado com a perda óssea peri-implantar (JERVOE-STORM et al., 2015). Uma recente revisão sistemática investigou a possível influência da colonização microbiana na interface implante/conector sobre a peri-implantite e demonstrou maiores contagens microbianas de bactérias patogênicas periodontais dentro da interface implante/conector protético em pacientes com peri-implantite em comparação aos implantes com tecidos peri-implantares saudáveis (TALLARICO et al., 2017).

As experiências do tratamento com implantes dentários, aliado ao alto impacto das complicações clínicas e perda do implante na vida do paciente, tem impulsionado o desenvolvimento de melhorias no desempenho das restaurações implanto-suportadas (KASHBOUR et al., 2015). As estratégias incluem o desenvolvimento de materiais para

conectores protéticos com características de superfícies que possibilitem melhor desempenho biológico, tais como, menor adesão microbiana e melhor estabilidade dos tecidos moles ao redor dos implantes e componentes (DE AVILA et al., 2013). Metais preciosos, metais básicos e materiais cerâmicos, como a alumina e a zircônia, têm sido reportados na literatura para fabricação de conectores protéticos (ABRAHAMSSON; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; WELANDER; ABRAHAMSSON; BERGLUNDH, 2008). A conexão dos tecidos moles ao redor dos implantes dentários atua como uma barreira de proteção entre a cavidade oral e o tecido ósseo peri-implantar (SHIBLI et al., 2008; WELANDER; ABRAHAMSSON; BERGLUNDH, 2008). Desse modo, o material do conector protético pode influenciar no selamento da mucosa e na manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares (ABRAHAMSSON; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; LINKEVICIUS; VAITELIS, 2015; SICILIA et al., 2015). Os conectores de titânio comercialmente puro são os mais utilizados na reabilitação de implantes dentários e apresentam resultados previsíveis evidenciados por estudos clínicos de longo prazo (NAKAMURA et al., 2010; VAN BRAKEL et al., 2012). A crescente demanda por restaurações implanto-suportadas estéticas, justificam a busca de materiais para conectores protéticos com melhores propriedades ópticas (NAKAMURA et al., 2010). Nesse contexto, materiais cerâmicos, como a zircônia estabilizada com ítrio, têm sido bastante utilizados pela semelhança de cor com a estrutura dental, além de promover melhores resultados estéticos nos tecidos moles com biótipo fino quando comparado ao titânio e por ter bom desempenho biológico (PICONI; MACCAURO, 1999; NAKAMURA et al., 2010; VAN BRAKEL et al., 2012; LINKEVICIUS; VAITELIS, 2015).

A influência da composição química e da topografia de superfície do implante e conector protético na adesão e formação de biofilme bacteriano têm sido relatados em estudos *in vivo* (RIMONDINI et al., 2002; SCARANO et al., 2004; AL-AHMAD et al., 2010; AL-AHMAD et al., 2013; DO NASCIMENTO; DA ROCHA AGUIAR; et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014) e *in vitro* (HAHNEL et al., 2015; DE AVILA; AVILA-CAMPOS; et al., 2016; DE AVILA; DE MOLON; et al., 2016; DE AVILA et al., 2017; ROEHLING et al., 2017), porém ainda não existe consenso sobre como diferentes materiais impactam na colonização bacteriana ao longo do tempo (DE AVILA et al., 2013; DE AVILA et al., 2014). O aumento da rugosidade de superfície acima de 0,2 μm e da energia de superfície livre, facilitam a formação de biofilme sobre materiais restauradores (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995; BOLLEN et al., 1996; TEUGHELIS et al., 2006). Estudos clínicos de curta duração revelaram ampla diversidade de micro-organismos colonizando sítios restaurados com implantes e conectores protéticos de titânio ou zircônia, desde os estágios iniciais de formação do biofilme

(VAN BRAKEL et al., 2011) até 6 meses após função (NASCIMENTO et al., 2016; DE FREITAS et al., 2018). As comunidades bacterianas que colonizam os substratos de titânio e zircônia são semelhantes às encontradas nos dentes remanescentes (NASCIMENTO et al., 2016; DE FREITAS et al., 2018; RAFFAINI et al., 2018). Os resultados microbiológicos sugerem que a colonização microbiana parece ser sítio-específica, e o titânio e a zircônia parecem apresentar prevalência seletiva para algumas espécies bacterianas (NASCIMENTO et al., 2016; DE FREITAS et al., 2018). Além disso, alguns estudos relataram menor acúmulo de biofilme nos conectores de zircônia em relação aos de titânio (SCARANO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2014; ROEHLING et al., 2017).

A identificação do perfil microbiano do biofilme associado à diferentes superfícies presentes na cavidade oral é essencial para entender os mecanismos envolvidos na colonização microbiana e o potencial desenvolvimento de doenças (NASCIMENTO et al., 2016; DE FREITAS et al., 2018). Métodos de diagnóstico molecular foram desenvolvidos durante as últimas décadas e têm sido extensivamente usados na detecção e quantificação de espécies microbianas em ecossistemas complexos, presente na cavidade oral (SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005; CHARALAMPAKIS; BELIBASAKIS, 2015). A técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*, descrita por Sockansky e colaboradores (SOCRANSKY et al., 1994) utiliza sondas confeccionadas a partir de DNA genômico, e apresenta como principal vantagem a identificação e quantificação de diversas espécies microbianas em um grande número de amostras da cavidade oral (SOCRANSKY et al., 1994; SOCRANSKY et al., 2004; SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005), além disso, essa técnica é rápida, sensível e relativamente barata (SOCRANSKY et al., 2004).

O método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* supera algumas limitações das técnicas tradicionais de cultura microbiológica (PAPAPANOU et al., 1997), pois não é dependente da viabilidade celular e representa grande vantagem em estudos que avaliam micro-organismos anaeróbios, uma vez que, a morte celular pode ocorrer durante a coleta ou transporte das amostras de biofilme (SOCRANSKY et al., 2004; BARBOSA et al., 2009). As técnicas de cultura microbiológica podem falhar na detecção de micro-organismos incultiváveis ou fastidiosos, além disso, a diluição seriada em procedimentos microbiológicos, especialmente com micro-organismos anaeróbios, e a cultura de espécies com tendência de auto agregação podem refletir em menores contagens de células bacterianas (PAPAPANOU et al., 1997; SOCRANSKY et al., 2004). Essas limitações são evidenciadas em alguns estudos que relataram menor detecção da microbiota subgengival pelo método tradicional de cultura quando

comparado à hibridização de DNA (VAN STEENBERGEN et al., 1996; PAPAPANOU et al., 1997; BARBOSA et al., 2009).

O método original proposto por Socransky e colaboradores (SOCRANSKY et al., 1994) utiliza sondas de DNA genômico das espécies-alvo marcadas com digoxigenina, hibridizadas com amostras de biofilme oral, seguidas por detecção quimioluminescente, como resultado de uma reação antígeno-anticorpo. Protocolos alternativos foram propostos, com o objetivo de reduzir tempo de processamento e custo dos materiais (DO NASCIMENTO et al., 2008; DO NASCIMENTO et al., 2010). Nascimento e colaboradores (2010) utilizaram a marcação direta e rápida das sondas com enzima fosfatase alcalina termoestável, seguido de detecção por quimioluminescência e obtiveram resultados comparáveis à técnica original, com boa sensibilidade, especificidade e tempo de processamento reduzido (DO NASCIMENTO et al., 2010). Além do rigor técnico envolvido nas etapas de processamento, atenção especial deve ser dada no armazenamento das amostras que serão submetidas à análise molecular, uma vez que a degradação e contaminação do material genético coletado pode ter impacto na detecção e quantificação dos micro-organismos (KATSOULIS et al., 2005; KATSOULIS; LANG; PERSSON, 2005; DO NASCIMENTO; MULLER; et al., 2012; DO NASCIMENTO et al., 2014). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que as amostras contendo DNA devem ser processadas imediatamente após as coletas, pois a intensidade dos sinais de hibridização diminui significativamente após longos períodos de armazenamento (KATSOULIS; LANG; PERSSON, 2005; DO NASCIMENTO; MULLER; et al., 2012; DO NASCIMENTO et al., 2014), além disso, temperaturas mais frias foram mais eficazes na preservação do material genético das amostras armazenadas e processadas pelo método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* (DO NASCIMENTO et al., 2014).

Esta técnica tem sido amplamente utilizada em diversas áreas da odontologia para avaliar a microbiota associada ao biofilme subgengival (SOCRANSKY et al., 1998; DO NASCIMENTO et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2015) e supragengival (HAFFAJEE et al., 2008; DO NASCIMENTO et al., 2015); investigar a composição do biofilme bacteriano em condições de saúde ou doença (XIMENEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000a; 2000b; SHIBLI et al., 2008; TELES et al., 2010; VETTORE et al., 2010); verificar a associação entre o biofilme bacteriano e fatores locais ou sistêmicos (DESVARIEUX et al., 2010; DESVARIEUX et al., 2013; LIRA-JUNIOR et al., 2018); identificar a composição do biofilme como resultado do tratamento de terapias periodontais (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000); avaliar a microbiota associada com lesões endodônticas (DE MIRANDA; COLOMBO, 2017; TRICHES et al., 2018) e a atividade antimicrobiana de soluções higienizadoras de prótese

(SEGUNDO ADE et al., 2014; BADARO et al., 2017). Esta técnica também foi utilizada para investigar a infiltração microbiana na interface implante/conector protético (BARBOSA et al., 2009; DO NASCIMENTO; PEDRAZZI; et al., 2009; DO NASCIMENTO; MIANI; et al., 2012; PITA et al., 2017) e através do orifício de acesso ao parafuso do conector de próteses parafusadas (ALSHEHRI; ALBAQIAH, 2017; DO NASCIMENTO et al., 2017). Além disso, o método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* também foi utilizado em estudos *in vivo* para identificar e quantificar espécies microbianas presentes no biofilme formado sobre diferentes materiais utilizados na confecção de conectores protéticos (DO NASCIMENTO; PITA; et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016; RAFFAINI et al., 2018).

A relação entre espécies bacterianas presentes no biofilme subgengival (SOCRANSKY et al., 1998) e supragengival (HAFFAJEE et al., 2008) foram investigadas em indivíduos saudáveis e com periodontite crônica, por meio do método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Associações específicas entre espécies bacterianas presentes no biofilme, bem como as relações entre os diferentes complexos microbianos foram detectadas. As espécies bacterianas relacionadas entre si foram agrupadas em complexos (vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo), e associadas com parâmetros clínicos da doença periodontal (SOCRANSKY et al., 1998; HAFFAJEE et al., 2008). A composição microbiana ao redor de implantes saudáveis e com peri-implantite também foi investigada na literatura (CANULLO; PENARROCHA-OLTRA; COVANI; et al., 2015; ZHUANG et al., 2016; CANULLO et al., 2017), no entanto, as evidências mostram resultados controversos devido à grande heterogeneidade dos métodos de diagnóstico microbiológico (PADIAL-MOLINA et al., 2016) e delineamento experimental utilizados nas investigações (PEREZ-CHAPARRO et al., 2016; LAFAURIE et al., 2017). A colonização de implantes dentários e estruturas associadas é semelhante ao biofilme em torno de dentes remanescentes (LARSEN; FIEHN, 2017), assim, sítios saudáveis e doentes na mesma boca podem abrigar perfis microbianos semelhantes (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Revisões sistemáticas investigaram a composição microbiana em sítios com implantes saudáveis, peri-implantite e doença periodontal (PEREZ-CHAPARRO et al., 2016; RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016; LAFAURIE et al., 2017) e indicaram associação de espécies do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) e algumas espécies do complexo laranja (*Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella nigrescens*) com a etiologia da doença peri-implantar (PEREZ-CHAPARRO et al., 2016; LAFAURIE et al., 2017).

Evidências na literatura mostram que a colonização microbiana no sulco peri-implantar (LINDHE; MEYLE; GROUP, 2008; SALVI; COSGAREA; SCULEAN, 2017) e na interface implante/conector protético (TALLARICO et al., 2017), podem levar a uma reação inflamatória nos tecidos peri-implantares e, associados a sobrecarga oclusal (CHAMBRONE; CHAMBRONE; LIMA, 2010; AFRASHTEHFAR; AFRASHTEHFAR, 2016), podem comprometer o sucesso em longo prazo do tratamento com implantes dentários. A introdução de diferentes materiais utilizados para fabricação de conectores protéticos, com características de superfície e composições específicas, pode influenciar diretamente na adesão e manutenção do biofilme oral nos tecidos de suporte ao redor do implante e, consequentemente, ter um impacto significativo sobre a patogênese peri-implantar (DE AVILA et al., 2014).

Investigações sobre adesão bacteriana e formação de biofilme em implantes dentários e conectores protéticos são clinicamente relevantes, pois os resultados podem contribuir para o monitoramento e manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares, além do desenvolvimento de estratégias para o tratamento da peri-implantite estabelecida e de novos materiais ou tratamentos de superfície que reduzam ou inibam a adesão de micro-organismos patogênicos. O uso de métodos de diagnóstico molecular baseados na análise do genoma pode fornecer informações sobre o perfil microbiano associado às superfícies e à suscetibilidade dos tecidos de suporte ao desenvolvimento da doença. Dados sobre o perfil microbiano do biofilme formado em diferentes materiais para conectores protéticos e seu impacto nos indicadores clínicos ainda não são conclusivos, principalmente pela escassez de informações em longo prazo. Portanto, com base na limitação do conhecimento atual, este estudo buscou abordar as seguintes questões de pesquisa: (I) Existe diferença no perfil microbiano formado sobre conectores de zircônia ou titânio?; (II) Qual a implicação clínica da colonização microbiana nos tecidos peri-implantares relacionados aos sítios com conectores protéticos de zircônia ou titânio?

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar o perfil microbiano do biofilme formado sobre próteses unitárias de implantes com conectores de zircônia ou titânio e sua implicação clínica nos tecidos de suporte ao longo de 3 anos de função.

Objetivos específicos

- ✓ Comparar os indicadores clínicos de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, recessão gengival e reabsorção óssea marginal em implantes unitários restaurados com conectores protéticos de titânio ou zircônia, nos períodos T0 = *baseline* (instalação da prótese), T1 = 12 meses, T2 = 24 meses e T3 = 36 meses após a instalação da prótese.
- ✓ Identificar e quantificar, por meio da técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*, as espécies microbianas colonizando o biofilme supra e subgengival formado sobre as restaurações com conectores de titânio ou zircônia, desde a sua instalação até o período de 3 anos de função mastigatória.
- ✓ Relacionar os indicadores clínicos investigados com os resultados microbiológicos durante os períodos propostos.

Hipótese nula

A hipótese nula testada foi que os diferentes tipos de conectores protéticos de titânio ou zircônia não influenciam a colonização microbiana ao longo do tempo e, consequentemente, não implicam em alterações significativas nos indicadores clínicos.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Este é um estudo clínico longitudinal prospectivo, de grupos paralelos, que investigou a influência do tipo de material do conector protético, titânio ou zircônia, na formação do biofilme oral sobre as restaurações protéticas e nos tecidos de suporte ao redor do implante e o impacto da colonização microbiana, em longo prazo, na saúde dos tecidos peri-implantares. Este trabalho constitui a segunda etapa de um estudo em que os objetivos propostos foram avaliar o perfil microbiológico e o comportamento clínico de implantes restaurados com os diferentes tipos de conectores (titânio ou zircônia) desde a instalação até o período de 6 meses de função (NASCIMENTO et al., 2016; DE FREITAS et al., 2018). Nesta segunda etapa, foram recrutados os mesmos 20 participantes da primeira etapa, reabilitados com implantes dentários e coroas protéticas unitárias cimentadas sobre conectores fabricados em zircônia na região anterior da maxila (n=10) e conectores de titânio na região posterior da mandíbula (n=10). Foram coletados os dados dos indicadores clínicos da condição dos tecidos peri-implantares, e os biofilmes aderidos na coroa protética (supragengival) e nos sulcos peri-implantares (subgengival) nos períodos T0 = *baseline* (instalação da prótese), T1 = 12 meses, T2 = 24 meses e T3 = 36 meses de função dos implantes. Adicionalmente, foram coletados os dados dos indicadores clínicos e amostras de biofilme supra e subgengival dos dentes contralaterais, para servirem como valores de referência dos dentes remanescentes. O delineamento experimental do estudo está ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Delineamento experimental do estudo.

3.2. Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado com o auxílio do software PASS 2005 (NCSS, Kaysville, EUA). O número de células microbianas foi utilizado como variável primária para a determinação do “n” amostral. Para a comparação de dois grupos independentes (titânio e zircônia) com medidas repetidas realizadas em quatro tempos (*baseline*, 12, 24 e 36 meses) foram considerados os desvios-padrão de 1,26 entre indivíduos e 0,89 intra-indivíduos, valores de desvios estimados a partir da literatura e estudos pilotos. O poder estatístico foi de 84% para o fator grupo e 96% para o fator tempo e interação grupo x tempo, com nível de significância de 5% e magnitude do efeito de 0,79 para o fator grupo e 1,12 para o fator tempo e interação grupo x tempo. O tamanho da amostra obtida a partir desses cálculos foi de 8 indivíduos para cada grupo, sendo acrescido 20% do total da amostra para compensar possíveis perdas de seguimento, totalizando 10 indivíduos por grupo.

3.3. Seleção dos participantes

Este estudo foi realizado com a devida apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (processo 0066.0.138.000-10; anexo A). Na primeira etapa do estudo, 20 indivíduos foram selecionados dentre os pacientes atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, para reabilitação oral envolvendo a colocação de implantes com sistema de conexão cone Morse (Ankylos, Dentsply, Brasil) na região anterior da maxila ou na região posterior da mandíbula. Aos voluntários foi facultado o direito de decidir sobre sua participação ou não nesta segunda fase experimental. Orientações foram dadas quanto aos procedimentos da pesquisa e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice).

Na fase de recrutamento foram incluídas pessoas de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, com boas condições gerais de saúde, presença de espaço protético unitário na região anterior da maxila ou região posterior da mandíbula com indicação para reabilitação com implante, presença de dente antagonista e contralateral à região do implante, ausência de manifestações bucais de doenças sistêmicas ou processos infecciosos agudos na cavidade oral. Os critérios de exclusão foram: gravidez, lactação, tratamento periodontal ou com antibiótico nos últimos 3 meses, presença de qualquer condição sistêmica que possa influenciar na evolução da doença periodontal ou que exija pré-medicação para realização de procedimentos odontológicos, uso de tabaco e presença de gengivite ou periodontite. Todos os indivíduos

participantes da primeira fase do estudo foram contatados e convidados a participar desta segunda etapa.

3.4. Instalação dos implantes e próteses

Na primeira etapa do estudo, todos os participantes receberam implantes com conexão do tipo cone Morse (Ankylos C/X, Dentsply, Brasil) e plataforma de 3,5 mm de diâmetro. O tratamento foi realizado em duas fases distintas: 1º) cirurgia de instalação dos implantes ao nível da crista óssea, em sítios cirúrgicos sem enxerto, com realização de retalho e utilização de guia cirúrgico (Figura 2), seguido de colocação do cicatrizador cirúrgico; e 2º) instalação dos componentes e cimentação das coroas protéticas com cimento temporário (Temp Bond NE, Kerr, EUA) por um período de 6 meses. O tempo médio esperado para a remoção dos cicatrizadores e instalação das próteses foi de 2 meses. Dez indivíduos receberam implantes na região anterior da maxila e foram reabilitados com coroas de cerâmica pura (Lava™ All-Ceramic System, 3M ESPE, EUA), que foram cimentadas de forma definitiva com cimento resinoso (RelyX™ Unicem, 3M ESPE, EUA) sobre os conectores protéticos de zircônia (Cercon Balance C/ reto, Ankylos, EUA). Os outros 10 participantes receberam implantes na região posterior da mandíbula e coroas metalocerâmicas de cobertura total (liga de Ni-Cr revestido com cerâmica feldspática) e foram cimentadas com cimento de fosfato de zinco (SS White, Brasil) sobre conectores protéticos de titânio (Balance posterior C/ reto, Ankylos, EUA). Todos os conectores utilizados foram usinados de fábrica, e não sofreram qualquer tipo de tratamento ou acabamento superficial.

Figura 2 - Guias cirúrgicos confeccionados para auxiliar no correto posicionamento dos implantes dentários. A: Guia cirúrgico para instalação de implante na região anterior de maxila; B: Guia cirúrgico para instalação de implante na região posterior de mandíbula.

Fonte: do Nascimento, Cássio (2014).

3.5. Avaliação microbiológica

3.5.1. Coleta das amostras de biofilme supragengival e subgengival

Para coleta do biofilme supragengival e subgengival, as próteses sobre implantes e os dentes contralaterais foram previamente isolados com roletes de algodão, para minimizar a contaminação das amostras com a saliva. Amostras do biofilme supragengival foram colhidas de toda a superfície externa das coroas protéticas e coroas dos dentes contralaterais, com o auxílio de uma escova do tipo *microbrush* (Figura 3A e 3B). Amostras do biofilme subgengival foram coletadas com o auxílio de 6 cones de papel esterilizados (tamanho 30, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), sendo 3 cones inseridos na parte mais apical do sulco vestibular e 3 cones no sulco lingual/palatino, nas regiões mesial, central e distal das coroas (BELIBASAKIS; SCHMIDLIN; SAHRMANN, 2014). Os cones de papel permaneceram no sulco por 30 segundos e, ao final da coleta, foram colocados em um mesmo microtubo

constituindo uma única amostra por elemento (Figura 4A e 4B). Amostras do biofilme dos sulcos periodontais dos dentes contralaterais também foram colhidas seguindo o mesmo protocolo.

As coletas de biofilmes foram realizadas nos mesmos períodos experimentais descritos anteriormente (T0, T1, T2 e T3). As amostras coletadas foram transferidas para microtubos individuais identificados e contendo 150µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6), aos quais foram adicionados 150µL de NaOH 0,5M o que permitiu a lise e a suspensão do DNA na solução. Ao todo, entre amostras dos implantes e dentes contralaterais, foram coletadas 248 amostras de biofilme. Todos os microtubos foram armazenados em temperatura de -20°C até o processamento pela técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* (Figuras 3C e 4C).

Figura 3 – Coleta do biofilme supragengival aderido na superfície externa das coroas protéticas e coroas dos dentes contralaterais com auxílio de escova do tipo *microbrush*. A: Coleta na região vestibular; B: Coleta na região palatina; C: armazenamento da amostra em microtubo individual contendo 150µL de TE e 150µL de NaOH.

Fonte: Própria (2018).

Figura 4 – Coleta do biofilme subgengival com auxílio de cones de papel esterilizados. A: Cones de papel inseridos na parte mais apical do sulco vestibular (regiões mesial, central e distal); B: Cones de papel inseridos no sulco palatino (regiões mesial, central e distal); C: Cones com biofilme sendo armazenados em um mesmo microtubo contendo 150µL de TE e 150µL de NaOH.

Fonte: Própria (2018).

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

A etapa de processamento das amostras pela técnica de hibridização de sondas de DNA genômico, DNA-DNA *Checkerboard*, foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, de acordo com a técnica proposta por Socransky et al. (1994) (SOCRANSKY et al., 1994) e modificada por do Nascimento et al. (2010) (DO NASCIMENTO et al., 2010).

3.5.2.1 Obtenção das espécies-alvo de detecção

Trinta e quatro espécies bacterianas, incluindo colonizadores primários e patógenos associados à doença periodontal e peri-implantar, e três espécies de *Candida* frequentemente encontradas na microbiota oral de indivíduos saudáveis e doentes foram selecionadas para este estudo. Algumas espécies bacterianas foram agrupadas em cinco complexos microbianos de patogenicidade (vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo) com base na descrição de Socransky et al. (1998) (SOCRANSKY et al., 1998), e as demais foram agrupadas no grupo “outras espécies”. As três espécies de *Candida* investigadas foram reunidas no grupo “fungos”. O

quadro 1 lista as 34 espécies bacterianas e as 3 espécies de fungos usadas como alvo de detecção pela técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*.

Quadro 1 – Espécies-alvo da detecção pela técnica de hibridização com sondas de DNA genômico DNA-DNA *Checkerboard*.

Espécies	N.º ATCC	Espécies	N.º ATCC
Complexo Vermelho		Outras Espécies	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	<i>Bacteroides fragilis</i>	25285
<i>Tannerella forsythia</i>	43037	<i>Escherichia coli</i>	25927
<i>Treponema denticola</i>	35405	<i>Enterococcus faecalis</i>	700802
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BAA-1705
Complexo Laranja		<i>Lactobacillus casei</i>	334
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Mycoplasma Salivarium</i>	23064
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25586	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	49031
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Parvimonas micra</i>	33270	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Prevotella nigrescens</i>	25261	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442
		<i>Pseudomonas putida</i>	700007
Complexo Amarelo		<i>Solobacterium moreei</i>	CCUG39336
<i>Streptococcus mitis</i>	49456	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Streptococcus oralis</i>	35037	<i>Streptococcus mutans</i>	700610
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	<i>Streptococcus salivarius</i>	9759
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	<i>Streptococcus sobrinus</i>	27607
		<i>Streptococcus parasanguinis</i>	903
Complexo Verde		<i>Staphylococcus pasteurii</i>	51129
<i>Aggregatibacter</i>	700685	Fungos	
<i>actinomycescomitans a</i>		<i>Candida albicans</i>	9028
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Candida dubliniensis</i>	7984
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Candida tropicalis</i>	66029
Complexo Roxo			
<i>Veillonella parvula</i>	10790		

Fonte: Própria (2018).

Das 37 espécies-alvo de detecção utilizadas neste estudo, o DNA genômico de 24 espécies foram comprados junto à empresa *American Type Culture Collection* (ATCC®, EUA). Treze espécies (*Eikenella corrodens*, *Escherichia Coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus gordonii*, *Solobacterium moreei*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Streptococcus sobrinus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*) foram cultivadas em meio de cultura líquido específico para cada micro-organismo, por 24 horas, a 37°C. Após esse período, o DNA genômico dos 13 micro-organismos foi extraído seguindo o protocolo de extração de DNA usando CTAB (Doyle; Doyle, 1990, modificado). As etapas microbiológicas de cultura foram

realizadas no Laboratório de Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

3.5.2.2. Extração do DNA genômico das espécies

Após o período de crescimento e multiplicação das 13 espécies cultivadas em laboratório, as culturas líquidas foram distribuídas em tubos tipo Falcon de 50 mL e centrifugadas (5430R, Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Alemanha) a 6000 rpm por 5 minutos (Figura 5A), e o conteúdo sobrenadante foi desprezado obtendo-se um precipitado (*pellet*) de células microbianas (Figura 5B). Esse precipitado foi ressuspensionado e dividido em diferentes microtubos para a extração do material genético. Os microtubos foram centrifugados a 13200 rpm, por 7 minutos, para nova precipitação das células microbianas (Figura 5C). O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensionado em 700 µL de tampão de extração (NaCl 1,4M; Tris-HCl 100 mM, pH=8; EDTA 20 mM, pH=8; Polivinilpirrolidona 1%; CTAB 2%; β-Mercaptoetanol 0,2%) com proteinase K (100 µg/mL) (Figura 5D e 5E), homogeneizado e incubado a 65°C durante 30 minutos em banho-maria (ALB 250S, Inbras Equipamentos de Saúde, Jardinópolis, São Paulo, Brasil). Os microtubos foram homogeneizados por 20 vezes a cada 10 minutos (Figura 5F).

Figura 5 – Extração do DNA genômico. A: Centrifugação da cultura a 6000 rpm por 5 minutos; B: Obtenção do precipitado (*Pellet*) da cultura líquida; C: Transferência do precipitado para microtubos e centrifugação a 13200 rpm por 7 minutos; D e E: Precipitado ressuspendido em 700 μ L de tampão de extração com proteinase K; F: Incubação a 65°C durante 30 minutos em banho-maria.

Fonte: Própria (2018).

Depois do tempo de incubação, foram adicionados 650 μ L de CIA (Clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1; Sigma-Aldrich, Saint Lois, Missouri, EUA) em cada microtubo. A solução foi homogeneizada até a formação de duas fases e centrifugada a 13200 rpm, por 7 minutos (Figura 6A). A fase aquosa obtida foi transferida para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 250 μ L de tampão de extração sem proteinase K e 650 μ L de CIA, homogeneizados e centrifugados novamente a 13200 rpm, durante 7 minutos (Figura 6B). A fase aquosa formada foi novamente transferida para outro microtubo, ao qual foram adicionados 650 μ L de CIA, homogeneizado e centrifugado a 13200 rpm durante 7 minutos. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes para cada microtubo (Figura 6C).

Figura 6 – Extração do DNA genômico. A: Adição de 650 μ L de CIA (Clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1) e homogeneização até a formação de duas fases na solução, com posterior centrifugação a 13200 rpm, por 7 minutos; B: Transferência da fase aquosa para um novo microtubo, adição de 250 μ L de tampão de extração sem proteinase K e 650 μ L de CIA, homogeneização e centrifugação a 13200 rpm, durante 7 minutos; C: Transferência da fase aquosa para outro microtubo, adição de 650 μ L de CIA, homogeneização e centrifugação a 13200 rpm, por 7 minutos.

Fonte: Própria (2018).

A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e precipitada com 1 volume de isopropanol (SigmaAldrich), homogeneizado e centrifugado a 13200 rpm por 7 minutos (Figura 7A). O sobrenadante foi removido e o DNA do micro-organismo, contido no fundo do microtubo, foi lavado com 50 μ L de etanol a 70% (Sigma-Aldrich) e novamente centrifugado a 13200 rpm por 2 minutos. Este procedimento foi repetido por 2 vezes (Figura 7B). O etanol foi removido e aguardou-se 30 minutos para a secagem completa do microtubo contendo o DNA do micro-organismo (Figura 7C). Em seguida, o DNA precipitado foi ressuspensionado adicionando 20 μ L de tampão TE (10mM Tris – HCl, pH=8) e 1 μ L de RNase 10 μ g/mL (Sigma-Aldrich) e incubado em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos (Figura 7D).

Figura 7 – Extração do DNA genômico. A: Precipitação do DNA com 1 volume de isopropanol; B: Lavagem do DNA do micro-organismo com 50 μ L de etanol a 70%; C: Ressuspensão do DNA precipitado com 20 μ L de tampão TE, 1 μ L de RNase 10 μ g/mL e incubação em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos.

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.3. Quantificação, avaliação do grau de pureza e análise da integridade do DNA extraído

Após a extração, cada DNA microbiano teve sua concentração e pureza determinadas por meio de leituras de absorbância em espectrofotômetro (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido). Inicialmente foi realizada a calibração do aparelho (“branco”) com tampão TE, seguido da leitura dos DNAs extraídos e diluídos em TE na proporção de 1:50. Uma alíquota de 20 μ L da diluição foi transferida para a cuba do espectrofotômetro e a leitura da absorbância foi efetuada nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A razão entre as leituras nos comprimentos de onda 260/280 nm foi utilizada como um indicativo do grau de pureza do DNA extraído, sendo considerada como satisfatória (pura) dentro do intervalo de 1,8 a 2,0.

Todos os DNAs extraídos foram também submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para verificação da qualidade e integridade. O gel foi preparado pela solidificação da agarose fundida em tampão TAE 1X (Tris-acetato-EDTA 0,5M; pH 8,0) e acondicionado em cuba de eletroforese (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) 10x10 cm com tampão de corrida TAE 1X. Em cada casulo do gel, foram depositados 500 ng de DNA de cada espécie, 2 μ L de *Loading Buffer* 6X (Invitrogen, Life

Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), 6 μ L de corante *Gel Red* (Biotium Inc., Hayward, Califórnia, EUA) diluído 500X e 6 μ L de tampão TE. Essa mistura foi utilizada para aumentar a densidade das amostras, impedindo que elas saíssem dos casulos, além de dar a coloração que serve como indicador do progresso da eletroforese. Como controle, foi utilizado um marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III, 500 μ g/mL) (Figura 8A). Uma corrente de 70V e 100 mA foram aplicados sobre a cuba de eletroforese por 90 minutos (Figura 8B). Ao final, o gel foi analisado em fotodocumentador (E-BOX VX5, Fisher Biotec, Perth, Austrália Ocidental, Austrália) e após confirmação da integridade dos DNAs extraídos, as amostras foram estocadas para utilização na técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*.

Figura 8 – Análise da integridade do DNA extraído. A: Depositar no primeiro casulo do gel de agarose 0,8% o marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III, 500 μ g/mL) e nos demais casulos, a mistura contendo DNA de cada espécie, *Loading Buffer*, *Gel Red* e tampão TE; B: Aplicação de corrente 70v e 100 mA sobre a cuba de eletroforese por 90 minutos.

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4. Processamento das amostras de biofilme supragengival e subgengival pela técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*

3.5.2.4.1. Confecção das Sondas de DNA genômico

A confecção das sondas genômicas das 37 espécies-alvo de detecção deste estudo foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante do marcador genômico (*Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detect System*, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA genômico do micro-organismo alvo, atingindo uma concentração final de 1 ng/ μ L de sonda na

solução de hibridização. Os DNAs foram diluídos dentro de microtubos em uma concentração de 10 ng/μL, para um volume final de 10 μL. Após a diluição, os DNAs foram desnaturados em água fervente por 5 minutos. Imediatamente, foram resfriados em gelo durante 5 minutos para manter as cadeias de nucleotídeos abertas. Com os microtubos mantidos em gelo, foram adicionados os componentes do *kit* de marcação: 10 μL de *Reaction buffer*, 2 μL de *Labelling reagent* e 10 μL de *Cross-linker solution* (1:4) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O conteúdo de cada microtubo foi levemente agitado por pipetagem para homogeneização da solução, e foram incubados em 37°C por 30 minutos em banho-maria. Em seguida, foi adicionado glicerol (50% v/v) em cada microtubo contendo a sonda de DNA marcada, e estocados em -20°C até o processamento laboratorial das amostras de biofilme (Figura 9).

Figura 9 – Marcação das sondas de DNA genômico. A: Reagentes de marcação (água ultrapura, *cross-linker solution*, *reaction buffer* e *labelling reagent*, respectivamente); B: Conjunto de sondas marcadas das 37 espécies-alvo do estudo.

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.2. Verificação da sensibilidade das sondas genômicas

A sensibilidade da técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridização positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células microbianas, de acordo com o proposto por Socransky et al. (1994) (SOCRANSKY et al., 1994). Para tanto, amostras de DNA genômico das 37 espécies-alvo de detecção foram diluídas até representarem as concentrações de 10^5 e 10^6 células microbianas (Figura 10), e foram hibridizadas contra as sondas marcadas. Estas diluições são utilizadas como padrões de referência para a quantificação de micro-organismos após as reações de hibridização.

Figura 10 – Amostras de DNA genômico das 37 espécies-alvo de detecção nas concentrações de 10^5 e 10^6 células microbianas (Padrões).

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.3. Processamento e aplicação das amostras de biofilme para a reação de hibridização

Inicialmente, os microtubos contendo as amostras de biofilme supragengival e subgengival foram descongelados em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas por 4 minutos utilizando um agitador de tubos (AP 56, Phoenix Luferco, Araraquara, Brasil) para a desagregação total do conteúdo coletado pela escova do tipo *microbrush* e pelos cones de papel. Os microtubos foram então fervidos a 95°C por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA (Figura 11A), e imediatamente resfriados em gelo por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram neutralizadas com a adição de 800 μL de acetato de amônio 5M (Figura 11B). Paralelamente, dois microtubos contendo a quantidade de 10^5 e 10^6 células de cada uma das 37 espécies-alvo de detecção foram processados seguindo o mesmo protocolo descrito, para servirem como padrões de comparação para a quantificação dos sinais de hibridização.

Figura 11 – Processamento das amostras. A: Desnaturação do DNA das amostras de biofilme; B: Neutralização das amostras com adição 800 μ L de acetato de amônio 5 M.

Fonte: Própria (2018).

As amostras DNA foram aplicadas sobre uma membrana de nylon de 15 cm², carregada positivamente (Hybond N+, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e posicionada dentro de um aparelho metálico constituído de 30 canaletas dispostas paralelamente, denominado *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA). Esse aparelho possibilita a deposição de 28 diferentes amostras de DNA em canaletas individuais, além de duas canaletas para a deposição dos padrões de quantificação, que contém 10⁵ e 10⁶ células de cada espécie-alvo. Cada amostra e padrões de comparação foram depositados no interior das canaletas com auxílio de pipetas automáticas de precisão. Após 5 minutos, necessários para a ligação do DNA na membrana de nylon, a solução remanescente foi removida com o auxílio de bomba a vácuo conectada ao *Minislot* 30. Em seguida, a membrana foi removida do aparelho, transferida para um invólucro de papel kraft, e mantida em estufa a 120°C (SX 1.2 DTME, Sterilifer Ind. e Com. Ltda., Diadema, SP, Brasil), durante 20 minutos, para a fixação do DNA à membrana (Figura 12).

Figura 12 – A: Aparelho *Minislot* 30 aberto; B: Posicionamento da membrana de nylon sobre uma das placas do aparelho; C: Membrana posicionada no *Minislot* 30 fechado; D: Aplicação das amostras de DNA e padrões de comparação 10^5 e 10^6 em canaletas individuais; E: Membrana posicionada em um invólucro de papel kraft; F: fixação do DNA das amostras e padrões na membrana por meio de calor em estufa (120°C durante 20 minutos).

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.4. Pré-hibridização das amostras fixadas sobre a membrana de Nylon

Após a fixação dos DNAs das amostras de biofilme e dos padrões de comparação, uma solução contendo NaCl 1 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e *Blocking reagent* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) diluídos em 30 mL de *Hybridization Buffer* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) foi preparada e aplicada sobre a membrana. Em seguida, a membrana foi embalada em um invólucro de plástico e pré-hibridizada no forno de hibridização em $63,5^{\circ}\text{C}$, durante 6 horas (Figura 13).

Figura 13 – A: Reagentes para o preparo da solução de pré-hibridização (*Blocking reagent*, NaCl 1 M e *Hybridization Buffer*, respectivamente); B: Aplicação da solução preparada sobre a membrana; C: Membrana embalada em um invólucro de plástico; D: Pré-hibridização em forno a 63,5°C, durante 6 horas.

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.5. Aplicação das sondas de DNA genômico marcadas e reação de hibridização

Após a etapa de pré-hibridização, a membrana foi posicionada em um dispositivo de acrílico denominado *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) para aplicação das sondas marcadas. O dispositivo apresenta 45 canaletas individuais de hibridização, permitindo a aplicação simultânea de até 45 sondas distintas. Para tanto, a membrana foi posicionada de forma que as amostras de DNA previamente fixadas a membrana ficassem orientadas em um ângulo de 90° com as canaletas do *Miniblotter* 45, formando um xadrez (*Checkerboard*) no padrão de 30 (amostras de DNA e padrões 10^5 e 10^6) x 45 (sondas genômicas). Cada canaleta foi utilizada como uma câmara para reações de hibridização independentes. Foram aplicadas, individualmente no interior de cada canaleta, 160 µL de sonda genômica das 37 espécies-alvo. Após a aplicação das sondas, o *Miniblotter* 45 foi envolvido em filme de PVC e embalado em saco plástico para evitar o ressecamento da membrana. Todo o conjunto foi levado para a reação de hibridização no forno de hibridização em temperatura de 63,5°C, sob agitação suave, durante 16 horas (Figura 14). Ao todo, foram processadas 6 membranas.

Figura 14 – A: Miniblotter 45 para aplicação das sondas genômicas marcadas; B: Membrana posicionada no interior do Miniblotter 45; C: Sondas aplicadas individualmente nas canaletas do dispositivo; D: Embalagem do dispositivo e posicionamento para a reação de hibridização em forno a 63,5°C, durante 16 horas.

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.6. Lavagem das membranas para remoção das sondas não hibridizadas

Após a reação de hibridização, as membranas passaram por um processo de lavagem para remoção das sondas que não hibridizaram completamente (ligações inespecíficas entre os DNAs). Inicialmente, foram realizadas duas lavagens de 30 minutos cada, em 67,5°C, com 500 mL de uma solução contendo Urea 2 M (Sigma Chemical Co.), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1% (Sigma Chemical Co.), NaH₂PO₄ 50 mM (pH=7; Sigma Chemical Co.), NaCl 150 mM (Sigma Chemical Co.), MgCl₂ 1mM (Sigma Chemical Co.) e *Blocking Reagent* (GE Healthcare). Adicionalmente, foram realizadas mais duas lavagens de 15 minutos, em temperatura ambiente, com 500 mL de uma solução contendo Tris 1 M (Sigma Chemical Co.), NaCl 2 M (Sigma Chemical Co.) e MgCl₂ 1M (Sigma Chemical Co.). Todas as lavagens foram realizadas sob agitação vigorosa, em forno de hibridização (Figura 15).

Figura 15 – Lavagem das membranas sob agitação vigorosa, em forno de hibridização.

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.7. Detecção dos sinais de hibridização

A detecção dos sinais de hibridização provenientes do cruzamento dos DNAs das amostras de biofilme coletadas com os DNAs das sondas genômicas marcadas de cada uma das 37 espécies-alvo foi realizada por meio de uma reação de quimiluminescência. Após as lavagens, foram aplicados 3 mL do reagente de detecção CDP-Star® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) sobre a membrana, deixando-o em contato com toda sua superfície durante 30 minutos, protegido da luz (Figura 16A). Em seguida, o excesso do reagente de detecção foi removido e a membrana foi embalada com filme plástico de Policloreto de Vinila (PVC) (Figura 16B) para posterior exposição em cassete de autorradiografia.

Figura 16 – A: Aplicação do reagente de detecção sobre a membrana; B: Membrana embalada com filme plástico de Policloreto de Vinila (PVC).

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.8. Exposição da membrana e Revelação

Cada membrana foi posicionada dentro de um cassete de autoradiografia (Hypercassete, Buckinghamshire, Reino Unido), em câmara escura, onde permaneceu em contato com um filme para autorradiografia (HyperFilm, GE Healthcare), durante 1 hora (Figura 17). Após esse período, os filmes expostos foram revelados e fixados em soluções de processamento radiográfico convencional (Kodak, Rochester, NY, EUA). Ao final, são obtidos filmes autorradiográficos onde podem ser observados os sinais positivos de hibridização nas regiões de intersecção entre as amostras e sondas cruzadas, caso ocorra o pareamento das cadeias de DNA, confirmando a presença de determinada espécie-alvo investigada. A Figura 18 ilustra um esquema da reação de hibridização de uma membrana, na qual as linhas horizontais representam as 37 sondas marcadas e as linhas verticais representam as 28 amostras e 2 padrões de quantificação (10^5 e 10^6) aplicados sobre a membrana, configurando um formato de “tabuleiro de xadrez” ou DNA-DNA *Checkerboard*.

Figura 17 – A: Membrana posicionada no cassete de autorradiografia; B: Exposição do filme autorradiográfico durante 1 hora.

Fonte: Própria (2018).

Figura 18 – Esquema ilustrando uma reação de hibridização pelo método DNA-DNA *Checkerboard*.

Fonte: Própria (2018).

3.5.2.4.9. Interpretação dos sinais de hibridização

Após a obtenção dos filmes autorradiográficos com os sinais de hibridização, estes foram fotografados e as imagens obtidas foram analisadas no software CLIQS 1D® (Totallab, Newcastle, Inglaterra), que possibilitou a determinação do número aproximado de células microbianas presentes em cada amostra de biofilme avaliada, a partir da comparação da intensidade dos sinais de hibridização obtidos pela intersecção das amostras contra as sondas marcadas em relação à intensidade dos padrões contendo 10^5 e 10^6 células de cada uma das 37 espécies-alvo. (Figura 19).

Figura 19 – A: Imagem da membrana vista no *software* CLIQS 1D®; B: Delimitação das 37 canaletas em que foram aplicadas as sondas; C: Delimitação dos sinais de hibridização a serem quantificados; D: Comparação de todos os sinais delimitados com os padrões contendo 10^5 e 10^6 células de cada espécie-alvo, e obtenção dos resultados.

Fonte: Própria (2018).

3.6. Avaliação dos indicadores clínicos

Os exames clínicos peri-implantar e periodontal foram realizados com o objetivo de avaliar, ao longo do tempo, a influência do biofilme na manutenção da saúde dos tecidos de suporte ou no possível desenvolvimento da doença peri-implantar. Os indicadores clínicos de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival, foram avaliados por

meio do sistema computadorizado de sondas periodontais Florida Probe® (Florida Probe® System, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA), com alta precisão (0,2 mm) e pressão controlada (15 g; Figura 20A) (GIBBS et al., 1988; GUPTA; RATH; LOHRA, 2015). Os exames foram realizados por um mesmo examinador previamente calibrado e com experiência no sistema utilizado. Os dados foram coletados no momento da instalação das próteses (T0: *baseline*) e após 12 (T1), 24 (T2) e 36 (T3) meses de função mastigatória dos implantes. Os indicadores clínicos foram investigados nos sítios reabilitados com implante/coróa protética e nos dentes contralaterais aos sítios com implantes.

Para avaliação da profundidade de sondagem, foram mensuradas as distâncias, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco peri-implantar e periodontal. O sangramento à sondagem foi registrado quanto à ausência ou presença após 30 segundos transcorridos da avaliação da profundidade de sondagem. Para o registro da recessão gengival, foi mensurado o valor em milímetros da distância entre a linha de união da coroa e o conector protético e a margem gengival livre. As medições foram todas feitas em seis sítios distintos: méso-vestibular, vestibular, disto-vestibular, méso-lingual/palatino, lingual/palatino e disto-lingual/palatino. Cada sítio foi sondado duas vezes para minimizar potenciais erros na angulação da sonda e a média das duas avaliações foi utilizada como medida representativa para o sítio (Figura 20B).

Figura 20 – A: Sistema computadorizado de sondas periodontais Florida Probe®; B: Imagem representativa da avaliação da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival por meio do sistema Florida Probe®.

Fonte: Própria (2018).

3.7. Avaliação radiográfica

Radiografias periapicais foram também realizadas em cada etapa experimental (T0, T1, T2 e T3), com o objetivo de monitorar o nível ósseo marginal ao redor dos implantes. Todas as tomadas radiográficas foram obtidas por meio da técnica do paralelismo utilizando um dispositivo oral para o posicionamento do filme radiográfico periapical (Kodak E-Speed, Kodak, São José dos Campos, São Paulo, Brasil), e aparelho de Raio-X (Timex 70E - parede, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil; Figura 21A). O processamento radiográfico foi realizado em uma máquina processadora automática (Peri-ProIII, OdontoMed, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

As radiografias periapicais foram fotografadas sobre um negatoscópio (Biotron, Minas Gerais, Brasil) com auxílio de uma câmera fotográfica digital (Canon, Japão) fixada numa mesa estativa. Sobre a imagem radiográfica foi posicionado um paquímetro digital (Mitutoyo, São Paulo, Brasil) marcando 1mm de comprimento, utilizado para estabelecer uma escala de referência para as mensurações. O nível ósseo marginal foi medido com o auxílio do software ImageJ-Fiji® 1.43 (NIH, EUA). As mensurações foram realizadas nas faces mesial e distal de cada implante. Um ponto fixo (A) foi definido sobre a plataforma de cada implante para ser utilizado como o ponto de referência, e um segundo ponto (B) foi posicionado sobre a região mais alta da crista óssea marginal. Desta forma, em todos os períodos realizou-se a mensuração, em milímetros, da distância A para B (SALVI; LANG, 2004) (Figura 21B).

Figura 21 – A: Técnica do paralelismo para obtenção de radiografias periapicais; B: Mensuração do nível ósseo marginal (região mesial e distal) por meio do *Software* ImageJ-Fiji 1.43. Seta vermelha: calibração da escala (em mm) com paquímetro digital. A: ponto de referência na plataforma do implante. B: ponto sobre a região mais alta da crista óssea alveolar.

Fonte: Própria (2018).

3.8. Análise dos Dados

Todos os dados clínicos e microbiológicos obtidos ao longo dos períodos de investigação foram submetidos à análise estatística descritiva. Os resultados das variáveis clínicas e microbiológicas investigadas foram resumidos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Para a análise estatística de inferência, foram testados os efeitos dos dois diferentes substratos utilizados para a confecção dos conectores protéticos (titânio e zircônia) e dos quatro períodos de avaliação (T0, T1, T2, T3) sobre os indicadores clínicos e microbiológicos. Considerando-se o tamanho amostral do estudo e a dependência longitudinal dos fatores de variação, os dados foram inicialmente comparados por um modelo não-paramétrico de regressão liner mista (Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments; Brunner & Langer, 1999). As variáveis clínicas, microbiológicas e os fatores de variação foram tratados como efeitos fixos e o participante como efeito aleatório. *Wald-Type Statistic* (WTS) e *ANOVA-Type Statistic* (ATS) foram usados para investigar a hipótese de ausência de interação entre os fatores “grupo” e “tempo”. Para investigar se a ausência de interação entre os diferentes substratos deve ser rejeitada em cada período de avaliação, múltiplas comparações foram realizadas por meio do teste de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg False Discovery Rate* (FDR). Os resultados das

análises dos dados de reabsorção óssea marginal foram representados como média e desvio-padrão, por apresentarem uma distribuição normal, e o teste utilizado para a comparação entre os grupos foi o *Two-Way* ANOVA. Diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico R (R. software 3.1.0; R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. População amostral

A figura 22 apresenta o fluxograma contendo dados do recrutamento, alocação e acompanhamento dos participantes do estudo. Após triagem e exame de 21 indivíduos, 1 foi excluído por não atender aos critérios de inclusão. Foram selecionados 20 indivíduos, alocados em dois grupos (n=10), de acordo com o tipo de substrato utilizado para a confecção do conector protético (titânio ou zircônia) e recomendações do fabricante. Os conectores de zircônia (Cercon Balance C/ reto, Ankylos, EUA), utilizados neste estudo, são indicados para restaurações unitárias apenas na região anterior. Já os conectores de titânio (Balance posterior C/ reto, Ankylos, EUA) são indicados para restaurações unitárias ou múltiplas na região posterior. O tamanho da amostra calculado para este estudo considerou 20% de perda de segmento, no entanto, a partir de 12 meses de acompanhamento, foi observado uma perda de segmento de 30% para cada grupo investigado. Dessa forma, no período T0 (*baseline*) foram avaliados 10 indivíduos por grupo e nos períodos T1=12 meses, T2=24 meses e T3=36 meses após função, foram investigados 7 indivíduos em cada grupo. Duas perdas de segmento ocorreram por motivo de óbito e 4 participantes não foram localizados.

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos participantes quanto ao gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, por grupo (titânio ou zircônia), nos diferentes períodos investigados. Os dentes contralaterais aos sítios reabilitados com implantes foram utilizados como parâmetro de controle para a comparação com os substratos investigados.

Figura 22 – Fluxograma contendo os dados de recrutamento, alocação e acompanhamento dos participantes ao longo do estudo.

Tabela 1 – Caracterização da amostra quanto ao gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, por grupo (zircônia ou titânio), nos diferentes períodos investigados.

	Zircônia				Titânio			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
Nº Participantes	10	7	7	7	10	7	7	7
Média de Idade (anos $\pm$ DP)	47 $\pm$ 4,2	44 $\pm$ 16,0	44 $\pm$ 16,0	44 $\pm$ 16,0	48 $\pm$ 3,6	37 $\pm$ 16,9	37 $\pm$ 16,9	37 $\pm$ 16,9
Gênero (F/M)	8/2	5/2	5/2	5/2	9/1	6/1	6/1	6/1
Sítios de amostragem								
Implante	60	42	42	42	60	42	42	42
Dente (controle)	60	42	42	42	60	42	42	42

F: Feminino; M: Masculino

DP: desvio-padrão

4.2. Indicadores clínicos

A estabilidade primária foi alcançada para todos os implantes após a cirurgia e nenhum sinal clínico de complicação foi identificado após 36 meses de função, resultando em taxa de sucesso de 100% para os implantes em ambos os grupos. Um total de 744 sítios relacionados ao implante e dentes contralaterais foram avaliados nos períodos investigados. A Tabela 2 contém a média e desvio-padrão (DP) da profundidade de sondagem, recessão gengival e sangramento à sondagem dos sítios peri-implantares e periodontais investigados ao longo do tempo.

Tabela 2 – Média e desvio padrão ($\pm$ DP) dos indicadores clínicos dos sítios periodontais e peri-implantares dos indivíduos reabilitados com conectores protéticos de zircônia ou titânio ao longo do tempo.

	Zircônia							
	Implante				Dente contralateral			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
Profundidade de sondagem (mm, média $\pm$ DP)	3,01 $\pm$ 1,68 ^A	2,53 $\pm$ 0,69 ^a	2,72 $\pm$ 0,81 ^a	2,16 $\pm$ 0,81 ^a	1,84 $\pm$ 0,69 ^B	1,71 $\pm$ 0,50 ^b	1,92 $\pm$ 0,75 ^b	1,72 $\pm$ 0,45 ^b
Recessão gengival (mm, média $\pm$ DP)	0,18 $\pm$ 0,61 ^A	0,21 $\pm$ 0,70 ^a	0,18 $\pm$ 0,60 ^a	0,34 $\pm$ 0,85 ^a	0,18 $\pm$ 0,34 ^B	0,09 $\pm$ 0,32 ^b	0,17 $\pm$ 0,37 ^b	0,13 $\pm$ 0,40 ^b
Sangramento à sondagem (%)	5,00 ^A	35,70 ^a	31,00 ^a	33,30 ^a	11,70 ^B	23,80 ^b	16,70 ^b	19,00 ^b
	Titânio							
	Implante				Dente contralateral			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
Profundidade de sondagem (mm, média $\pm$ DP)	1,80 $\pm$ 1,55 ^{A**}	3,52 $\pm$ 1,72 ^a	2,78 $\pm$ 1,30 ^a	2,66 $\pm$ 1,25 ^a	2,00 $\pm$ 0,70 ^B	1,85 $\pm$ 0,67 ^b	1,83 $\pm$ 0,57 ^b	1,71 $\pm$ 0,53 ^b
Recessão gengival (mm, média $\pm$ DP)	0,13 $\pm$ 0,27 ^A	0,25 $\pm$ 0,50 ^a	0,45 $\pm$ 0,70 ^a	0,42 $\pm$ 0,79 ^a	0,24 $\pm$ 0,52 ^B	0,14 $\pm$ 0,33 ^b	0,16 $\pm$ 0,32 ^b	0,34 $\pm$ 0,57 ^b
Sangramento à sondagem (%)	1,70 ^A	28,60 ^{a,+}	42,90 ^{a,-}	23,80 ^{a,+}	10,0 ^B	11,90 ^b	19,00 ^b	9,50 ^b

Letras iguais sobrescritas (maiúsculas e minúsculas) na mesma linha expressam diferenças significantes intragrupo detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

Símbolos diferentes (+ / -) na mesma linha expressam diferenças significantes intragrupo detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

Símbolos diferentes subscritos (* / **) na mesma coluna expressam diferenças significantes intergrupo detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

4.2.1. Profundidade de sondagem

A Tabela 3 contém o resultado da análise do efeito relativo dos fatores substrato (zircônia, titânio e dentes contralaterais) e tempo (T0, T1, T2, T3) sobre os valores de profundidade de sondagem. *Wald-Type Statistic* (WTS) e *ANOVA-Type Statistic* (ATS) foram usados para investigar a hipótese de ausência de interação entre os fatores (Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments). O fator substrato, tempo e respectivas interações tiveram um efeito significativo nos valores de profundidade de sondagem ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Análises estatísticas sobre o efeito dos fatores substrato, tempo e suas interações na profundidade de sondagem.

Fator	Wald-Type Statistic (WTS)			ANOVA-Type Statistic (ATS)		
	Estatística	df	Valor p	Estatística	Df	Valor p
Substrato	77,57	3	$1,01 \times 10^{-16}$	23,51	2,87	$1,13 \times 10^{-14}$
Tempo	18,49	3	$3,48 \times 10^{-4}$	4,50	2,54	$6,02 \times 10^{-3}$
Substrato: tempo	48,03	9	$2,51 \times 10^{-7}$	5,99	6,40	$1,42 \times 10^{-6}$

Diferenças detectadas pelo teste *Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments* ($p < 0,05$)

df: grau de liberdade.

A figura 23 apresenta gráfico de linhas contendo o efeito relativo dos fatores investigados.

Figura 23 – Gráfico de linhas ilustrando o efeito relativo dos fatores substrato, tempo (barras verticais) e suas interações na profundidade de sondagem.

Fonte: Própria (2018).

As análises por múltiplas comparações pelo teste de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR) demonstraram que a profundidade de sondagem dos sítios restaurados com implante e conector de zircônia apresentou valores médios mais elevados no tempo T0, com posterior redução em função do tempo ($p < 0,05$). Maiores valores de profundidade de sondagem foram verificados nos sítios relacionados aos implantes e conectores de zircônia, quando comparados aos dentes contralaterais (Zircônia x Dente contralateral: T0, $p = 2,8 \times 10^{-10}$; T1, $p = 4,5 \times 10^{-5}$; T2, $p = 2,7 \times 10^{-3}$; T3, $p = 0,2701$). Os sítios reabilitados com implantes e conectores de titânio exibiram reduzida profundidade de sondagem no tempo T0, com subsequente aumento a partir de 12 meses da instalação da prótese (T1; $p = 2 \times 10^{-16}$), permanecendo constante até o período de 36 meses de avaliação. No tempo T0, a profundidade de sondagem dos sítios restaurados com conector de titânio foi menor quando comparado aos sítios dos dentes contralaterais ($p = 3,6 \times 10^{-5}$). Nos demais tempos maiores valores de profundidade de sondagem foram encontrados nos sítios restaurados com conector de titânio (Titânio x Dente contralateral: T1, $p = 6,9 \times 10^{-7}$; T2, $p = 5,8 \times 10^{-4}$; T3, $p = 3,5 \times 10^{-3}$). Os sítios restaurados com conectores de zircônia apresentaram maiores valores de profundidade de sondagem, no tempo T0, quando comparado aos sítios com conectores de titânio ($p = 2 \times 10^{-16}$). Já nos tempos T1, T2 e T3 não foi verificado diferença entre os valores obtidos (Zircônia x Titânio: T1, $p = 0,2148$; T2, $p = 0,2548$; T3, $p = 0,1162$).

4.2.2. Sangramento à sondagem

A Tabela 4 contém a análise multifatorial não paramétrica (Brunner & Langer, 1999) dos valores de sangramento à sondagem referente aos fatores: substrato e tempo. A influência de cada fator no sangramento à sondagem e suas interações foram testadas por meio da estatística do tipo Wald e do tipo ANOVA. O fator substrato, tempo e a interação entre eles foram significantes nos valores de sangramento à sondagem ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Análise dos fatores substrato, tempo e suas interações no sangramento à sondagem.

Fator	Wald-Type Statistic (WTS)			ANOVA-Type Statistic (ATS)		
	Estatística	Df	Valor p	Estatística	Df	Valor p
Substrato	10,42	3	0,0153	3,31	2,93	0,0200
Tempo	47,26	3	$3,06 \times 10^{-10}$	11,70	2,85	$2,22 \times 10^{-7}$
Substrato: tempo	26,32	9	0,0018	2,19	7,93	0,0251

Diferenças detectadas pelo teste *Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments* ($p < 0,05$)

df: grau de liberdade.

A figura 24 apresenta o gráfico de linhas contendo o efeito relativo dos diferentes substratos ao longo dos tempos investigados.

Figura 24 – Gráfico de linhas ilustrando o efeito relativo dos fatores substrato, tempo (barras verticais) e suas interações no sangramento à sondagem.

Fonte: Própria (2018).

As análises por múltiplas comparações pelo teste de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR) demonstraram que sangramento à sondagem nos sítios relacionados aos implantes com conectores protéticos de zircônia e titânio aumentou a partir do tempo T0, sendo verificado diferenças significativas em relação aos demais tempos investigados (Zircônia: T0 x T1, $p=2 \times 10^{-16}$; T0 x T2, $p=2 \times 10^{-16}$; T0 x T3, $p=2 \times 10^{-16}$ / Titânio: T0 x T1, $p=2,9 \times 10^{-16}$; T0 x T2, $p=2 \times 10^{-16}$; T0 x T3, $p=2 \times 10^{-16}$). Além disso, não houve diferença significativa no sangramento à sondagem entre os demais tempos, para os substratos de zircônia (Zircônia: T1 x T2, $p=0,0664$; T1 x T3 $p=0,1286$; T2 x T3, $p=0,7588$), porém nos sítios com conectores de titânio foi verificado maiores valores de sangramento no tempo T2 em relação aos tempos T1 e T3 (Titânio: T1 x T2, $p=0,0060$; T1 x T3 $p=0,2757$; T2 x T3, $p=0,1187$). Não houve diferença significativa entre o sangramento à sondagem verificado nos sítios relacionados aos implantes com conectores de zircônia e titânio, quando comparado aos dentes contralaterais (Zircônia x Dente contralateral: T0, $p=0,3083$; T1, $p=0,4565$; T2, $p=0,3801$; T3, $p=0,8103$ / Titânio x Dente contralateral: T0, $p=0,0839$; T1, $p=0,9459$; T2, $p=0,3431$; T3, $p=0,9610$). Nos tempos T1 e T3, houve diferença significativa no sangramento a sondagem dos sítios restaurados com conectores de zircônia quando comparado aos sítios com conectores de titânio (Zircônia x Titânio: T1, $p=0,042$; T3, $p=9 \times 10^{-4}$), com maiores valores

de sangramento para o substrato zircônia. Já nos tempos T0 e T2 não foi verificado diferença entre os valores obtidos (Zircônia x Titânio: T0, $p=0,5279$; T2, $p=0,0507$). Resultado semelhante foi observado nos sítios dos dentes contralaterais (controle zircônia e controle titânio), com maior índice de sangramento nos sítios dos dentes contralaterais aos conectores de zircônia (Zircônia x Titânio: T0, $p=0,9496$; T1, $p=1,7 \times 10^{-4}$; T2, $p=0,0915$; T3, $p=3 \times 10^{-4}$).

4.2.3. Recessão gengival

A Tabela 5 contém a análise não paramétrica de múltiplas comparações (Brunner & Langer, 1999) dos valores da recessão gengival em função dos fatores: substrato e tempo. A influência de cada fator na recessão gengival e suas interações foram testadas por meio da estatística do tipo Wald e do tipo ANOVA. Apenas o fator substrato influenciou significativamente nos valores da recessão gengival ($p<0,05$).

Tabela 5 - Análise dos fatores substrato, tempo e suas interações na recessão gengival.

Fator	Wald-Type Statistic (WTS)			ANOVA-Type Statistic (ATS)		
	Estatística	Df	Valor p	Estatística	Df	Valor p
Substrato	11,93	3	0,007	4,01	2,98	0,007
Tempo	7,48	3	0,057	1,89	2,70	0,133
Substrato: tempo	6,75	9	0,663	0,70	7,49	0,681

Diferenças detectadas pelo teste *Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments* ($p<0,05$)

df: grau de liberdade.

A figura 25 apresenta o gráfico de linhas contendo o efeito relativo dos conectores de zircônia, titânio e respectivos dentes contralaterais (controle) na recessão gengival ao longo dos tempos investigados. Em geral, a recessão gengival aumentou ao longo do tempo para ambos os substratos investigados. Entretanto, as análises por múltiplas comparações pelo teste de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR) não detectaram diferenças na recessão gengival entre sítios com conectores de zircônia ou titânio. Além disso, a recessão gengival nos sítios com implantes foi semelhante ao observado nos dentes contralaterais.

Figura 25 – Gráfico de linhas ilustrando o efeito relativo dos fatores substrato, tempo (barras verticais) e suas interações na recessão gengival.

Fonte: Própria (2018).

4.3. Reabsorção óssea marginal

A Tabela 6 contém os dados de reabsorção óssea marginal (mm, média $\pm$ DP) para os substratos de zircônia e titânio ao longo dos tempos investigados. A influência do substrato na reabsorção óssea marginal foi avaliada por meio do teste *Two-Way* ANOVA. Os sítios restaurados com conectores de zircônia e titânio apresentaram valores similares de reabsorção óssea entre os tempos avaliados. Não houve diferença significativa nos valores da reabsorção óssea marginal, intragrupo e intergrupo, ao final do período de 36 meses de avaliação ($p > 0,05$).

Tabela 6 – Valores de reabsorção óssea marginal (mm, média $\pm$ DP) dos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia ou titânio após 12, 24 e 36 meses de função.

	Reabsorção Óssea Marginal			Perda óssea total
	0 – 1 ano	1 – 2 anos	2 – 3 anos	
Zircônia	0,30 $\pm$ 0,22	0,34 $\pm$ 0,33	0,12 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,21
Titânio	0,39 $\pm$ 0,64	0,26 $\pm$ 0,32	0,34 $\pm$ 0,26	0,98 $\pm$ 0,41

0: *Baseline* – Instalação da prótese.

Não foram detectadas diferenças significantes pelo teste *Two-Way* ANOVA; $p > 0,05$.

4.4. Resultados microbiológicos

4.4.1. Extração do DNA genômico das espécies-alvo

Na Tabela 7 estão representadas as concentrações de DNA genômico obtidas para cada espécie de micro-organismo, e a razão entre as leituras das absorvâncias 260/280nm, indicativo do grau de pureza dos DNAs extraídos.

Tabela 7 – Concentração e grau de pureza dos DNAs extraídos obtidos por meio de leitura em espectrofotômetro.

Espécies	Concentração (µg/µL)	Razão 260/280 nm
<i>Eikenella corrodens</i>	1,78	1,95
<i>Escherichia coli</i>	5,14	1,97
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,08	1,87
<i>Parvimonas micra</i>	0,17	1,79
<i>Prevotella nigrencens</i>	5,06	2,06
<i>Streptococcus gordonii</i>	1,71	1,98
<i>Solobacterium moreei</i>	6,68	1,95
<i>Streptococcus oralis</i>	4,31	1,91
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	7,80	1,67
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0,73	1,85
<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,39	1,93
<i>Candida albicans</i>	3,63	2,00
<i>Candida dubliniensis</i>	1,07	1,83

4.4.2. Avaliação da integridade dos DNAs genômicos extraídos em gel de agarose 0,8%

A figura 26 ilustra a reação de eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA genômico de algumas espécies obtidos após processo de extração. Após corrente de 70V e 100 mA, os DNAs genômicos testados ficaram posicionados próximo aos casulos de aplicação das amostras, acima do fragmento controle de maior peso molecular (23130 bp), demonstrando integridade das cadeias de nucleotídeos.

Figura 26 – Análise da integridade do DNA extraído de algumas espécies em gel de agarose 0,8%. O primeiro casulo do gel de agarose 0,8% contém o marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III,) e nos demais casulos, a mistura contendo DNA de cada espécie, *Load Buffer*, *Gel Red* e tampão TE. Marcação em vermelho: posicionamento dos fragmentos de DNA no gel de agarose 0,8%.

Fonte: Própria (2018).

4.4.3. Resultado do teste de sensibilidade das sondas marcadas

A figura 27 mostra o resultado da reação de hibridização das sondas marcadas contra amostras de biofilme supragengival e padrões de referência nas concentrações de 10^5 e 10^6 células microbianas para quantificação das espécies-alvo detectadas. Todas as sondas foram capazes de reagir com as amostras de biofilme testadas. Aquelas que apresentaram baixa intensidade de marcação nos padrões de referências (*E. corrodens*, *E. Coli*, *M. salivarium*, *P. aeruginosa*, *P. anaeróbios*, *P. melaninogenica*, *P. micra*, *S. gordonii*, *S. moreei*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pasteurii*, *S. sobrinus*, *C. albicans*, *C. dublinienses*) foram ajustadas para uma concentração maior, aumentando a sensibilidade da reação sem perder especificidade.

Figura 27 – Teste de hibridização demonstrando a sensibilidade das sondas marcadas. Vertical: os números de 1 a 28 representam amostras de biofilme supragengival; as duas últimas colunas contêm uma mistura dos padrões de referência das 37 espécies-alvo nas concentrações de 10^5 e 10^6 células microbianas; Horizontal: sondas marcadas com o mesmos DNA usados para a confecção dos padrões de referência.

Fonte: Própria (2018).

4.4.4. Quantificação microbiana total

A quantificação de genomas totais, ou seja, o somatório da quantidade total dos 37 microrganismos alvos de detecção sem discriminação de espécies, foi obtida para os diferentes sítios experimentais ao longo do tempo. A Tabela 8 contém a análise estatística dos dados sobre o genoma, detectado nas amostras de biofilme, em função dos fatores experimentais investigados e suas interações. Os fatores sítio de coleta (supragengival ou subgengival), substrato (zircônia, titânio, dentes contralaterais) e tempo (T0, T1, T2, T3) tiveram efeito individual significativo sobre a quantificação de genomas totais, assim como a interação entre eles ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Análise do efeito relativo dos fatores sítio de coleta do biofilme, substrato, tempo e suas interações.

Fator	Wald-Type Statistic (WTS)			ANOVA-Type Statistic (ATS)		
	Estatística	df	Valor <i>p</i>	Estatística	df	Valor <i>p</i>
Sítio	1094,74	1	$4,59 \times 10^{-240}$	1094,74	1,00	$4,59 \times 10^{-240}$
Substrato	114,51	3	$1,17 \times 10^{-24}$	32,20	2,86	$6,18 \times 10^{-20}$
Tempo	12072,32	3	$0,00 \times 10^{+00}$	4687,29	2,36	$0,00 \times 10^{+00}$
Sítio: Substrato	206,34	3	$1,80 \times 10^{-44}$	67,59	2,86	$9,46 \times 10^{-42}$
Sítio: Tempo	1207,93	3	$1,39 \times 10^{-261}$	410,02	2,36	$6,58 \times 10^{-211}$
Substrato: Tempo	1720,61	9	$0,00 \times 10^{+00}$	278,44	6,11	$0,00 \times 10^{+00}$
Sítio: Substrato: Tempo	679,77	9	$1,54 \times 10^{-140}$	108,23	6,11	$1,88 \times 10^{-139}$

Diferenças detectadas pelo teste *Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments* ($p < 0,05$)

df: graus de liberdade.

A figura 28 apresenta o gráfico Boxplot, contendo o valor mínimo, 1º quartil, mediana, 3º quartil e valor máximo da quantificação de genomas totais dos micro-organismos detectados nos diferentes sítios, substratos e tempos investigados. Diferenças significantes foram encontradas entre as medianas ao longo do tempo ($p < 0,05$). A figura 29 apresenta o gráfico de linhas contendo o efeito relativo dos fatores investigados e suas interações na quantificação de genomas totais. As interseções entre as linhas do gráfico expressam as interações entre os fatores sítio/substrato/tempo. A quantificação de genomas totais nos sítios supragengival e subgengival de implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio e dentes contralaterais (controle) foi significativamente menor no tempo T0 em relação aos demais tempos investigados, exceto na amostra de biofilme supragengival coletada da coroa do dente contralateral ao implante/conector de titânio.

Figura 28 – Gráfico BoxPlot da quantificação de genomas totais ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo de detecção identificadas no biofilme supragengival e subgengival dos sítios relacionados aos conectores protéticos de zircônia, titânio e dentes contralaterais ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 29 – Gráfico de linhas contendo o efeito relativo dos fatores sítio, substrato, tempo e suas interações na quantificação de genomas totais ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo de detecção.

Fonte: Própria (2018).

A Tabela 9 contém a mediana e o intervalo de confiança (IC 95%) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células). O número total de micro-organismos quantificados nos locais reabilitados com implante, conector de zircônia e coroa cerâmica aumentou ao longo dos períodos avaliados, em ambos os sítios coletados (supra e subgengival; $p < 0,05$). Nos locais restaurados com implante, conector de titânio e coroa metalocerâmica, a quantificação do genoma aumentou significativamente ao longo do tempo nas amostras de biofilme supragengival ($p < 0,05$). No sítio subgengival, foi observado aumento da quantificação do genoma no período de 12 meses e 36 meses de coleta, com redução da quantificação total no período de 24 meses ($p < 0,05$). Os substratos investigados influenciaram na quantidade total de microrganismos aderidos às superfícies. Os conectores de zircônia apresentaram maior quantificação do genoma subgengival quando comparadas aos conectores de titânio, em todos os tempos investigados ($p < 0,05$).

Tabela 9 – Mediana e Intervalo de Confiança (IC 95%) da quantificação de genomas totais ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo de detecção, identificadas no biofilme formado sobre as coroas cerâmicas e coroas de dentes contralaterais (biofilme supragengival), e no sulco peri-implantar dos implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio, e sulco periodontal dos dentes contralaterais (biofilme subgengival), ao longo do tempo.

Supragengival				
	T0	T1	T2	T3
Zircônia	2,12 ^A (1,56 – 1,85) _Z	4,82 ^{a,B} (4,86 – 4,98) _Z	5,43 ^{a,b,C} (5,52 – 5,64) _Z	5,63 ^{a,b,c} (5,65 – 5,82) _Z
Titânio	4,57 ^A (3,69 – 4,10) _T	4,61 ^{a,B} (4,69 – 4,85) _T	5,07 ^{a,b,C} (5,25 – 5,43) _T	5,58 ^{a,b,c} (5,66 – 5,90) _T
Zircônia (Controle)	2,04 ^A (1,73 – 1,96) _Z	4,60 ^{a,B} (4,68 – 4,82) _Z	5,25 ^{a,b,C} (5,38 – 5,53) _Z	5,79 ^{a,b,c} (5,80 – 6,02) _Z
Titânio (Controle)	5,61 ^A (5,31 – 5,60) _t	4,56 ^{a,B} (4,73 – 4,91) _t	5,24 ^{a,b,C} (5,34 – 5,54) _t	5,21 ^{a,b,c} (5,42 – 5,67) _t
Subgengival				
	T0	T1	T2	T3
Zircônia	0,31 ^A (0,21 – 0,41) _Z	4,94 ^{a,B} (4,99 – 5,10) _Z	4,95 ^{a,b,C} (5,04 – 5,16) _Z	5,14 ^{a,b,c} (5,21 – 5,33) _Z
Titânio	0,26 ^A (0,18 – 0,34) _T	4,66 ^{a,B} (4,77 – 4,92) _T	4,62 ^{a,b,C} (4,72 – 4,84) _T	4,74 ^{a,b,c} (4,86 – 5,00) _T
Zircônia (Controle)	0,11 ^A (0,05 – 0,16) _Z	4,73 ^{a,B} (4,82 – 4,95) _Z	4,70 ^{a,b,C} (4,80 – 4,92) _Z	4,83 ^{a,b,c} (4,90 – 5,00) _Z
Titânio (Controle)	1,89 ^A (1,47 – 1,74) _t	4,47 ^{a,B} (4,57 – 4,71) _t	4,61 ^{a,b,C} (4,78 – 4,93) _t	4,73 ^{a,b,c} (4,89 – 4,97) _t

Letras sobrescritas (maiúsculas e minúsculas) na mesma linha expressam diferenças significativas detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover* corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

Letras subscritas (maiúsculas e minúsculas) na mesma coluna expressam diferenças significativas detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover* corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

Os dentes contralaterais aos implantes restaurados com conectores de zircônia ou titânio, em geral, apresentaram aumento do número de micro-organismos detectados ao longo

do tempo investigado nas amostras de biofilme supragengival e subgengival. As amostras de biofilme subgengival apresentaram menor quantificação do genoma do que amostras de biofilme supragengival, nos diferentes substratos e tempos investigados.

4.4.5. Quantificação das espécies microbianas

A quantificação do genoma de cada uma das 37 espécies-alvo de detecção foi obtida nos diferentes sítios experimentais ao longo do tempo investigado. As figuras 30 a 37 ilustram os perfis microbianos ($\times 10^5$ células) do biofilme supragengival e subgengival coletados, respectivamente, das coroas protéticas sobre implantes e coroas dos dentes contralaterais (controle), e dos sulcos peri-implantares ao redor dos conectores protéticos de zircônia ou titânio e sulcos periodontais dos dentes contralaterais.

Todas as espécies investigadas foram encontradas colonizando as superfícies das coroas, os sulcos peri-implantares e periodontais, a partir dos 12 meses (Figuras 30 a 37) de função. O perfil microbiano detectado nos implantes restaurados com zircônia ou titânio é bastante semelhante ao encontrado nos respectivos dentes contralaterais (Figuras 30 a 37). Em geral, foi observado um aumento significativo do número de espécies em função do tempo nos diferentes sítios e substratos avaliados (quantificação do genoma: $T_0 < T_1 < T_2 < T_3$) (Figura 30 a 37), mantendo-se o perfil inicialmente apresentado. Níveis baixos a moderados de micro-organismos das diferentes espécies investigadas foram registrados nos sítios relacionados aos implantes e dentes contralaterais no período T_0 .

Os micro-organismos mais prevalentes nos biofilmes supra e subgengivais relacionados aos conectores de zircônia foram: Supragengival/Zircônia: $T_0 = V. parvula$ ($4,19 \times 10^5$), *S. gordonii* ($3,90 \times 10^5$), *T. denticola* ($2,89 \times 10^5$); $T_1 = Aa. a$ ($6,27 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($5,98 \times 10^5$), *P. melaninogenica* ($5,40 \times 10^5$); $T_2 = Aa. a$ ($7,07 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($6,38 \times 10^5$), *P. melaninogenica* ($6,34 \times 10^5$); $T_3 = Aa. a$ ($7,60 \times 10^5$), *P. melaninogenica* ($6,76 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($6,40 \times 10^5$). Supragengival/Dente contralateral (Controle zircônia): $T_0 = V. parvula$ ($3,17 \times 10^5$), *B. fragilis* ($3,04 \times 10^5$), *S. mutans* ($2,74 \times 10^5$); $T_1 = C. tropicalis$ ($6,02 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,84 \times 10^5$), *C. dubliniensis* ($5,45 \times 10^5$); $T_2 = Aa. a$ ($7,12 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($6,62 \times 10^5$), *S. sanguinis* ($6,56 \times 10^5$); $T_3 = V. parvula$ ($7,84 \times 10^5$), *S. sanguinis* ($7,61 \times 10^5$), *Aa. a* ($7,42 \times 10^5$). Subgengival/Zircônia: *V. parvula* ($2,90 \times 10^5$), *S. mitis* ($2,62 \times 10^5$), *P. giginvalis* ($2,11 \times 10^5$); $T_1 = C. tropicalis$ ($6,08 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,87 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($5,52 \times 10^5$); $T_2 = Aa. a$ ($6,23 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($5,84 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($5,68 \times 10^5$); $T_3 = F. nucleatum$ ($6,60 \times 10^5$), *Aa. a* ($6,13 \times 10^5$), *C. gingivalis* ($5,69 \times 10^5$). Subgengival/Dente contralateral (Controle zircônia): $T_0 = T. denticola$ ($2,15 \times 10^5$), *P. giginvalis* ($1,73 \times 10^5$); $T_1 = C. tropicalis$ ($6,17 \times 10^5$), *Aa. a*

($5,97 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($5,59 \times 10^5$); T2 = *Aa. a* ($5,93 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($5,87 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($5,80 \times 10^5$); T3 = *F. nucleatum* ($6,15 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,58 \times 10^5$), *B. fragilis* ($5,47 \times 10^5$) (Figuras 30-33).

As espécies mais prevalentes nos biofilmes supra e subgengivais relacionados aos conectores de titânio foram: Supragengival/Titânio: T0 = *P. putida* ($5,38 \times 10^5$), *S. mitis* ($5,32 \times 10^5$), *S. gordonii* ($5,28 \times 10^5$); T1 = *S. sanguinis* ($6,13 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,98 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($5,91 \times 10^5$); T2 = *V. parvula* ($7,10 \times 10^5$), *Aa. a* ($7,05 \times 10^5$), *S. sanguinis* ($6,95 \times 10^5$); T3 = *V. parvula* ($7,61 \times 10^5$), *S. sanguinis* ($7,54 \times 10^5$), *Aa. a* ($7,49 \times 10^5$). Supragengival/Dente contralateral (Controle Titânio): T0 = *S. sanguinis* ($7,14 \times 10^5$), *S. gordonii* ($6,95 \times 10^5$), *C. albicans* ($6,79 \times 10^5$); T1 = *V. parvula* ($6,53 \times 10^5$), *Aa. a* ($6,17 \times 10^5$), *S. sanguinis* ($6,03 \times 10^5$); T2 = *V. parvula* ($7,04 \times 10^5$), *S. sanguinis* ($6,79 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($6,72 \times 10^5$); T3 = *S. sanguinis* ($7,80 \times 10^5$), *S. mitis* ($7,45 \times 10^5$), *Aa. A* ($7,40 \times 10^5$). Subgengival/Titânio: T0 = *S. salivarius* ($2,01 \times 10^5$), *T. denticola* ($1,95 \times 10^5$), *S. sanguinis* ($1,87 \times 10^5$); T1 = *Aa. a* ($6,09 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($6,03 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($5,91 \times 10^5$); T2 = *F. nucleatum* ($6,03 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,73 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($5,66 \times 10^5$); T3 = *F. nucleatum* ($5,86 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($5,45 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,35 \times 10^5$). Subgengival/Dente contralateral (Controle titânio): T0 = *P. intermedia* ($2,97 \times 10^5$), *V. parvula* ($2,96 \times 10^5$), *Aa. a* ($2,88 \times 10^5$); T1 = *C. tropicalis* ($5,88 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,83 \times 10^5$), *F. nucleatum* ($5,69 \times 10^5$); T2 = *F. nucleatum* ($5,98 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,66 \times 10^5$), *C. tropicalis* ($5,60 \times 10^5$); T3 = *F. nucleatum* ($6,25 \times 10^5$), *Aa. a* ($5,67 \times 10^5$), *P. intermedia* ($5,51 \times 10^5$) (Figuras 34-37).

Figura 30 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival formado sobre as coroas protéticas dos implantes restaurados com conectores de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 31 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival dos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 32 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 33 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 34 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival formado sobre as coroas protéticas dos implantes restaurados com conectores de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 35 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival de implantes restaurados com conectores protéticos de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 36 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme supragengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

Figura 37 – Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme subgengival dos dentes contralaterais (controle) aos implantes restaurados com conectores protéticos de titânio. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 37 espécies-alvo do estudo ao longo do tempo.

Fonte: Própria (2018).

As espécies patogênicas relacionadas à etiologia da peri-implantite e periodontite foram agrupadas em cinco complexos microbianos (vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo) com base na descrição de Socransky et al. (1998). Micro-organismos colonizadores iniciais e levemente associados a doença periodontal foram reunidos no grupo “outras espécies” e três espécies de *Candida* foram reunidas no grupo “fungos”. As figuras 38 a 43 ilustram a porcentagem (%) do genoma dos grupos microbianos nas amostras de biofilme supragengival e subgengival relacionados aos implantes e dentes contralaterais ao longo do tempo.

Em geral, as maiores variações de porcentagem dos grupos microbianos nas amostras de biofilme supragengival e subgengival, coletadas dos sítios reabilitados com implantes e dentes contralaterais, ocorreram no tempo T0. Neste período, também foram registrados os menores valores de porcentagem para as espécies investigadas. A porcentagem do genoma dos grupos microbianos foi praticamente constante nos demais tempos investigados. No período T0 foi verificado maiores porcentagens de micro-organismos do complexo vermelho nos sítios subgengivais (14% a 100%) do que nos sítios supragengivais (8% a 10%). Além disso, foi observado maior percentual de micro-organismos do complexo amarelo e roxo nos diferentes sítios e substratos, quando comparado aos demais tempos. Já as espécies do complexo verde, foram encontradas em maiores porcentagens nos locais reabilitados com conectores protéticos de zircônia e em sítio subgengival, do que em locais com conectores de titânio e sítio supragengival. Não foi detectada espécie do complexo laranja nos sítios subgengivais relacionados aos implantes e nenhuma espécie de fungo foi encontrada nos sítios subgengivais de implantes e dentes contralaterais, no tempo T0.

Nos diferentes sítios experimentais, foi observado baixa porcentagem (8% a 9%) de micro-organismos do complexo vermelho nos tempos T1, T2 e T3. Os micro-organismos do complexo laranja, em geral, apresentaram porcentagens semelhantes nos sítios subgengivais (14%) e sítios supragengivais (13%), a partir do tempo T1. Já para o complexo amarelo, foram encontradas porcentagens ligeiramente superiores das espécies nas amostras supragengivais (11% a 12%) quando comparadas às amostras subgengivais (10%) dos diferentes substratos investigados. A porcentagem do complexo verde (8% a 9%), do complexo roxo (3% a 4%) e do grupo “fungos” (8% a 9%) foi constante a partir tempo T1. Micro-organismos do grupo “outras espécies” foram encontradas em porcentagens mais elevadas em todos os períodos investigados, representando aproximadamente 50% das espécies-alvo detectadas.

Figura 38 – Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme supragengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia ou titânio.

Fonte: Própria (2018).

Figura 39 – Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme subgengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia ou titânio.

Fonte: Própria (2018).

Figura 40 – Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme supragengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia e dentes contralaterais (controle).

Fonte: Própria (2018).

Figura 41 – Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme subgengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de zircônia e dentes contralaterais (controle).

Fonte: Própria (2018).

Figura 42 – Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme supragengival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de titânio e dentes contralaterais (controle).

Fonte: Própria (2018).

Figura 43 – Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme subgingival relacionados aos locais reabilitados com implantes e conectores protéticos de titânio e dentes contralaterais (controle).

Fonte: Própria (2018).

A Tabela 10 contém o resultado da análise do efeito relativo dos fatores substrato (zircônia, titânio e dentes contralaterais), tempo (T0, T1, T2, T3) e as diferentes espécies-alvo sobre a quantificação dos genomas dos micro-organismos. *Wald-Type Statistic* (WTS) e *ANOVA-Type Statistic* (ATS) foram usados para investigar a hipótese de ausência de interação entre os fatores. Todos os fatores investigados isoladamente, bem como suas interações, tiveram efeito significativo sobre a quantificação ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Análise dos efeitos relativos dos fatores espécie microbiana, tempo, substrato e suas interações.

Fator	Wald-Type Statistic (WTS)			ANOVA-Type Statistic (ATS)		
	Estatística	df	Valor p	Estatística	df	Valor p
Espécies	205261,56	37	$0,00 \times 10^{+00}$	162,61	13,15	$0,00 \times 10^{+00}$
Tempo	14314,60	3	$0,00 \times 10^{+00}$	5310,67	2,62	$0,00 \times 10^{+00}$
Substrato	5123,85	7	$0,00 \times 10^{+00}$	771,42	4,83	$0,00 \times 10^{+00}$
Espécies: Tempo	154947,11	111	$0,00 \times 10^{+00}$	44,05	31,11	$1,14 \times 10^{-268}$
Substrato: Tempo	19881,31	21	$0,00 \times 10^{+00}$	550,35	9,61	$0,00 \times 10^{+00}$
Espécies: Substrato	107540,43	222	$0,00 \times 10^{+00}$	10,32	70,60	$6,82 \times 10^{-110}$
Espécies: Tempo: Substrato	1661,44	222	$1,67 \times 10^{-218}$	7,64	102,35	$3,53 \times 10^{-105}$

Diferenças detectadas pelo teste *Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments* ($p < 0,05$)

df: graus de liberdade.

As Tabelas 11 a 14 contém a mediana e intervalo interquartil da quantificação dos genomas ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme supragengival e subgengival dos locais relacionados aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia, titânio e dentes contralaterais. De uma forma geral, uma menor diversidade microbiana foi encontrada no tempo T0 em todos os sítios avaliados. As espécies detectadas apresentaram menores contagens de genomas neste período, com diferenças significantes quando comparadas aos demais tempos investigados ($p < 0,001$). Com o passar do tempo, a diversidade microbiana aumentou significativamente, com todas as espécies-alvo sendo detectadas nos biofilmes supragengival e subgengival coletados dos diferentes substratos, com aumento da quantificação do genoma para a maioria das espécies investigadas.

Tabela 11 – Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme supragengival formado sobre as coroas protéticas cimentadas sobre os conectores de zircônia e titânio.

Efeitos das coroas protéticas cimentadas sobre os colonizadores de Zircônia e titânio:																	
Grupos/Espécies	Zircônia (Supragengival)								Titânio (Supragengival)								p
	T0		T1		T2		T3		T0		T1		T2		T3		
	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	
Complexo Vermelho																	
<i>P. gingivalis</i>	0,00 ^A	0,00	4,65 ^{A,*}	0,51	5,44 ^{a,*}	0,35	5,08 ^{a,*}	1,22	5,06 ^B	0,00	4,38 ^{B,*}	0,27	4,89 ^{B,*}	0,14	5,52 ^{B,**}	2,81	<0,001
<i>T. forsythia</i>	2,19 ^A	0,00	5,14 ^a	0,66	5,40 ^a	0,72	6,17 ^a	0,56	3,89 ^B	0,00	4,86 ^B	0,43	4,94 ^{B,*}	0,10	5,73 ^{b,*}	1,58	<0,001
<i>T. denticola</i>	2,89 ^A	0,00	4,84 ^{a,*}	0,45	5,36 ^{a,**}	0,32	5,74 ^{a,**}	0,12	4,74 ^B	0,00	4,43 ^{B,*}	0,39	5,06 ^{B,**}	0,19	5,35 ^{b,**}	1,04	<0,001
Complexo Laranja																	
<i>C. rectus</i>	2,31 ^A	0,00	4,82 ^A	0,51	5,54 ^a	0,21	5,71 ^a	0,57	0,00 ^B	0,00	4,92 ^b	0,44	5,29 ^b	0,44	5,34 ^b	1,16	<0,001
<i>F. nucleatum</i>	1,87 ^A	0,00	5,13 ^{a,*}	1,01	5,94 ^a	1,13	6,24 ^{a,**}	1,44	4,76 ^B	0,00	5,12 ^B	0,69	5,60 ^B	0,54	7,01 ^b	1,64	<0,001
<i>P. intermedia</i>	2,49 ^A	0,00	4,55 ^{A,*}	0,50	5,59 ^a	0,49	5,08 ^{a,*}	1,39	4,98 ^B	0,00	4,42 ^{B,*}	0,45	4,93 ^B	0,21	5,90 ^{B,**}	1,69	<0,001
<i>P. micra</i>	0,00 ^A	0,00	4,62 ^{A,*}	0,32	5,24 ^{A,*}	0,11	4,99 ^{A,**}	0,41	4,38 ^B	0,00	4,44 ^B	0,30	4,96 ^B	0,31	4,65 ^B	0,30	<0,001
<i>P. nigrescens</i>	0,00 ^A	0,00	4,60 ^a	0,36	5,21 ^a	0,28	5,11 ^a	0,39	4,57 ^B	0,00	4,26 ^B	0,18	4,88 ^B	0,35	4,95 ^B	1,26	<0,001
Complexo Amarelo																	
<i>S. mitis</i>	2,85 ^A	0,00	4,86 ^{a,*}	0,79	5,79 ^{a,**}	0,70	6,36 ^{a,**}	0,84	5,32 ^B	0,00	5,39 ^B	0,90	6,10 ^{b,**}	1,75	6,87 ^{b,**}	1,28	<0,001
<i>S. oralis</i>	2,64 ^A	0,00	4,94 ^{a,*}	0,28	5,16 ^{a,**}	0,13	5,47 ^{a,**}	0,30	4,99 ^B	0,00	4,51 ^{b,*}	0,51	4,72 ^{b,**}	0,10	5,31 ^{b,**}	0,78	<0,001
<i>S. sanguinis</i>	2,71 ^A	0,00	4,87 ^A	0,95	5,86 ^A	0,67	6,13 ^A	0,66	3,56 ^B	0,00	6,13 ^{B,*}	1,95	6,95 ^{b,*}	1,64	7,54 ^{b,*}	0,86	<0,001
<i>S. gordonii</i>	3,90 ^A	0,00	4,59 ^{A,*}	0,36	5,21 ^{a,*}	0,31	5,28 ^{a,*}	0,82	5,28 ^B	0,00	4,24 ^B	0,33	4,75 ^B	0,42	5,23 ^B	0,79	<0,001
Complexo Verde																	
<i>Aa. a</i>	2,44 ^A	0,00	6,27 ^{A,*}	0,99	7,07 ^{a,*}	0,27	7,60 ^{a,*}	0,21	0,00 ^B	0,00	5,98 ^{B,*}	0,96	7,05 ^{b,*}	0,23	7,49 ^{b,*}	0,33	<0,001
<i>C. gingivalis</i>	2,70 ^A	0,00	4,93 ^A	0,42	5,56 ^a	0,16	5,71 ^a	1,02	4,12 ^B	0,00	4,84 ^{B,*}	0,86	5,27 ^{b,*}	0,56	5,15 ^{b,*}	0,97	<0,001
<i>E. corrodens</i>	1,73 ^A	0,00	4,67 ^{A,*}	0,44	5,38 ^{a,*}	0,29	5,45 ^{a,*}	0,36	3,11 ^B	0,00	4,28 ^{B,*}	0,27	4,98 ^{B,*}	0,18	5,01 ^{b,*}	0,41	<0,001
Complexo Roxo																	
<i>V. parvula</i>	4,19 ^A	0,00	5,03 ^{a,*}	0,45	5,74 ^{a,**}	1,10	6,40 ^{a,**}	1,16	4,61 ^B	0,00	5,79 ^{b,*}	1,66	7,10 ^{b,**}	0,94	7,61 ^{b,**}	0,39	<0,001
Outras Espécies																	
<i>B. fragilis</i>	2,12 ^A	0,00	5,13 ^{a,*}	0,50	5,84 ^{a,**}	0,30	5,31 ^{a,*}	0,39	5,04 ^B	0,00	5,21 ^B	0,71	5,57 ^b	0,84	5,66 ^b	1,05	<0,001
<i>E.coli</i>	0,00 ^A	0,00	4,66 ^{A,*}	0,26	5,29 ^{a,*}	0,42	6,07 ^{a,*}	0,47	2,50 ^B	0,00	4,35 ^{B,*}	0,23	5,39 ^{b,*}	0,29	5,59 ^{b,*}	0,35	<0,001
<i>E. faecalis</i>	0,00 ^A	0,00	4,86 ^{a,*}	0,57	5,60 ^{a,**}	0,21	5,65 ^{a,**}	1,01	4,59 ^B	0,00	4,48 ^B	0,11	5,30 ^{b,*}	0,49	5,92 ^{b,**}	1,10	<0,001
<i>K. pneumoniae</i>	0,00 ^A	0,00	4,69 ^{a,*}	0,81	5,88 ^{a,**}	0,18	5,26 ^{a,**}	0,80	0,00 ^B	0,00	4,67 ^{b,*}	0,64	5,06 ^{b,**}	0,40	5,39 ^{b,**}	1,16	<0,001
<i>L. Casei</i>	2,14 ^A	0,00	4,92 ^{a,*}	0,73	5,39 ^{a,**}	0,25	5,83 ^{a,**}	0,90	4,57 ^B	0,00	4,65 ^{b,*}	0,50	5,03 ^{b,**}	0,20	5,03 ^{b,**}	0,40	<0,001

<i>M.salivarium</i>	0,00 ^A	0,00	4,91 ^{a,*}	0,50	5,31 ^{a,**}	0,23	5,20 ^{a,**}	0,78	4,38 ^B	0,00	4,82 ^{b,*}	0,71	4,99 ^{b,**}	0,12	4,78 ^{b,*}	0,28	<0,001
<i>P. anaerobius</i>	2,02 ^A	0,00	4,39 ^{a,*}	0,45	5,37 ^{a,**}	0,29	5,39 ^{a,**}	1,21	5,27 ^B	0,00	4,25 ^b	0,20	4,97 ^B	0,48	5,37 ^B	1,00	<0,001
<i>P. endodontalis</i>	0,00 ^A	0,00	4,49 ^{a,*}	0,78	5,47 ^{a,*}	0,32	5,30 ^{a,*}	1,10	5,14 ^B	0,00	4,71 ^B	0,38	4,91 ^B	0,86	5,78 ^B	2,77	<0,001
<i>P. melaninogenica</i>	0,00 ^A	0,00	5,40 ^{a,*}	0,38	6,34 ^{a,**}	0,28	6,76 ^{a,**}	0,54	2,74 ^B	0,00	5,33 ^{b,*}	0,63	6,31 ^{b,**}	0,31	6,64 ^{b,**}	0,75	<0,001
<i>P. aeruginosa</i>	1,80 ^A	0,00	4,41 ^{a,*}	0,32	5,22 ^{a,**}	0,13	5,08 ^{a,**}	0,79	4,33 ^B	0,00	4,16 ^b	0,49	4,75 ^B	0,13	4,61 ^B	0,27	<0,001
<i>P. putida</i>	2,17 ^A	0,00	4,57 ^{a,*}	0,33	5,17 ^{a,*}	0,27	4,97 ^{a,*}	0,36	5,38 ^B	0,00	4,13 ^{b,*}	0,31	4,74 ^{B,*}	0,17	4,91 ^{B,*}	0,73	<0,001
<i>S. moreei</i>	0,00 ^A	0,00	4,48 ^{a,*}	0,44	5,33 ^{a,*}	0,36	5,35 ^{a,*}	0,78	5,27 ^B	0,00	4,10 ^{b,*}	0,21	5,09 ^{B,*}	0,78	4,87 ^{B,*}	0,48	<0,001
<i>S. aureus</i>	0,00 ^A	0,00	4,66 ^{A,*}	0,44	5,30 ^{a,*}	0,48	5,33 ^{a,*}	0,77	4,11 ^B	0,00	4,41 ^{B,*}	0,47	4,87 ^{B,*}	0,51	5,67 ^{b,*}	0,79	<0,001
<i>S. mutans</i>	2,39 ^A	0,00	4,66 ^{A,*}	0,53	5,03 ^{A,*}	0,22	5,97 ^{a,*}	0,96	4,79 ^B	0,00	4,58 ^B	0,41	4,64 ^B	0,11	6,53 ^B	1,28	<0,001
<i>S. salivarius</i>	2,59 ^A	0,00	4,93 ^{A,*}	0,53	5,47 ^{a,*}	0,43	5,40 ^{a,*}	0,41	4,20 ^B	0,00	4,57 ^{B,*}	0,58	5,47 ^{B,*}	0,96	6,66 ^{b,*}	1,19	<0,001
<i>S. sobrinus</i>	2,24 ^A	0,00	4,96 ^{a,*}	0,76	5,40 ^{a,**}	0,20	5,63 ^{a,**}	0,53	0,00 ^B	0,00	5,01 ^{b,*}	0,74	4,93 ^{b,*}	0,19	5,62 ^{b,**}	0,64	<0,001
<i>S. parasanguinis</i>	2,55 ^A	0,00	5,00 ^{a,*}	0,46	5,23 ^{a,**}	0,12	5,31 ^{a,**}	0,44	4,62 ^B	0,00	4,39 ^{b,*}	0,45	4,87 ^{b,**}	0,34	5,54 ^{b,***}	0,64	<0,001
<i>S. pasteurii</i>	1,79 ^A	0,00	4,78 ^a	0,52	5,23 ^a	0,14	5,30 ^a	0,22	4,68 ^B	0,00	4,45 ^B	0,30	4,61 ^B	0,07	4,95 ^B	0,46	<0,001
Fungos																	
<i>C. albicans</i>	1,98 ^A	0,00	5,21 ^{a,*}	0,77	5,96 ^{a,**}	0,68	5,39 ^{a,**}	0,58	4,11 ^B	0,00	5,06 ^b	0,49	5,32 ^{b,*}	0,26	5,02 ^b	0,37	<0,001
<i>C. dubliniensis</i>	2,41 ^A	0,00	5,33 ^{a,*}	0,62	6,12 ^{a,**}	0,73	5,38 ^a	0,67	0,00 ^B	0,00	5,32 ^b	0,66	5,34 ^b	0,31	4,91 ^b	0,12	<0,001
<i>C. tropicalis</i>	2,02 ^A	0,00	5,98 ^{a,*}	0,42	6,38 ^{a,**}	0,75	6,00 ^{a,*}	0,51	5,04 ^B	0,00	5,91 ^{b,*}	0,55	6,23 ^{b,**}	0,31	5,71 ^{b,*}	0,62	<0,001

Letras iguais (maiúsculas e minúsculas) e diferentes símbolos sobrescritos na mesma linha expressam diferenças significativas intragrupo, detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover* corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

Tabela 12 – Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme subgengival dos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio.

Protocolos de Zircônia e Titânio.																		
Grupos/Espécies	Zircônia (Subgengival)								Titânio (Subgengival)								p	
	T0		T1		T2		T3		T0		T1		T2		T3			
	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ		
Complexo Vermelho																		
<i>P. gingivalis</i>	2,11 ^A	0,00	4,95 ^a	0,37	4,85 ^a	0,43	5,30 ^a	1,89	0,00 ^B	0,00	5,26 ^b	1,65	4,45 ^b	2,13	4,58 ^b	2,44	<0,001	
<i>T. forsythia</i>	0,00 ^A	0,00	4,89 ^a	0,36	4,97 ^a	0,30	5,31 ^a	0,73	0,00 ^B	0,00	4,92 ^b	1,04	4,66 ^b	1,40	4,83 ^b	1,38	<0,001	
<i>T. denticola</i>	0,00 ^A	0,00	4,89 ^a	0,38	4,93 ^a	0,27	5,05 ^a	0,33	1,95 ^B	0,00	4,53 ^b	1,33	4,66 ^b	0,61	4,77 ^b	0,34	<0,001	
Complexo Laranja																		
<i>C. rectus</i>	0,00 ^A	0,00	5,30 ^a	0,40	5,25 ^a	0,37	5,46 ^a	0,55	0,00 ^B	0,00	5,40 ^b	0,42	4,85 ^b	0,72	5,01 ^b	0,83	<0,001	
<i>F. nucleatum</i>	0,00 ^A	0,00	5,39 ^a	0,35	5,68 ^a	0,41	6,60 ^a	2,24	0,00 ^B	0,00	5,91 ^b	1,00	6,03 ^b	1,08	5,86 ^b	2,23	<0,001	
<i>P. intermedia</i>	0,00 ^A	0,00	4,84 ^a	0,31	4,92 ^a	0,35	5,12 ^a	0,81	0,00 ^B	0,00	4,99 ^b	1,28	4,82 ^b	1,25	4,87 ^b	1,93	<0,001	
<i>P. micra</i>	0,00 ^A	0,00	4,65 ^{A,*}	0,32	4,85 ^{A,*}	0,18	4,95 ^{a,**}	0,36	0,00 ^B	0,00	4,33 ^B	0,21	4,33 ^B	0,08	4,55 ^B	0,11	<0,001	
<i>P. nigrescens</i>	0,00 ^A	0,00	4,65 ^A	0,37	4,77 ^A	0,20	4,91 ^A	0,38	0,00 ^B	0,00	4,28 ^B	0,20	4,41 ^B	0,17	4,45 ^B	0,17	<0,001	
Complexo Amarelo																		
<i>S. mitis</i>	2,62 ^A	0,00	4,74 ^{a,*}	0,42	4,86 ^{a,**}	0,21	5,16 ^{a,**}	0,58	0,00 ^B	0,00	4,31 ^b	0,55	4,64 ^b	0,34	4,60 ^b	0,57	<0,001	
<i>S. oralis</i>	0,00 ^A	0,00	4,85 ^a	0,31	4,98 ^{a,*}	0,15	4,87 ^{a,**}	0,27	0,00 ^B	0,00	4,39 ^{b,*}	0,29	4,42 ^b	0,05	4,52 ^{b,**}	0,11	<0,001	
<i>S. sanguinis</i>	0,00 ^A	0,00	4,67 ^A	0,35	4,83 ^A	0,16	4,99 ^A	0,41	1,87 ^B	0,00	4,52 ^B	0,61	4,88 ^B	0,39	4,68 ^B	0,27	<0,001	
<i>S. gordonii</i>	0,00 ^A	0,00	4,66 ^a	0,37	4,75 ^a	0,18	5,04 ^a	0,36	1,86 ^B	0,00	4,24 ^B	0,20	4,35 ^B	0,08	4,49 ^B	0,21	<0,001	
Complexo Verde																		
<i>Aa. a</i>	1,78 ^A	0,00	5,87 ^A	0,20	6,23 ^A	0,42	6,13 ^A	0,38	0,00 ^B	0,00	6,09 ^B	0,37	5,73 ^B	0,42	5,35 ^B	0,54	<0,001	
<i>C. gingivalis</i>	0,00 ^A	0,00	5,10 ^a	0,49	5,15 ^a	0,30	5,69 ^a	0,35	0,00 ^B	0,00	5,09 ^{b,*}	0,28	4,84 ^{B,*}	0,23	5,01 ^{b,*}	0,48	<0,001	
<i>E. corrodens</i>	0,00 ^A	0,00	4,81 ^a	0,37	4,90 ^a	0,29	5,25 ^a	0,38	0,00 ^B	0,00	4,58 ^B	0,12	4,51 ^B	0,02	4,66 ^B	0,05	<0,001	
Complexo Roxo																		
<i>V. parvula</i>	2,90 ^A	0,00	4,87 ^{a,*}	0,51	4,86 ^{a,*}	0,24	5,17 ^{a,*}	0,42	1,86 ^B	0,00	4,77 ^b	1,03	4,90 ^b	0,90	4,77 ^b	0,45	<0,001	
Outras Espécies																		
<i>B. fragilis</i>	0,00 ^A	0,00	5,52 ^a	0,21	5,39 ^a	0,42	5,65 ^a	0,30	0,00 ^B	0,00	5,23 ^b	0,20	5,02 ^b	0,25	5,24 ^b	0,43	<0,001	
<i>E.coli</i>	0,00 ^A	0,00	4,78 ^{A,*}	0,33	5,03 ^{a,*}	0,29	5,27 ^{a,*}	0,37	0,00 ^B	0,00	4,66 ^B	0,14	4,54 ^B	0,05	4,76 ^B	0,11	<0,001	
<i>E. faecalis</i>	0,00 ^A	0,00	5,20 ^{a,*}	0,49	5,19 ^{a,*}	0,15	5,66 ^{a,**}	0,89	0,00 ^B	0,00	5,03 ^b	0,42	5,02 ^b	0,28	5,13 ^b	0,55	<0,001	
<i>K. pneumoniae</i>	0,00 ^A	0,00	5,04 ^a	0,27	5,04 ^a	0,24	5,15 ^a	0,47	0,00 ^B	0,00	4,98 ^{b,*}	0,45	4,80 ^{b,**}	0,08	5,05 ^{b,*}	0,23	<0,001	
<i>L. Casei</i>	0,00 ^A	0,00	4,85 ^{a,*}	0,33	5,02 ^{a,**}	0,35	5,18 ^{a,***}	0,27	0,00 ^B	0,00	4,72 ^{b,*}	0,39	4,56 ^{b,**}	0,05	4,80 ^{b,*}	0,20	<0,001	

<i>M.salivarium</i>	0,00 ^A	0,00	5,00 ^a	0,38	5,06 ^a	0,27	5,22 ^a	0,38	0,00 ^B	0,00	4,71 ^{b,*}	0,45	4,48 ^{b,**}	0,12	4,74 ^{b,*}	0,21	<0,001
<i>P. anaerobius</i>	1,99 ^A	0,00	4,67 ^{a,*}	0,32	4,79 ^{a,**}	0,22	4,91 ^{a,**}	0,34	0,00 ^B	0,00	4,41 ^b	0,57	4,66 ^b	0,43	4,60 ^b	0,16	<0,001
<i>P. endodontalis</i>	0,00 ^A	0,00	4,70 ^a	0,67	4,85 ^a	0,32	5,12 ^a	0,74	0,00 ^B	0,00	4,58 ^b	1,63	4,59 ^b	1,15	4,60 ^b	1,48	<0,001
<i>P. melaninogenica</i>	0,00 ^A	0,00	5,26 ^{a,*}	0,48	5,42 ^a	0,30	5,08 ^{a,*}	0,87	0,00 ^B	0,00	4,95 ^b	0,75	5,13 ^b	0,83	5,03 ^b	0,17	<0,001
<i>P. aeruginosa</i>	0,00 ^A	0,00	4,65 ^a	0,34	4,83 ^a	0,24	5,09 ^{a,*}	0,39	0,00 ^B	0,00	4,37 ^b	0,26	4,32 ^b	0,12	4,59 ^b	0,07	<0,001
<i>P. putida</i>	0,00 ^A	0,00	4,70 ^a	0,55	4,77 ^a	0,23	5,00 ^a	0,40	0,00 ^B	0,00	4,26 ^B	0,16	4,37 ^B	0,08	4,50 ^B	0,10	<0,001
<i>S. moorei</i>	0,00 ^{A,*}	0,00	4,58 ^{A,*}	0,30	4,77 ^{a,*}	0,18	4,96 ^{a,*}	0,34	0,00 ^B	0,00	4,25 ^B	0,17	4,42 ^B	0,04	4,56 ^B	0,18	<0,001
<i>S. aureus</i>	0,00 ^A	0,00	4,73 ^{A,*}	0,55	4,83 ^{A,*}	0,28	5,09 ^{a,*}	0,44	0,00 ^B	0,00	4,47 ^B	0,42	4,57 ^B	0,30	4,61 ^B	0,55	<0,001
<i>S. mutans</i>	0,00 ^A	0,00	4,63 ^{A,*}	0,29	4,81 ^{a,*}	0,13	5,16 ^{a,*}	0,42	0,00 ^B	0,00	4,43 ^{B,*}	0,41	4,50 ^{B,*}	0,26	4,73 ^{b,*}	0,96	<0,001
<i>S. salivarius</i>	0,00 ^A	0,00	4,60 ^{A,*}	0,34	4,80 ^{a,*}	0,18	5,13 ^{a,*}	0,38	2,01 ^B	0,00	4,44 ^B	0,62	4,71 ^B	0,29	4,59 ^B	0,32	<0,001
<i>S. sobrinus</i>	0,00 ^A	0,00	4,84 ^a	0,43	4,94 ^a	0,26	5,03 ^a	0,31	0,00 ^B	0,00	4,57 ^{b,*}	0,30	4,55 ^{b,*}	0,10	4,68 ^{b,**}	0,16	<0,001
<i>S. parasanguinis</i>	0,00 ^A	0,00	4,72 ^{a,*}	0,25	4,90 ^{a,**}	0,19	4,98 ^{a,**}	0,31	0,00 ^B	0,00	4,35 ^{b,*}	0,25	4,38 ^{b,*}	0,07	4,53 ^{b,**}	0,05	<0,001
<i>S. pasteurii</i>	0,00 ^A	0,00	4,67 ^a	0,28	4,82 ^a	0,22	4,95 ^a	0,27	0,00 ^B	0,00	4,30 ^B	0,18	4,41 ^B	0,07	4,55 ^B	0,09	<0,001
Fungos																	
<i>C. albicans</i>	0,00 ^A	0,00	5,14 ^a	0,39	5,00 ^a	0,26	5,00 ^a	0,23	0,00 ^B	0,00	4,89 ^{b,*}	0,21	4,79 ^{b,**}	0,07	4,89 ^{b,*}	0,09	<0,001
<i>C. dubliniensis</i>	0,00 ^A	0,00	5,23 ^a	0,43	4,99 ^a	0,26	5,10 ^a	0,34	0,00 ^B	0,00	5,11 ^{b,*}	0,17	4,77 ^{b,**}	0,07	4,81 ^{b,**}	0,06	<0,001
<i>C. tropicalis</i>	0,00 ^A	0,00	6,08 ^{a,*}	0,54	5,84 ^{a,*}	0,43	5,37 ^{a,**}	0,36	0,00 ^B	0,00	6,03 ^{b,*}	0,41	5,66 ^{b,*}	0,14	5,45 ^{b,**}	0,50	<0,001

Letras iguais (maiúsculas e minúsculas) e diferentes símbolos sobrescritos na mesma linha expressam diferenças significativas intragrupo, detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover* corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

Tabela 13 – Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme supragengival dos dentes contralaterais aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio.

Grupos/Espécies	Controle Zircônia (Supragengival)								Controle Titânio (Supragengival)								p
	T0		T1		T2		T3		T0		T1		T2		T3		
	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	
Complexo Vermelho																	
<i>P. gingivalis</i>	1,85 ^A	0,00	4,09 ^{A,*}	0,36	5,03 ^{a,*}	0,40	5,49 ^{a,*}	1,14	5,92 ^B	0,00	4,24 ^B	1,01	5,08 ^B	2,14	5,14 ^B	2,10	<0,001
<i>T. forsythia</i>	2,36 ^A	0,00	4,84 ^{A,*}	0,31	5,27 ^{a,*}	0,50	5,67 ^a	1,21	5,53 ^B	0,00	4,58 ^b	0,54	5,13 ^B	1,15	5,60 ^B	1,41	<0,001
<i>T. denticola</i>	2,36 ^A	0,00	4,50 ^{A,*}	0,28	5,11 ^{a,*}	0,39	5,57 ^a	1,13	5,95 ^B	0,00	4,54 ^b	0,48	5,24 ^B	0,90	5,48 ^B	0,74	<0,001
Complexo Laranja																	
<i>C. rectus</i>	2,09 ^A	0,00	4,55 ^A	0,69	5,23 ^a	1,72	6,31 ^a	1,54	4,78 ^B	0,00	5,31 ^b	0,47	5,90 ^b	1,33	5,25 ^b	1,52	<0,001
<i>F. nucleatum</i>	1,33 ^A	0,00	4,92 ^{A,*}	1,06	5,63 ^{a,*}	0,56	7,20 ^a	1,67	5,49 ^B	0,00	5,85 ^B	0,48	6,72 ^B	1,30	6,97 ^B	2,41	<0,001
<i>P. intermedia</i>	1,98 ^A	0,00	4,33 ^a	0,25	5,10 ^a	0,38	5,25 ^a	1,26	6,05 ^B	0,00	4,22 ^{b,*}	1,25	5,83 ^{B,*}	2,38	5,45 ^{B,*}	3,11	<0,001
<i>P. micra</i>	0,00 ^A	0,00	4,33 ^{A,*}	0,31	5,07 ^{A,*}	0,46	4,70 ^{A,**}	0,57	6,11 ^B	0,00	3,88 ^{B,*}	0,48	4,93 ^{B,*}	0,27	4,48 ^{b,*}	0,23	<0,001
<i>P. nigrescens</i>	0,00 ^A	0,00	4,36 ^{A,*}	0,40	4,97 ^{a,*}	0,49	5,54 ^{a,*}	1,24	5,62 ^B	0,00	4,05 ^{b,*}	0,51	4,85 ^{B,*}	0,44	4,98 ^{B,*}	0,64	<0,001
Complexo Amarelo																	
<i>S. mitis</i>	2,58 ^A	0,00	4,85 ^{a,*}	0,55	5,94 ^{a,**}	0,62	7,08 ^{a,***}	1,43	6,44 ^B	0,00	5,58 ^b	1,00	6,68 ^b	1,64	7,45 ^B	1,25	<0,001
<i>S. oralis</i>	2,73 ^A	0,00	4,56 ^{a,*}	0,48	4,94 ^{a,**}	0,18	5,25 ^{a,***}	1,29	6,34 ^B	0,00	4,48 ^{b,*}	0,48	4,59 ^{b,*}	0,17	4,62 ^{b,**}	0,45	<0,001
<i>S. sanguinis</i>	2,52 ^A	0,00	4,87 ^{A,*}	1,70	6,56 ^{a,*}	1,89	7,61 ^{a,*}	0,89	7,14 ^B	0,00	6,03 ^B	0,57	6,79 ^B	1,33	7,80 ^B	0,27	<0,001
<i>S. gordonii</i>	2,47 ^A	0,00	4,39 ^{A,*}	0,68	5,09 ^{a,*}	0,76	5,29 ^{a,*}	1,30	6,95 ^B	0,00	4,27 ^{b,*}	0,06	4,97 ^{B,*}	0,76	5,09 ^{B,*}	0,59	<0,001
Complexo Verde																	
<i>Aa. a</i>	2,66 ^A	0,00	5,84 ^{A,*}	0,80	7,12 ^{a,*}	0,31	7,42 ^{a,*}	0,21	5,21 ^B	0,00	6,17 ^{B,*}	0,51	6,60 ^{B,*}	0,30	7,40 ^{b,*}	0,29	<0,001
<i>C. gingivalis</i>	2,39 ^A	0,00	4,78 ^A	0,44	5,46 ^a	0,39	5,71 ^a	1,97	4,72 ^B	0,00	5,46 ^b	0,56	5,61 ^b	1,02	5,10 ^b	0,94	<0,001
<i>E. corrodens</i>	0,00 ^A	0,00	4,41 ^{A,*}	0,33	5,09 ^{a,*}	0,11	5,41 ^{a,*}	0,71	4,67 ^B	0,00	4,40 ^B	0,17	5,01 ^B	0,25	4,79 ^B	0,10	<0,001
Complexo Roxo																	
<i>V. parvula</i>	3,17 ^A	0,00	5,36 ^{a,*}	0,94	6,17 ^{a,**}	1,28	7,84 ^{a,***}	0,70	6,76 ^B	0,00	6,53 ^b	1,94	7,04 ^B	1,54	6,97 ^B	1,89	<0,001
Outras Espécies																	
<i>B. fragilis</i>	3,04 ^A	0,00	4,92 ^{A,*}	0,32	5,62 ^a	0,14	5,29 ^{a,*}	0,59	4,49 ^B	0,00	5,59 ^b	0,49	5,53 ^b	0,60	6,05 ^b	0,97	<0,001
<i>E.coli</i>	2,04 ^A	0,00	4,42 ^{A,*}	0,30	5,22 ^{a,*}	0,13	6,00 ^a	0,78	3,69 ^B	0,00	4,61 ^B	0,11	5,25 ^B	0,29	4,96 ^B	0,38	<0,001
<i>E. faecalis</i>	1,55 ^A	0,00	4,75 ^{a,*}	0,50	5,54 ^{a,**}	0,20	6,20 ^{a,***}	0,93	5,61 ^B	0,00	4,80 ^b	0,15	5,74 ^B	0,61	5,71 ^B	0,91	<0,001
<i>K. pneumoniae</i>	0,00 ^A	0,00	4,47 ^{a,*}	0,23	5,09 ^{a,**}	0,25	5,92 ^{a,***}	1,28	0,00 ^B	0,00	4,37 ^{b,*}	0,15	5,32 ^{b,**}	0,46	5,50 ^{b,**}	1,24	<0,001
<i>L. Casei</i>	1,63 ^A	0,00	4,43 ^{a,*}	0,34	5,13 ^{a,**}	0,35	5,76 ^{a,***}	0,76	5,64 ^B	0,00	4,46 ^{b,*}	0,34	5,17 ^{b,**}	0,44	4,99 ^{b,***}	0,42	<0,001

<i>M.salivarium</i>	1,72 ^A	0,00	4,50 ^{a,*}	0,47	5,10 ^{a,**}	0,30	5,17 ^{a,**}	0,92	5,38 ^B	0,00	4,45 ^{b,*}	0,28	4,85 ^{b,**}	0,05	4,58 ^{b,*}	0,26	<0,001
<i>P. anaerobius</i>	1,73 ^A	0,00	4,14 ^{a,*}	0,34	5,17 ^{a,**}	0,30	5,98 ^{a,***}	1,48	5,29 ^B	0,00	4,10 ^{b,*}	0,23	5,29 ^B	0,84	5,19 ^{b,**}	1,10	<0,001
<i>P. endodontalis</i>	0,00 ^A	0,00	4,21 ^A	0,48	5,05 ^a	0,42	5,74 ^a	1,20	5,63 ^B	0,00	4,25 ^b	0,26	5,59 ^B	1,34	5,25 ^B	2,09	<0,001
<i>P. melaninogenica</i>	0,00 ^A	0,00	5,21 ^{a,*}	0,66	6,25 ^{a,**}	0,45	6,64 ^{a,**}	0,27	4,37 ^B	0,00	5,04 ^{b,*}	0,73	6,48 ^{b,**}	0,77	6,43 ^{b,**}	1,21	<0,001
<i>P. aeruginosa</i>	1,56 ^A	0,00	4,05 ^{a,*}	0,20	4,95 ^{a,**}	0,42	5,05 ^{a,***}	0,82	5,35 ^B	0,00	3,90 ^{b,*}	0,06	4,66 ^B	0,15	4,41 ^{b,**}	0,37	<0,001
<i>P. putida</i>	1,88 ^A	0,00	4,37 ^{A,*}	0,38	4,93 ^{a,*}	0,62	5,73 ^{a,*}	1,31	5,75 ^B	0,00	3,91 ^{b,*}	0,47	4,65 ^{B,*}	0,20	4,68 ^{B,*}	0,43	<0,001
<i>S. moorei</i>	2,12 ^A	0,00	4,25 ^{A,*}	0,32	5,25 ^{a,*}	0,70	5,48 ^{a,*}	0,75	4,97 ^B	0,00	4,07 ^B	0,25	5,32 ^B	0,83	4,62 ^B	0,23	<0,001
<i>S. aureus</i>	2,19 ^A	0,00	4,68 ^{A,*}	0,68	5,23 ^{a,*}	0,58	6,11 ^{a,*}	0,98	5,86 ^B	0,00	4,34 ^{b,*}	0,33	5,32 ^{B,*}	0,74	5,62 ^{B,*}	0,68	<0,001
<i>S. mutans</i>	2,74 ^A	0,00	4,55 ^{A,*}	0,45	4,97 ^{A,*}	0,60	6,91 ^{a,*}	0,55	5,53 ^B	0,00	4,59 ^B	0,22	4,51 ^B	0,12	6,74 ^B	0,67	<0,001
<i>S. salivarius</i>	2,42 ^A	0,00	4,82 ^{A,*}	0,58	5,97 ^{a,*}	0,35	6,19 ^{a,*}	1,26	6,61 ^B	0,00	4,36 ^{b,*}	0,18	5,77 ^{B,*}	1,18	7,05 ^B	0,95	<0,001
<i>S. sobrinus</i>	2,17 ^A	0,00	4,66 ^{a,*}	1,17	5,04 ^{a,**}	0,38	6,06 ^{a,***}	1,60	5,66 ^B	0,00	4,35 ^{b,*}	0,34	4,87 ^{b,**}	0,28	4,89 ^{b,**}	0,76	<0,001
<i>S. parasanguinis</i>	2,45 ^A	0,00	4,59 ^{a,*}	0,52	4,94 ^{a,**}	0,08	5,37 ^{a,***}	1,44	5,41 ^B	0,00	4,50 ^{b,*}	1,15	4,73 ^{b,**}	0,26	4,96 ^{b,***}	0,41	<0,001
<i>S. pasteurii</i>	1,93 ^A	0,00	4,81 ^{A,*}	0,60	4,90 ^{a,*}	0,16	5,43 ^{a,*}	1,26	5,24 ^B	0,00	4,44 ^B	0,70	4,52 ^B	0,13	4,49 ^B	0,37	<0,001
Fungos																	
<i>C. albicans</i>	2,02 ^A	0,00	5,32 ^a	1,05	5,58 ^{a,*}	0,36	4,89 ^{a,**}	0,98	6,79 ^B	0,00	5,14 ^b	0,63	5,33 ^b	0,32	4,95 ^b	0,37	<0,001
<i>C. dubliniensis</i>	1,57 ^A	0,00	5,45 ^{a,*}	0,76	5,66 ^{a,*}	0,55	4,92 ^{a,**}	0,46	5,95 ^B	0,00	5,32 ^{b,*}	0,79	5,39 ^{B,*}	0,41	5,07 ^{b,*}	0,39	<0,001
<i>C. tropicalis</i>	2,19 ^A	0,00	6,02 ^{a,*}	0,38	6,62 ^{a,**}	0,36	5,60 ^{a,***}	0,39	4,88 ^B	0,00	5,63 ^{b,*}	0,47	6,22 ^{b,**}	0,12	6,00 ^{b,**}	0,10	<0,001

Letras iguais (maiúsculas e minúsculas) e diferentes símbolos sobrescritos na mesma linha expressam diferenças significativas intragrupo, detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover* corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

Tabela 14 – Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das 37 espécies-alvo detectadas no biofilme subgingival dos dentes contralaterais aos implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio.

Grupos/Espécies	Controle Zircônia (Subgingival)								Controle Titânio (Subgingival)								p
	T0		T1		T2		T3		T0		T1		T2		T3		
	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	Q2	IIQ	
Complexo Vermelho																	
<i>P. gingivalis</i>	1,73 ^A	0,00	4,63 ^A	0,58	4,59 ^A	0,19	4,70 ^A	0,33	2,86 ^{B,*}	0,00	4,20 ^{B,*}	2,19	4,53 ^{B,*}	0,91	5,41 ^{b,*}	1,36	<0,001
<i>T. forsythia</i>	0,00 ^A	0,00	4,95 ^a	1,20	4,75 ^a	0,63	5,09 ^a	0,43	2,72 ^B	0,00	4,92 ^B	1,24	4,94 ^B	0,98	4,89 ^B	0,60	<0,001
<i>T. denticola</i>	2,15 ^A	0,00	4,79 ^a	0,84	4,70 ^a	0,14	4,84 ^a	0,30	2,53 ^B	0,00	4,41 ^{B,*}	0,41	4,59 ^{b,*}	0,68	4,78 ^b	0,29	<0,001
Complexo Laranja																	
<i>C. rectus</i>	0,00 ^A	0,00	5,14 ^a	0,49	4,98 ^a	0,12	5,08 ^a	0,22	2,17 ^B	0,00	5,07 ^b	0,69	5,17 ^b	0,44	5,22 ^b	1,02	<0,001
<i>F. nucleatum</i>	0,00 ^A	0,00	5,59 ^a	0,76	5,87 ^a	1,10	6,15 ^a	1,41	2,73 ^B	0,00	5,69 ^b	0,84	5,98 ^b	1,32	6,25 ^b	0,88	<0,001
<i>P. intermedia</i>	0,00 ^A	0,00	4,69 ^a	0,44	4,71 ^a	0,97	4,80 ^a	0,61	2,97 ^B	0,00	4,33 ^B	0,77	4,85 ^{B,*}	0,98	5,51 ^{b,*}	0,82	<0,001
<i>P. micra</i>	0,00 ^A	0,00	4,48 ^A	0,32	4,54 ^A	0,12	4,64 ^A	0,30	1,70 ^B	0,00	4,13 ^B	0,20	4,33 ^B	0,05	4,46 ^B	0,11	<0,001
<i>P. nigrescens</i>	0,00 ^A	0,00	4,42 ^A	0,31	4,54 ^A	0,13	4,57 ^A	0,16	0,00 ^B	0,00	4,06 ^B	0,14	4,28 ^B	0,26	4,59 ^B	0,25	<0,001
Complexo Amarelo																	
<i>S. mitis</i>	0,00 ^A	0,00	4,46 ^{a,*}	0,35	4,78 ^{a,**}	0,29	4,74 ^{a,**}	0,45	2,69 ^B	0,00	4,26 ^{b,*}	0,29	4,42 ^{b,**}	0,69	4,51 ^{b,**}	0,16	<0,001
<i>S. oralis</i>	0,00 ^A	0,00	4,60 ^a	0,58	4,56 ^a	0,14	4,57 ^a	0,13	2,11 ^B	0,00	4,29 ^{b,*}	0,18	4,41 ^{b,**}	0,05	4,75 ^{b,***}	0,49	<0,001
<i>S. sanguinis</i>	0,00 ^A	0,00	4,55 ^A	0,35	4,67 ^A	0,24	4,75 ^A	0,25	2,66 ^B	0,00	4,37 ^B	0,16	4,62 ^B	0,64	4,67 ^B	0,44	<0,001
<i>S gordonii</i>	0,00 ^A	0,00	4,43 ^A	0,34	4,49 ^A	0,17	4,59 ^A	0,21	2,64 ^B	0,00	4,14 ^B	0,10	4,38 ^B	0,14	4,47 ^B	0,09	<0,001
Complexo Verde																	
<i>Aa. a</i>	0,00 ^A	0,00	5,97 ^A	0,35	5,93 ^A	0,27	5,58 ^A	0,51	2,88 ^B	0,00	5,83 ^B	0,43	5,66 ^B	0,78	5,67 ^B	0,54	<0,001
<i>C. gingivalis</i>	0,00 ^A	0,00	4,95 ^a	0,41	4,91 ^a	0,19	5,17 ^a	0,33	2,19 ^B	0,00	4,98 ^b	0,33	4,89 ^b	0,32	5,17 ^b	0,50	<0,001
<i>E. corrodens</i>	0,00 ^A	0,00	4,59 ^{A,*}	0,23	4,58 ^{A,*}	0,05	4,78 ^{a,*}	0,06	1,70 ^B	0,00	4,49 ^B	0,17	4,51 ^B	0,04	4,63 ^B	0,07	<0,001
Complexo Roxo																	
<i>V. parvula</i>	0,00 ^A	0,00	4,65 ^{a,*}	0,33	4,74 ^{a,*}	0,28	4,86 ^{a,**}	0,24	2,96 ^B	0,00	4,63 ^{b,*}	0,64	4,85 ^{b,**}	1,80	4,86 ^{b,*}	0,29	<0,001
Outras Espécies																	
<i>B. fragilis</i>	0,00 ^A	0,00	5,46 ^{a,*}	0,36	5,12 ^{a,**}	0,15	5,47 ^{a,*}	0,27	1,97 ^B	0,00	5,12 ^b	0,48	5,07 ^b	0,57	5,38 ^b	0,58	<0,001
<i>E.coli</i>	0,00 ^A	0,00	4,62 ^{A,*}	0,25	4,67 ^{A,*}	0,09	4,94 ^{a,*}	0,24	0,00 ^B	0,00	4,52 ^B	0,13	4,55 ^B	0,08	4,72 ^B	0,14	<0,001
<i>E. faecalis</i>	0,00 ^A	0,00	5,06 ^a	0,58	5,01 ^a	0,23	5,17 ^a	0,14	0,00 ^B	0,00	4,74 ^{b,*}	0,39	5,01 ^{b,**}	0,54	5,15 ^{b,**}	0,23	<0,001
<i>K. pneumoniae</i>	0,00 ^A	0,00	4,91 ^a	0,35	4,96 ^a	0,40	4,91 ^a	0,08	0,00 ^B	0,00	4,74 ^b	0,40	4,78 ^b	0,49	4,82 ^b	0,21	<0,001
<i>L. Casei</i>	0,00 ^A	0,00	4,74 ^{a,*}	0,39	4,74 ^{a,**}	0,04	4,95 ^{a,***}	0,25	1,93 ^B	0,00	4,53 ^{b,*}	0,38	4,61 ^{b,*}	0,14	4,78 ^{b,**}	0,16	<0,001

<i>M.salivarium</i>	0,00 ^A	0,00	4,79 ^a	0,32	4,78 ^a	0,07	4,80 ^a	0,10	1,89 ^B	0,00	4,49 ^{b,*}	0,33	4,50 ^{b,*}	0,04	4,70 ^{b,**}	0,21	<0,001
<i>P. anaerobius</i>	0,00 ^A	0,00	4,45 ^a	0,34	4,61 ^a	0,35	4,65 ^a	0,18	2,25 ^B	0,00	4,18 ^{b,*}	0,34	4,44 ^{b,**}	0,91	4,63 ^{b,**}	0,15	<0,001
<i>P. endodontalis</i>	0,00 ^A	0,00	4,54 ^a	1,30	4,85 ^a	0,82	4,79 ^a	0,41	1,83 ^B	0,00	4,35 ^{B,*}	0,50	4,64 ^{B,*}	0,97	4,98 ^{b,*}	0,36	<0,001
<i>P. melaninogenica</i>	0,00 ^A	0,00	4,94 ^a	0,37	5,10 ^a	0,42	5,01 ^a	1,23	0,00 ^B	0,00	4,67 ^{b,*}	0,24	4,78 ^{b,**}	1,38	4,94 ^{b,**}	0,30	<0,001
<i>P. aeruginosa</i>	0,00 ^A	0,00	4,49 ^a	0,27	4,50 ^a	0,13	4,70 ^a	0,08	1,72 ^B	0,00	4,17 ^{b,*}	0,17	4,34 ^{b,**}	0,08	4,52 ^{b,**}	0,10	<0,001
<i>P. putida</i>	0,00 ^A	0,00	4,42 ^A	0,35	4,50 ^A	0,07	4,62 ^A	0,23	1,86 ^B	0,00	4,11 ^B	0,06	4,38 ^B	0,24	4,47 ^B	0,21	<0,001
<i>S. moorei</i>	0,00 ^A	0,00	4,35 ^A	0,30	4,53 ^A	0,09	4,68 ^A	0,23	1,89 ^B	0,00	4,14 ^B	0,08	4,40 ^B	0,02	4,46 ^B	0,08	<0,001
<i>S. aureus</i>	0,00 ^A	0,00	4,51 ^A	0,40	4,58 ^A	0,20	4,76 ^A	0,26	0,00 ^B	0,00	4,32 ^B	0,18	4,50 ^B	0,65	4,47 ^B	0,17	<0,001
<i>S. mutans</i>	0,00 ^A	0,00	4,49 ^{A,*}	0,36	4,61 ^{A,*}	0,12	4,86 ^{a,*}	0,29	2,26 ^B	0,00	4,25 ^B	0,16	4,45 ^B	0,62	4,42 ^B	0,03	<0,001
<i>S. salivarius</i>	0,00 ^A	0,00	4,40 ^A	0,26	4,60 ^A	0,15	4,69 ^A	0,28	2,47 ^B	0,00	4,34 ^B	0,31	4,54 ^B	0,81	4,59 ^B	0,13	<0,001
<i>S. sobrinus</i>	0,00 ^A	0,00	4,76 ^a	0,54	4,66 ^{a,*}	0,10	4,79 ^{a,**}	0,28	0,00 ^B	0,00	4,40 ^b	0,26	4,55 ^b	0,03	4,64 ^b	0,11	<0,001
<i>S. parasanguinis</i>	0,00 ^A	0,00	4,47 ^{a,*}	0,46	4,51 ^{a,*}	0,12	4,62 ^{a,**}	0,09	1,78 ^B	0,00	4,21 ^{b,*}	0,16	4,41 ^{b,*}	0,03	4,51 ^{b,*}	0,06	<0,001
<i>S. pasteurii</i>	0,00 ^A	0,00	4,48 ^A	0,43	4,51 ^A	0,09	4,60 ^A	0,07	0,00 ^B	0,00	4,16 ^B	0,16	4,43 ^B	0,04	4,50 ^B	0,05	<0,001
Fungos																	
<i>C. albicans</i>	0,00 ^A	0,00	5,11 ^a	0,50	0,48 ^a	0,02	4,88 ^a	0,06	0,00 ^B	0,00	4,82 ^b	0,23	4,74 ^b	0,07	4,81 ^b	0,08	<0,001
<i>C. dubliniensis</i>	0,00 ^A	0,00	5,19 ^{a,*}	0,55	4,80 ^{a,*}	0,02	4,84 ^{a,**}	0,04	0,00 ^B	0,00	5,00 ^{b,*}	0,32	4,78 ^{b,*}	0,05	4,78 ^{b,**}	0,10	<0,001
<i>C. tropicalis</i>	0,00 ^A	0,00	6,17 ^{a,*}	0,61	5,80 ^{a,**}	0,17	5,37 ^{a,**}	0,34	0,00 ^B	0,00	5,88 ^b	0,43	5,60 ^b	0,48	5,36 ^b	0,50	<0,001

Letras iguais (maiúsculas e minúsculas) e diferentes símbolos sobrescritos na mesma linha expressam diferenças significativas intragrupo, detectadas pelo teste de múltiplas comparações de *Friedman-Conover* corrigido por *Benjamini-Hockberg* (FDR).

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo clínico longitudinal determinou a composição microbiana de amostras de biofilmes supra e subgengival associados a restaurações unitárias de implantes com conectores protéticos de zircônia ou titânio, ao longo de 3 anos de função, utilizando a metodologia *DNA-DNA Checkerboard*. O perfil microbiano e a quantificação das espécies colonizando os sítios peri-implantares e dentes contralaterais foram descritos em detalhes. Os indicadores clínicos profundidade e sangramento à sondagem, recessão gengival e reabsorção óssea marginal também foram investigados para avaliar o impacto da colonização microbiana na saúde dos tecidos peri-implantares de suporte ao longo do tempo. A hipótese nula testada neste estudo foi rejeitada, uma vez que, diferenças significantes foram encontradas na quantificação do genoma microbiano ao longo dos 36 meses de acompanhamento. Em relação aos dados microbiológicos, o perfil microbiano detectado nos implantes restaurados com conectores de zircônia, titânio e seus respectivos dentes contralaterais foi semelhante, a partir de 12 meses de investigação. Uma menor diversidade microbiana e uma menor quantidade de micro-organismos foram reportadas no *baseline*, para os dois materiais investigados. Com o passar do tempo, a diversidade microbiana aumentou significativamente, com todas as espécies-alvo sendo detectadas nos biofilmes supragengival e subgengival coletados dos diferentes substratos, com aumento da quantificação do genoma para a maioria das espécies investigadas. *A. actinomycetemcomitans* sorotipo “a”, *F. nucleatum* e *C. tropicalis* foram as espécies mais prevalentes nas amostras subgengivais relacionadas aos conectores de zircônia, titânio e dentes contralaterais. *S. sanguinis* foi a espécie mais prevalente no sítio supragengival dos conectores de titânio e respectivo dente contralateral, e o *A. actinomycetemcomitans* sorotipo “a” foi mais prevalente nos sítios com conector zircônia e dentes contralaterais. Os achados deste estudo são de relevância clínica, uma vez que espécies patogênicas e não-patogênicas foram detectadas colonizando os diversos sítios experimentais; além de que algumas espécies microbianas sugerem uma colonização seletiva para um determinado tipo de conector. No entanto, a microbiota identificada neste estudo parece não ter influenciado no desenvolvimento de doença peri-implantar durante os 36 meses de investigação, uma vez que os resultados clínicos e radiográficos foram compatíveis com condições de saúde, visto que, as mudanças ocorridas na profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival são clinicamente aceitáveis. A perda óssea peri-implantar foi semelhante para ambos substratos investigados e os valores de reabsorção óssea marginal obtidos estão dentro dos limites esperados, como resultado da remodelação óssea. Nenhuma complicação técnica ou biológica foi identificada

após o período de investigação do estudo, resultando em uma taxa de sucesso de 100% para os implantes em ambos os grupos.

Revisões sistemáticas e o consenso da Associação Europeia de Osseointegração mostraram que não há evidência de melhor desempenho dos conectores de zircônia na manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares, em comparação com conectores de titânio (LINKEVICIUS; APSE, 2008; NAKAMURA et al., 2010; LINKEVICIUS; VAITELIS, 2015; SICILIA et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, uma vez que, os dados dos indicadores clínicos investigados foram compatíveis com condições de saúde dos tecidos de suporte peri-implantares e não houve diferença significativa entre os grupos após 12 meses de acompanhamento. A estabilidade da crista óssea marginal e a manutenção da saúde dos tecidos moles são necessários para o sucesso a longo prazo das restaurações suportadas por implantes (NAKAMURA et al., 2010). Para o monitoramento dos tecidos moles peri-implantares, a profundidade e o sangramento à sondagem são utilizados com parâmetros clínicos objetivos na investigação da saúde ou doença peri-implantar (JEPSEN et al., 2015; ATSUTA et al., 2016). Estudos clínicos avaliaram a profundidade de sondagem em sítios relacionadas a implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio por 1 ano (SAILER; ZEMBIC; et al., 2009; CARRILLO DE ALBORNOZ et al., 2014), 3 anos (ZEMBIC et al., 2009) e 5 anos de acompanhamento (LOPS et al., 2013; ZEMBIC et al., 2013), e nenhum deles mostrou diferença significativa entre os conectores de zircônia e titânio ao longo do tempo. Neste estudo, a profundidade de sondagem reduziu nos implantes com conectores de zircônia após 12 meses, enquanto nos implantes com conectores de titânio aumentou no mesmo período. Investigações de curto prazo mostraram comportamento semelhante nos sítos relacionados a zircônia e titânio, em acompanhamento de 1 mês (RAFFAINI et al., 2018), 3 meses (VAN BRAKEL et al., 2011) e 6 meses (NASCIMENTO et al., 2016). Estudos *in vitro* têm mostrado que a topografia de superfície é um fator importante para adesão e proliferação de fibroblastos gengivais humanos e células epiteliais (PAE et al., 2009; NOTHDURFT et al., 2015). Nothdurft e colaboradores (2015) demonstraram que superfícies polidas de zircônia proporcionam melhor adesão de células epiteliais em comparação com superfícies de titânio (NOTHDURFT et al., 2015). Dessa forma, uma melhor aderência das células dos tecidos moles peri-implantares aos conectores protéticos pode reduzir a profundidade de sondagem em torno dos implantes, no entanto, esta hipótese não foi testada neste estudo.

O sangramento à sondagem com força suave ($<0,25$ N) indica a presença de inflamação na mucosa peri-implantar, denominado de mucosite (SALVI; LANG, 2004; LINDHE; MEYLE; GROUP, 2008; LANG; BERGLUNDH; WORKING GROUP 4 OF

SEVENTH EUROPEAN WORKSHOP ON, 2011). De acordo com o consenso do sexto Workshop Europeu de Periodontologia, 80% dos indivíduos reabilitados com implantes e 50% dos sítios peri-implantares investigados apresentavam mucosite após função mastigatória (LINDHE; MEYLE; GROUP, 2008). Neste presente estudo, foi observado aumento do sangramento à sondagem após 12 meses de acompanhamento, para ambos os substratos investigados. No entanto, não foi encontrada relação entre o sangramento à sondagem e presença de sulcos profundos. Uma possível explicação pode ter sido o fato de que, nesta investigação, as próteses unitárias foram cimentadas sobre os conectores protéticos de zircônia ou titânio. Weber e colaboradores (2006), em estudo *in vivo*, mostraram maior índice de placa e maior sangramento à sondagem em torno de próteses cimentadas sobre implante em comparação com próteses retidas por parafuso. O acúmulo de biofilme é influenciado pela localização da linha de cimentação e solubilidade do cimento, assim, a presença do biofilme leva a maior resposta inflamatória dos tecidos moles peri-implantares, sendo clinicamente identificado pela presença do sangramento do sulco gengival (WEBER et al., 2006). Korsch e colaboradores, mostraram que o excesso de cimento é um importante preditor para o sangramento, supuração a sondagem e perda de inserção dos tecidos moles peri-implantares. Além disso, implantes com maiores diâmetros estão associados à presença de excesso de cimento (KORSCH; ROBRA; WALTHER, 2015).

As maiores porcentagens de sangramento à sondagem nos sítios restaurados com zircônia (35,7%, T1=12 meses) e com titânio (42,9%, T2=24 meses) foram inferiores a prevalência relatada no consenso do sexto Workshop Europeu de Periodontologia (LINDHE; MEYLE; GROUP, 2008). Investigações de curto e longo prazo avaliaram o sangramento à sondagem em sítios restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio por 1 mês (RAFFAINI et al., 2018), 3 meses (VAN BRAKEL et al., 2011), 6 meses (NASCIMENTO et al., 2016), 1 ano (SAILER; ZEMBIC; et al., 2009; HOSSEINI et al., 2011), 2 anos (PAYER et al., 2015), 3 anos (ZEMBIC et al., 2009; HOSSEINI et al., 2013) e 5 anos de acompanhamento (LOPS et al., 2013; ZEMBIC et al., 2013). Nenhum desses estudos mostraram diferenças significantes entre os conectores de zircônia e titânio ao longo do tempo investigado. Neste estudo, não houve diferença nos valores de sangramento à sondagem nos sítios com conectores de zircônia ou titânio e os respectivos dentes contralaterais. A negligência na higiene oral pode estar associada ao aumento do sangramento à sondagem nos sítios experimentais e controle ao longo do tempo. Porém, o índice de placa não foi investigado neste estudo.

Alterações na posição da margem do tecido mole peri-implantar foram investigadas em estudos clínicos (BENGAZI; WENNSTROM; LEKHOLM, 1996; SMALL; TARNOW,

2000; CHANG; WENNSTROM, 2010), que mostraram presença de recessões gengivais ($< 1\text{mm}$) nos primeiros seis meses de instalação da prótese. A mucosa peri-implantar de espessura fina, pouco queratinizada, assim como o mal posicionamento dos implantes e a remodelação fisiológica da crista óssea em sistemas de implantes de duas peças, são relatados na literatura como fatores de risco para recessões da mucosa peri-implantar (FICKL, 2015). Resultados conflitantes são encontrados na literatura referente a recessão gengival em sítios relacionados com conectores cerâmicos e conectores metálicos. Sailer e colaboradores (2009), em revisão sistemática, mostraram maior incidência de recessão dos tecidos moles relacionados a conectores de cerâmica (SAILER; PHILIPP; et al., 2009). Em outra revisão sistemática foi observado maior incidência de recessão gengival em sítios com conectores metálicos (ZEMBIC et al., 2014). Bidra e Rungruanganunt (2013), por meio de revisão sistemática, avaliaram o desempenho clínico dos conectores cerâmicos e de titânio na região anterior e observaram maior incidência de recessão gengival em estudos que utilizaram conectores de titânio pré-fabricados, pois fornecem menor suporte aos tecidos gengivais em comparação com conectores personalizados. Estas informações podem justificar a recessão observada para os dois tipos de conectores em nosso estudo, uma vez que foram utilizados conectores pré-fabricados de titânio e zircônia. A recessão gengival aumentou ao longo do tempo para ambos os substratos investigados. Entretanto, não foi observado diferença significativa nos valores de recessão gengival entre os sítios com conectores de zircônia, titânio e respectivos dentes contralaterais. Resultados semelhantes foram observados em estudos clínicos que avaliaram a recessão gengival em sítios relacionadas a implantes restaurados com conectores de zircônia e titânio (CARRILLO DE ALBORNOZ et al., 2014; LOPS et al., 2015), para os quais nenhuma diferença clínica foi relatada.

A perda óssea marginal peri-implantar é influenciada por diversos fatores, incluindo a técnica cirúrgica utilizada (MAZZOCCO et al., 2017), posicionamento do implante (CANEVA et al., 2010), espessura dos tecidos peri-implantares (BERGLUNDH; LINDHE, 1996), presença de micro espaços na interface implante/conector protético com consequente contaminação microbiana (DO NASCIMENTO; MIANI; et al., 2012; MISHRA; CHOWDHARY; KUMARI, 2017), tipo de conexão implante/conector e biomecânica envolvida (FIRME et al., 2014; PESSOA et al., 2017), além do tipo de retenção da prótese sobre o implante (DE BRANDAO; VETTORE; VIDIGAL JUNIOR, 2013; LEMOS et al., 2016; ALQUTAIBI, 2017). Lemos e colaboradores (2016), em revisão sistemática e meta-análise, concluíram que restaurações cimentadas sobre implantes mostraram menor perda óssea marginal quando comparadas a restaurações parafusadas sobre implante, porém a pequena

diferença entre os valores de reabsorção obtidos pode não mostrar significância clínica (LEMOS et al., 2016). No presente estudo, radiografias periapicais foram utilizadas para monitorar a reabsorção óssea marginal ao longo dos tempos investigados. Apesar das limitações que envolvem a padronização da técnica, de acordo com o consenso do sétimo Workshop Europeu de Periodontologia (LANG; BERGLUNDH; WORKING GROUP 4 OF SEVENTH EUROPEAN WORKSHOP ON, 2011) e da Academia Americana de Periodontologia (AAP, 2013), radiografias periapicais são necessárias para avaliar, em longo prazo, os níveis de suporte ósseo ao redor dos implantes. Estas devem ser rotineiramente obtidas após a instalação da prótese sobre implante, a fim de estabelecer o nível de suporte ósseo inicial, a partir do qual todas as radiografias futuras devem ser comparadas para obtenção do diagnóstico da peri-implantite (BORNSTEIN; HORNER; JACOBS, 2017). Recomenda-se a utilização da técnica do paralelismo, a fim de minimizar distorções na imagem e possibilitar a avaliação da crista óssea ao longo do tempo (SANZ; CHAPPLE; WORKING GROUP 4 OF THE, 2012). A utilização da tomografia computadorizada de feixe cônico pode ser considerada dependendo da localização da perda óssea (AAP, 2013), mas envolvem custos elevados e aspectos éticos quando demandados em grande frequência em pesquisas científicas.

A estabilidade dos tecidos duros é um dos critérios tradicionalmente utilizados para avaliar o sucesso clínico dos implantes dentários em longo prazo (PAPASPYRIDAKOS et al., 2012). Os implantes são considerados bem-sucedidos se a perda óssea peri-implantar radiográfica for menor que 1,5 mm durante o primeiro ano após a instalação do implante, e menor que 0,2 mm nos anos subsequentes (ALBREKTSSON et al., 1986). Neste estudo, os sítios restaurados com conectores de zircônia e titânio apresentaram valores similares de reabsorção óssea marginal. Para ambos substratos investigados, a perda óssea marginal foi inferior a 1 mm após 36 meses de acompanhamento. Saleh e colaboradores (2018), em revisão sistemática, mostraram que aproximadamente 1 mm de perda óssea é esperado após a instalação do implante, como resultado da remodelação óssea. (SALEH et al., 2018). Assim, os valores de reabsorção óssea marginal obtidos neste estudo são compatíveis com saúde peri-implantar. O sistema de conexão dos implantes usados nesta investigação foi do tipo cone Morse, o que pode justificar os valores de reabsorção observados. Pessoa e colaboradores (2017), por meio de ensaio clínico randomizado, mostraram que a perda óssea peri-implantar depende do tipo de conexão do implante. Conexões cone Morse apresentaram menor perda óssea peri-implantar, em comparação com as conexões hexagonais externas (PESSOA et al., 2017). Schmitt e colaboradores (2014), em revisão sistemática, também demonstraram que os sistemas de conexão cônica parecem produzir uma menor perda óssea marginal. Estudos clínicos relataram

alterações no nível ósseo marginal interproximal em sítios relacionados a implantes restaurados com conectores protéticos de zircônia e titânio por 1 mês (RAFFAINI et al., 2018), 6 meses (NASCIMENTO et al., 2016), 1 ano (HOSSEINI et al., 2011; CARRILLO DE ALBORNOZ et al., 2014), 2 anos (PAYER et al., 2015), 3 anos (ZEMBIC et al., 2009; HOSSEINI et al., 2013) e 5 anos de acompanhamento (LOPS et al., 2013; ZEMBIC et al., 2013). A média de perda óssea marginal variou de 0,07 mm a 1,48 mm nos sítios com conectores de zircônia e 0,08 mm a 1,43 mm nos sítios com conectores de titânio. Nenhum desses estudos mostraram diferenças significantes entre os conectores de zircônia e titânio ao longo do tempo.

A literatura mostra que a colonização bacteriana atua como um importante fator responsável pela perda do implante após a osseointegração (PYE et al., 2009). A microbiota associada à implantes dentários é influenciada pelo ambiente peri-implantar e pela superfície do implante/conector protético, uma vez que características físicas e químicas dos materiais determinam o perfil de colonização em torno dessas superfícies. (TEUGHELIS et al., 2006; SUBRAMANI et al., 2009; DE AVILA et al., 2014). Neste estudo, o perfil microbiano detectado nos implantes restaurados com zircônia, titânio e respectivos dentes contralaterais foi semelhante, a partir de 12 meses de investigação. O presente resultado confirma as evidências de que a colonização de implantes dentários e superestruturas associadas compartilham semelhanças com o biofilme em torno de dentes remanescentes (LARSEN; FIEHN, 2017). A quantificação de genomas totais nos diferentes sítios e substratos investigados foi significativamente menor no tempo T0 (*baseline*), em relação aos demais tempos investigados. Esses achados eram esperados, uma vez que a coleta do biofilme foi realizada imediatamente após a instalação da prótese. Além disso, baixa quantidade de micro-organismos ($<10^4$ células microbianas) no biofilme coletado pode não ser detectada pelo método de hibridização DNA-DNA *Chekerboard*. A dificuldade de amostragem microbiológica em torno dos implantes dentários e a presença de sulcos peri-implantares mais rasos nesta fase do estudo também pode ter contribuído para menor detecção no *baseline*. O número total de micro-organismos aumentou ao longo do tempo para os dois grupos, possivelmente devido à presença de carga funcional e maior diversidade microbiana do biofilme, por meio da co-agregação de colonizadores tardios aos receptores das bactérias já aderidas (DO; DEVINE; MARSH, 2013; LARSEN; FIEHN, 2017; MARSH; ZAURA, 2017).

Neste estudo foram utilizados sistemas de implantes de duas peças, os quais inevitavelmente apresentam micro espaços entre o implante e conector protético (TEIXEIRA et al., 2011; PASSOS et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015). Estudos *in vitro* (DO NASCIMENTO; MIANI; et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2015) têm demonstrado que a

infiltração microbiana através da interface implante/conector é aumentada pela carga mecânica e ocorre independentemente do tipo de conexão (PASSOS et al., 2013). O sistema de conexão utilizado no presente estudo, cone Morse, parece ser mais eficiente quanto aos aspectos biológicos, permitindo menor penetração bacteriana e perda óssea em implantes unitários (SCHMITT et al., 2014; GOIATO et al., 2015). Neste estudo, os substratos investigados influenciaram na quantidade total de micro-organismos aderidos às superfícies, uma vez que os conectores de zircônia apresentaram maior quantificação de genoma total subgengival quando comparadas aos conectores de titânio. Esse resultado parece estar associado a maior propensão dos conectores de zircônia a micro infiltração do que conectores de titânio, conforme evidenciado em revisão sistemática (MISHRA; CHOWDHARY; KUMARI, 2017).

Na tentativa de compreender a relação entre espécies bacterianas presentes no biofilme oral e seu impacto na saúde dos tecidos de suporte, Socransky e colaboradores (1998), agruparam os micro-organismos em 05 diferentes complexos (vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo) microbianos associados com os parâmetros clínicos da doença periodontal. No presente estudo, as espécies patogênicas relacionadas à etiologia da peri-implantite foram agrupadas com base nesta descrição de Socransky e colaboradores (1998). Adicionalmente, micro-organismos colonizadores iniciais e pouco associados à doença periodontal foram reunidos no grupo “outras espécies”, e três espécies de *Candida* foram reunidas no grupo “fungos”. Maiores variações na porcentagem dos grupos microbianos foram observadas no *baseline*, caracterizado pela adesão inicial de micro-organismos provavelmente oriundos dos dentes remanescentes, com ausência de um perfil microbiano bem estabelecido (RAFFAINI et al., 2018). Nos demais tempos investigados, as porcentagens dos genomas dos grupos microbianos nas amostras de biofilme supragengival e subgengival relacionados aos sítios com conectores de zircônia, titânio e dentes contralaterais foram semelhantes. No *baseline* foram detectadas maiores porcentagens de micro-organismos do complexo vermelho nos sítios subgengivais do que nos sítios supragengivais e, nos outros tempos investigados, ambos os sítios experimentais apresentaram redução da porcentagem do complexo vermelho. Não foi detectada espécies do complexo laranja nos sítios subgengivais relacionados aos implantes no *baseline*, seguido de aumento nos sítios subgengivais (14%) e supragengivais (13%), a partir de 12 meses de acompanhamento. Os micro-organismos do complexo vermelho raramente são encontrados na ausência do complexo laranja, pois estes tendem a anteceder a colonização por espécies do complexo vermelho. Adicionalmente, as espécies do complexo vermelho e laranja presentes no biofilme supra e subgengival relacionam-se com maior profundidade e o sangramento à sondagem. (SOCRANSKY et al., 1998; HAFFAJEE et al., 2008). Neste estudo,

a presença de três espécies de *Candida* nos conectores protéticos de zircônia e titânio foram investigadas. O método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* é sensível e apropriado para detecção e quantificação de espécies de *Candida* presente na cavidade oral (DO NASCIMENTO; FERREIRA DE ALBUQUERQUE JUNIOR; et al., 2009). Dentre as espécies de fungos, a *C. tropicalis* foi mais prevalente em todos os substratos investigados e dentes contralaterais.

A literatura atualmente disponível sobre a composição microbiana ao redor de implantes saudáveis e com peri-implantite mostram resultados controversos (LAFABRIE et al., 2017). Diferentes métodos de diagnóstico microbiológico (PADIAL-MOLINA et al., 2016) e de delineamento experimental utilizados nas investigações parecem influenciar nos resultados relacionados ao perfil microbiano peri-implantar (PEREZ-CHAPARRO et al., 2016; LAFABRIE et al., 2017). Investigações de perfis microbiológicos de biofilmes peri-implantares em sítios saudáveis e doentes no mesmo indivíduo diferem de estudos com delineamento paralelo (PEREZ-CHAPARRO et al., 2016), uma vez que, em locais saudáveis e doentes na mesma boca podem abrigar perfis microbianos semelhantes (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Revisões sistemáticas recentes investigaram a composição microbiana em sítios com implantes saudáveis, peri-implantite e doença periodontal (PEREZ-CHAPARRO et al., 2016; RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016; LAFABRIE et al., 2017). Os resultados indicam que implantes saudáveis e com peri-implantite são colonizados por micro-organismos periodontopatogênicos (LAFABRIE et al., 2017); A peri-implantite representa uma infecção heterogênea de maior complexidade (RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016) e é composta por espécies Gram-negativas predominantemente não cultiváveis quando comparadas aos sítios com periodontite (LAFABRIE et al., 2017); há evidências moderadas da associação de espécies do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) com a etiologia da peri-implantite e algumas evidências da associação de espécies do complexo laranja: *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* (PEREZ-CHAPARRO et al., 2016) e *Prevotella nigrescens* com a doença peri-implantar (LAFABRIE et al., 2017). Além disso, a peri-implantite é caracterizada pela colonização de bacilos Gram-positivos anaeróbios assacarolíticos não cultiváveis e bacilos Gram-negativos anaeróbios não cultiváveis (LAFABRIE et al., 2017). Neste estudo, não houve predileção de espécies do complexo vermelho e complexo laranja por algum dos substratos investigados.

Os resultados obtidos neste trabalho têm como relevância clínica a identificação e quantificação de grande quantidade de espécies patogênicas e não patogênicas colonizando as superfícies de conectores protéticos de zircônia e titânio, além da resposta biológica dos tecidos

peri-implantares frente aos diferentes materiais investigados e ao perfil microbiano associado. Adicionalmente, a caracterização do perfil microbiológico associado às condições de saúde e doença que ocorrem na cavidade oral tem impacto na definição de protocolos clínicos para o adequado tratamento da patologia. Apesar do rigor metodológico estabelecido neste estudo, limitações inerentes aos métodos utilizados são inevitáveis. A técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* apenas pode detectar espécies que tiveram as sondas preparadas a partir do DNA das espécies definidas como alvos no estudo (SOCRANSKY et al., 2004). Assim, espécies não-cultiváveis ou que ainda não tiveram o seu genoma determinado não podem ser detectados por este método. Portanto, técnicas moleculares baseadas no sequenciamento do gene 16S podem gerar informações complementares sobre a diversidade microbiana associada aos conectores protéticos de zircônia e titânio (NASCIMENTO et al., 2016; DE FREITAS et al., 2018). Outra limitação refere-se à especificidade do método DNA-DNA *Checkerboard*. As sondas de DNA são construídas usando todo o genoma da espécie-alvo, o que pode aumentar a probabilidade de reações cruzadas entre espécies estritamente relacionadas. Além disso, existe a possibilidade de ligações inespecíficas do reagente de marcação das sondas com outras macromoléculas quando a proporção de DNA é baixa (SOCRANSKY et al., 2004). A perda de segmento também pode ser considerada uma limitação deste estudo. No cálculo amostral, foi acrescido um valor de 20% do total da amostra definida para compensar possíveis perdas de seguimento, porém foi verificado 30% de perda para ambos os grupos ao longo dos tempos investigados, que possivelmente não comprometeram os resultados. Na presente investigação, não foi utilizado conectores de zircônia na região posterior, uma vez que seu uso em regiões posteriores é questionável devido à ausência de evidências a longo prazo (VECHIATO-FILHO et al., 2016) e o conector utilizado neste estudo apresentava indicação apenas para região anterior.

A literatura atualmente disponível ainda não fornece informações conclusivas sobre os possíveis efeitos de diferentes materiais para componentes protéticos na formação e diversidade do biofilme oral. Estudos laboratoriais e clínicos mostram resultados conflitantes, principalmente devido à grande heterogeneidade de modelos experimentais e métodos de avaliação microbiológicos disponíveis. Os resultados obtidos neste estudo trazem informações adicionais importantes que podem contribuir para um melhor entendimento do tema e orientar no desenvolvimento de pesquisas futuras. No entanto, estudos com um maior período de investigação são necessários para monitorar potenciais alterações no perfil microbiano e nos biomarcadores inflamatórios do fluido peri-implantar, que podem tornar os tecidos de suporte mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais do presente estudo e de acordo com os resultados, foi possível concluir que:

- A profundidade de sondagem reduziu nos implantes com conectores de zircônia após 12 meses, enquanto nos implantes com conectores de titânio aumentou no mesmo período. Não houve diferença na profundidade de sondagem dos materiais investigados após 12 meses de acompanhamento.
- Os sítios com conectores de zircônia e titânio apresentaram aumento do sangramento à sondagem após 12 meses de acompanhamento, sem diferença significativa entre os dois grupos.
- A recessão gengival aumentou ao longo do tempo para os dois substratos investigados, sem diferença significativa entre os dois grupos.
- Os implantes restaurados com conectores de zircônia e titânio apresentaram valores similares de reabsorção óssea marginal ao final de 36 meses.
- Todas as espécies microbianas selecionadas para o estudo foram identificadas nos sítios investigados a partir de 12 meses de acompanhamento, com aumento da quantidade dos micro-organismos ao longo do tempo.
- A quantificação total dos genomas nos diferentes sítios e substratos investigados aumentou ao longo do tempo. Os conectores de zircônia apresentaram maior quantificação total do genoma subgengival quando comparados aos conectores de titânio, em todos os tempos investigados.
- De modo geral, o perfil microbiano detectado nos implantes restaurados com zircônia e titânio foi semelhante, a partir de 12 meses de investigação.
- A microbiota avaliada neste estudo não influenciou no desenvolvimento de doença peri-implantar, uma vez que os resultados clínicos e radiográficos foram compatíveis com condições de saúde.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAP. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnoses and clinical implications. **J Periodontol**, v. 84, n. 4, p. 436-443, 2013.
- ABRAHAMSSON, I.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. The mucosal barrier following abutment dis/reconnection. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 8, p. 568-572, 1997.
- AFRASHTEHFAR, K. I.; AFRASHTEHFAR, C. D. Lack of association between overload and peri-implant tissue loss in healthy conditions. **Evid Based Dent**, v. 17, n. 3, p. 92-93, 2016.
- AL-AHMAD, A.; WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; FACKLER, A.; FOLLO, M.; HELLWIG, E.; BACHLE, M.; HANNIG, C.; HAN, J. S.; WOLKEWITZ, M.; KOHAL, R. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. **Arch Oral Biol**, v. 58, n. 9, p. 1139-1147, 2013.
- AL-AHMAD, A.; WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; FAUST, J.; BACHLE, M.; FOLLO, M.; WOLKEWITZ, M.; HANNIG, C.; HELLWIG, E.; CARVALHO, C.; KOHAL, R. Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 95, n. 1, p. 101-109, 2010.
- ALBREKTSSON, T.; ZARB, G.; WORTHINGTON, P.; ERIKSSON, A. R. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 1, n. 1, p. 11-25, 1986.
- ALQUTAIBI, A. Y. Cement- and Screw-Retained Implant-Supported Restorations Showed Comparable Marginal Bone Loss and Implant Survival Rate. **J Evid Based Dent Pract**, v. 17, n. 2, p. 107-109, 2017.
- ALSHEHRI, M.; ALBAQIAH, H. Antimicrobial Efficacy of Materials Used for Sealing the Implant Abutment Screw Hole: An In Vitro Evaluation. **Implant Dent**, v. 26, n. 6, p. 911-914, 2017.
- ATSUTA, I.; AYUKAWA, Y.; KONDO, R.; OSHIRO, W.; MATSUURA, Y.; FURUHASHI, A.; TSUKIYAMA, Y.; KOYANO, K. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. **J Prosthodont Res**, v. 60, n. 1, p. 3-11, 2016.
- BADARO, M. M.; SALLES, M. M.; LEITE, V. M. F.; ARRUDA, C. N. F.; OLIVEIRA, V. C.; NASCIMENTO, C. D.; SOUZA, R. F.; PARANHOS, H. F. O.; SILVA-LOVATO, C. H. Clinical trial for evaluation of Ricinus communis and sodium hypochlorite as denture cleanser. **J Appl Oral Sci**, v. 25, n. 3, p. 324-334, 2017.
- BARBOSA, R. E.; DO NASCIMENTO, C.; ISSA, J. P.; WATANABE, E.; ITO, I. Y.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. **J Prosthodont**, v. 18, n. 5, p. 376-381, 2009.
- BELIBASAKIS, G. N.; SCHMIDLIN, P. R.; SAHRMANN, P. Molecular microbiological evaluation of subgingival biofilm sampling by paper point and curette. **APMIS**, v. 122, n. 4, p. 347-352, 2014.

BENGAZI, F.; WENNSTROM, J. L.; LEKHOLM, U. Recession of the soft tissue margin at oral implants. A 2-year longitudinal prospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 7, n. 4, p. 303-310, 1996.

BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 10, p. 971-973, 1996.

BIDRA, A.S.; RUNGRUANGANUNT, P. Clinical outcomes of implant abutments in the anterior region: a systematic review. **J Esthet Restor Dent**, v. 25, n. 3, p. 159-76, 2013.

BOLLEN, C. M.; PAPAIOANNO, W.; VAN ELDERE, J.; SCHEPERS, E.; QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. **Clin Oral Implants Res**, v. 7, n. 3, p. 201-211, 1996.

BORNSTEIN, M. M.; HORNER, K.; JACOBS, R. Use of cone beam computed tomography in implant dentistry: current concepts, indications and limitations for clinical practice and research. **Periodontol 2000**, v. 73, n. 1, p. 51-72, 2017.

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

CANEVA, M.; SALATA, L. A.; DE SOUZA, S. S.; BAFFONE, G.; LANG, N. P.; BOTTICELLI, D. Influence of implant positioning in extraction sockets on osseointegration: histomorphometric analyses in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2010.

CANULLO, L.; PENARROCHA-OLTRA, D.; COVANI, U.; ROSSETTI, P. H. Microbiologic and Clinical Findings of Implants in Healthy Condition and with Peri-Implantitis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 30, n. 4, p. 834-842, 2015.

CANULLO, L.; PENARROCHA-OLTRA, D.; SOLDINI, C.; MAZZOCCO, F.; PENARROCHA, M.; COVANI, U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 4, p. 426-434, 2015.

CANULLO, L.; PENARROCHA, M.; MONJE, A.; CATENA, A.; WANG, H. L.; PENARROCHA, D. Association Between Clinical and Microbiologic Cluster Profiles and Peri-implantitis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 32, n. 5, p. 1054-1064, 2017.

CARRILLO DE ALBORNOZ, A.; VIGNOLETTI, F.; FERRANTINO, L.; CARDENAS, E.; DE SANCTIS, M.; SANZ, M. A randomized trial on the aesthetic outcomes of implant-supported restorations with zirconia or titanium abutments. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 12, p. 1161-1169, 2014.

CHAMBRONE, L.; CHAMBRONE, L. A.; LIMA, L. A. Effects of occlusal overload on peri-implant tissue health: a systematic review of animal-model studies. **J Periodontol**, v. 81, n. 10, p. 1367-1378, 2010.

CHANG, M.; WENNSTROM, J. L. Peri-implant soft tissue and bone crest alterations at fixed dental prostheses: a 3-year prospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 5, p. 527-534, 2010.

- CHARALAMPAKIS, G.; BELIBASAKIS, G. N. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 183-187, 2015.
- COSYN, J.; VAN AELST, L.; COLLAERT, B.; PERSSON, G. R.; DE BRUYN, H. The peri-implant sulcus compared with internal implant and suprastructure components: a microbiological analysis. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 13, n. 4, p. 286-295, 2011.
- DE AVILA, E. D.; AVILA-CAMPOS, M. J.; VERGANI, C. E.; SPOLIDORIO, D. M.; MOLLO FDE, A., JR. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. **J Prosthet Dent**, v. 115, n. 4, p. 428-436, 2016.
- DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; LIMA, B. P.; LUX, R.; SHI, W.; JUNIOR, M. J.; SPOLIDORIO, D. M.; VERGANI, C. E.; DE ASSIS MOLLO JUNIOR, F. Impact of Physical Chemical Characteristics of Abutment Implant Surfaces on Bacteria Adhesion. **J Oral Implantol**, v. 42, n. 2, p. 153-158, 2016.
- DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; PALOMARI SPOLIDORIO, D. M.; DE ASSIS MOLLO, F., JR. Implications of Surface and Bulk Properties of Abutment Implants and Their Degradation in the Health of Periodontal Tissue. **Materials (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 5951-5966, 2013.
- DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; VERGANI, C. E.; DE ASSIS MOLLO, F., JR.; SALIH, V. The Relationship between Biofilm and Physical-Chemical Properties of Implant Abutment Materials for Successful Dental Implants. **Materials (Basel)**, v. 7, n. 5, p. 3651-3662, 2014.
- DE AVILA, E. D.; VERGANI, C. E.; MOLLO JUNIOR, F. A.; JUNIOR, M. J.; SHI, W.; LUX, R. Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. **J Prosthet Dent**, 2017.
- DE BRANDAO, M. L.; VETTORE, M. V.; VIDIGAL JUNIOR, G. M. Peri-implant bone loss in cement- and screw-retained prostheses: systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 3, p. 287-295, 2013.
- DE FREITAS, A. R.; SILVA, T. S. O.; RIBEIRO, R. F.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; PEDRAZZI, V.; DO NASCIMENTO, C. Oral bacterial colonization on dental implants restored with titanium or zirconia abutments: 6-month follow-up. **Clin Oral Investig**, 2018.
- DE MIRANDA, R. G.; COLOMBO, A. P. V. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. **Clin Oral Investig**, 2017.
- DESVARIEUX, M.; DEMMER, R. T.; JACOBS, D. R., JR.; RUNDEK, T.; BODEN-ALBALA, B.; SACCO, R. L.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). **J Hypertens**, v. 28, n. 7, p. 1413-1421, 2010.
- DESVARIEUX, M.; DEMMER, R. T.; JACOBS, D. R.; PAPAPANOU, P. N.; SACCO, R. L.; RUNDEK, T. Changes in clinical and microbiological periodontal profiles relate to progression of carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology study. **J Am Heart Assoc**, v. 2, n. 6, p. e000254, 2013.

DIAZ, P. I.; CHALMERS, N. I.; RICKARD, A. H.; KONG, C.; MILBURN, C. L.; PALMER, R. J., JR.; KOLENBRANDER, P. E. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 4, p. 2837-2848, 2006.

DO NASCIMENTO, C.; DA ROCHA AGUIAR, C.; PITA, M. S.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR.; RIBEIRO, R. F. Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates. **Microsc Res Tech**, v. 76, n. 2, p. 126-132, 2013.

DO NASCIMENTO, C.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR.; MONESI, N.; CANDIDO-SILVA, J. A. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 8, p. 3039-3040, 2010.

DO NASCIMENTO, C.; DOS SANTOS, J. N.; PEDRAZZI, V.; PITA, M. S.; MONESI, N.; RIBEIRO, R. F.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR. Impact of temperature and time storage on the microbial detection of oral samples by Checkerboard DNA-DNA hybridization method. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 1, p. 12-21, 2014.

DO NASCIMENTO, C.; FERREIRA DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R.; ISSA, J. P.; ITO, I. Y.; LOVATO DA SILVA, C. H.; DE FREITAS OLIVEIRA PARANHOS, H.; DE SOUZA, R. F. Use of the DNA Checkerboard hybridization method for detection and quantitation of *Candida* species in oral microbiota. **Can J Microbiol**, v. 55, n. 5, p. 622-626, 2009.

DO NASCIMENTO, C.; MIANI, P. K.; PEDRAZZI, V.; GONCALVES, R. B.; RIBEIRO, R. F.; FARIA, A. C.; MACEDO, A. P.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR. Leakage of saliva through the implant-abutment interface: in vitro evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 27, n. 3, p. 551-560, 2012.

DO NASCIMENTO, C.; MONESI, N.; ITO, I. Y.; ISSA, J. P.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. Bacterial diversity of periodontal and implant-related sites detected by the DNA Checkerboard method. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 12, p. 1607-1613, 2011.

DO NASCIMENTO, C.; MULLER, K.; SATO, S.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. Effect of sample storage time on detection of hybridization signals in Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Can J Microbiol**, v. 58, n. 4, p. 502-506, 2012.

DO NASCIMENTO, C.; PAULO, D. F.; PITA, M. S.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. Microbial diversity of the supra- and subgingival biofilm of healthy individuals after brushing with chlorhexidine- or silver-coated toothbrush bristles. **Can J Microbiol**, v. 61, n. 2, p. 112-123, 2015.

DO NASCIMENTO, C.; PEDRAZZI, V.; MIANI, P. K.; MOREIRA, L. D.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR. Influence of repeated screw tightening on bacterial leakage along the implant-abutment interface. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 12, p. 1394-1397, 2009.

DO NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; CALEFI, P. L.; DE OLIVEIRA SILVA, T. S.; DOS SANTOS, J. B.; PEDRAZZI, V. Different sealing materials preventing the microbial leakage into the screw-retained implant restorations: an in vitro analysis by DNA checkerboard hybridization. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 2, p. 242-250, 2017.

DO NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; RIBEIRO, R. F. In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. **Arch Oral Biol**, v. 58, n. 7, p. 853-861, 2013.

DO NASCIMENTO, C.; SANTOS BARBOSA, R. E.; MARDEGAN ISSA, J. P.; WATANABE, E.; YOKO ITO, I.; MONESI, N.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. The use of fluorescein for labeling genomic probes in the checkerboard DNA-DNA hybridization method. **Microbiol Res**, v. 163, n. 4, p. 403-407, 2008.

DO, T.; DEVINE, D.; MARSH, P. D. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. **Clin Cosmet Investig Dent**, v. 5, p. 11-19, 2013.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.

FICKL, S. Peri-implant mucosal recession: Clinical significance and therapeutic opportunities. **Quintessence Int**, v. 46, n. 8, p. 671-676, 2015.

FIRME, C. T.; VETTORE, M. V.; MELO, M.; VIDIGAL, G. M., JR. Peri-implant bone loss around single and multiple prostheses: systematic review and meta-analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, n. 1, p. 79-87, 2014.

FURST, M. M.; SALVI, G. E.; LANG, N. P.; PERSSON, G. R. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 4, p. 501-508, 2007.

GIBBS, C. H.; HIRSCHFELD, J. W.; LEE, J. G.; LOW, S. B.; MAGNUSSON, I.; THOUSAND, R. R.; YERNENI, P.; CLARK, W. B. Description and clinical evaluation of a new computerized periodontal probe--the Florida probe. **J Clin Periodontol**, v. 15, n. 2, p. 137-144, 1988.

GOIATO, M. C.; PELLIZZER, E. P.; DA SILVA, E. V.; BONATTO LDA, R.; DOS SANTOS, D. M. Is the internal connection more efficient than external connection in mechanical, biological, and esthetical point of views? A systematic review. **Oral Maxillofac Surg**, v. 19, n. 3, p. 229-242, 2015.

GUPTA, N.; RATH, S. K.; LOHRA, P. Comparative evaluation of accuracy of periodontal probing depth and attachment levels using a Florida probe versus traditional probes. **Med J Armed Forces India**, v. 71, n. 4, p. 352-358, 2015.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; PATEL, M. R.; SONG, X. Microbial complexes in supragingival plaque. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, n. 3, p. 196-205, 2008.

HAHNEL, S.; WIESER, A.; LANG, R.; ROSENTRITT, M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 11, p. 1297-1301, 2015.

HOSSEINI, M.; WORSAAE, N.; SCHIODT, M.; GOTFREDSEN, K. A 1-year randomised controlled trial comparing zirconia versus metal-ceramic implant supported single-tooth restorations. **Eur J Oral Implantol**, v. 4, n. 4, p. 347-361, 2011.

HOSSEINI, M.; WORSAAE, N.; SCHIODT, M.; GOTFREDSEN, K. A 3-year prospective study of implant-supported, single-tooth restorations of all-ceramic and metal-ceramic materials in patients with tooth agenesis. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 10, p. 1078-1087, 2013.

JEPSEN, S.; BERGLUNDH, T.; GENCO, R.; AASS, A. M.; DEMIREL, K.; DERKS, J.; FIGUERO, E.; GIOVANNOLI, J. L.; GOLDSTEIN, M.; LAMBERT, F.; ORTIZ-VIGON, A.; POLYZOIS, I.; SALVI, G. E.; SCHWARZ, F.; SERINO, G.; TOMASI, C.; ZITZMANN, N. U. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. **J Clin Periodontol**, v. 42 Suppl 16, p. S152-157, 2015.

JERVOE-STORM, P. M.; JEPSEN, S.; JOHREN, P.; MERICSKE-STERN, R.; ENKLING, N. Internal bacterial colonization of implants: association with peri-implant bone loss. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 8, p. 957-963, 2015.

JUNG, R. E.; PJETURSSON, B. E.; GLAUSER, R.; ZEMBIC, A.; ZWAHLEN, M.; LANG, N. P. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 2, p. 119-130, 2008.

JUNG, R. E.; ZEMBIC, A.; PJETURSSON, B. E.; ZWAHLEN, M.; THOMA, D. S. Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. **Clin Oral Implants Res**, v. 23 Suppl 6, p. 2-21, 2012.

KASHBOUR, W. A.; ROUSSEAU, N. S.; ELLIS, J. S.; THOMASON, J. M. Patients' experiences of dental implant treatment: A literature review of key qualitative studies. **J Dent**, v. 43, n. 7, p. 789-797, 2015.

KATSOULIS, J.; HEITZ-MAYFIELD, L. J.; WEIBEL, M.; HIRSCHI, R.; LANG, N. P.; PERSSON, G. R. Impact of sample storage on detection of periodontal bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, n. 2, p. 128-130, 2005.

KATSOULIS, J.; LANG, N. P.; PERSSON, G. R. Proportional distribution of the red complex and its individual pathogens after sample storage using the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 6, p. 628-633, 2005.

KLINGE, B.; MEYLE, J.; WORKING, G. Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012. **Clin Oral Implants Res**, v. 23 Suppl 6, p. 108-110, 2012.

KORSCH, M.; ROBRA, B. P.; WALTHER, W. Predictors of excess cement and tissue response to fixed implant-supported dentures after cementation. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 17 Suppl 1, p. e45-53, 2015.

LAFAURIE, G. I.; SABOGAL, M. A.; CASTILLO, D. M.; RINCON, M. V.; GOMEZ, L. A.; LESMES, Y. A.; CHAMBRONE, L. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. **J Periodontol**, v. 88, n. 10, p. 1066-1089, 2017.

LANG, N. P.; BERGLUNDH, T.; WORKING GROUP 4 OF SEVENTH EUROPEAN WORKSHOP ON, P. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 38 Suppl 11, p. 178-181, 2011.

- LANG, N. P.; WILSON, T. G.; CORBET, E. F. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. **Clin Oral Implants Res**, v. 11 Suppl 1, p. 146-155, 2000.
- LARSEN, T.; FIEHN, N. E. Dental biofilm infections - an update. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 376-384, 2017.
- LEMOES, C. A.; DE SOUZA BATISTA, V. E.; ALMEIDA, D. A.; SANTIAGO JUNIOR, J. F.; VERRI, F. R.; PELLIZZER, E. P. Evaluation of cement-retained versus screw-retained implant-supported restorations for marginal bone loss: A systematic review and meta-analysis. **J Prosthet Dent**, v. 115, n. 4, p. 419-427, 2016.
- LINDHE, J.; MEYLE, J.; GROUP, D. O. E. W. O. P. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 282-285, 2008.
- LINKEVICIUS, T.; APSE, P. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 23, n. 3, p. 449-456, 2008.
- LINKEVICIUS, T.; VAITELIS, J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: a systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 26 Suppl 11, p. 139-147, 2015.
- LIRA-JUNIOR, R.; AKERMAN, S.; KLINGE, B.; BOSTROM, E. A.; GUSTAFSSON, A. Salivary microbial profiles in relation to age, periodontal, and systemic diseases. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0189374, 2018.
- LOPS, D.; BRESSAN, E.; CHIAPASCO, M.; ROSSI, A.; ROMEO, E. Zirconia and titanium implant abutments for single-tooth implant prostheses after 5 years of function in posterior regions. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, n. 1, p. 281-287, 2013.
- LOPS, D.; BRESSAN, E.; PARPAIOLA, A.; SBRICOLI, L.; CECCHINATO, D.; ROMEO, E. Soft tissues stability of cad-cam and stock abutments in anterior regions: 2-year prospective multicentric cohort study. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 12, p. 1436-1442, 2015.
- MARSH, P. D.; DO, T.; BEIGHTON, D.; DEVINE, D. A. Influence of saliva on the oral microbiota. **Periodontol 2000**, v. 70, n. 1, p. 80-92, 2016.
- MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **J Clin Periodontol**, v. 44 Suppl 18, p. S12-S22, 2017.
- MAWHINNEY, J.; CONNOLLY, E.; CLAFFEY, N.; MORAN, G.; POLYZOIS, I. An in vivo comparison of internal bacterial colonization in two dental implant systems: identification of a pathogenic reservoir. **Acta Odontol Scand**, v. 73, n. 3, p. 188-194, 2015.
- MAZZOCCO, F.; JIMENEZ, D.; BARALLAT, L.; PANIZ, G.; DEL FABBRO, M.; NART, J. Bone volume changes after immediate implant placement with or without flap elevation. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 4, p. 495-501, 2017.
- MISHRA, S. K.; CHOWDHARY, R.; KUMARI, S. Microleakage at the Different Implant Abutment Interface: A Systematic Review. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 6, p. ZE10-ZE15, 2017.

MUDDUGANGADHAR, B. C.; AMARNATH, G. S.; SONIKA, R.; CHHEDA, P. S.; GARG, A. Meta-analysis of Failure and Survival Rate of Implant-supported Single Crowns, Fixed Partial Denture, and Implant Tooth-supported Prostheses. **J Int Oral Health**, v. 7, n. 9, p. 11-17, 2015.

NAERT, I.; DUYCK, J.; VANDAMME, K. Occlusal overload and bone/implant loss. **Clin Oral Implants Res**, v. 23 Suppl 6, p. 95-107, 2012.

NAKAMURA, K.; KANNO, T.; MILLEDING, P.; ORTENGREN, U. Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review. **Int J Prosthodont**, v. 23, n. 4, p. 299-309, 2010.

NASCIMENTO, C.; IKEDA, L. N.; PITA, M. S.; PEDROSO E SILVA, R. C.; PEDRAZZI, V.; ALBUQUERQUE, R. F.; RIBEIRO, R. F. Marginal fit and microbial leakage along the implant-abutment interface of fixed partial prostheses: An in vitro analysis using Checkerboard DNA-DNA hybridization. **J Prosthet Dent**, v. 114, n. 6, p. 831-838, 2015.

NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; FERNANDES, F. H.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; RIBEIRO, R. F. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 3, p. 337-343, 2014.

NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; SANTOS EDE, S.; MONESI, N.; PEDRAZZI, V.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; RIBEIRO, R. F. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. **Dent Mater**, v. 32, n. 1, p. 93-101, 2016.

NOTHDURFT, F. P.; FONTANA, D.; RUPPENTHAL, S.; MAY, A.; AKTAS, C.; MEHRAEIN, Y.; LIPP, P.; KAESTNER, L. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 17, n. 6, p. 1237-1249, 2015.

ONG, C. T.; IVANOVSKI, S.; NEEDLEMAN, I. G.; RETZEPI, M.; MOLES, D. R.; TONETTI, M. S.; DONOS, N. Systematic review of implant outcomes in treated periodontitis subjects. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 5, p. 438-462, 2008.

PADIAL-MOLINA, M.; LOPEZ-MARTINEZ, J.; O'VALLE, F.; GALINDO-MORENO, P. Microbial Profiles and Detection Techniques in Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. **J Oral Maxillofac Res**, v. 7, n. 3, p. e10, 2016.

PAE, A.; LEE, H.; KIM, H. S.; KWON, Y. D.; WOO, Y. H. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. **Biomed Mater**, v. 4, n. 2, p. 025005, 2009.

PAPAPANOU, P. N.; MADIANOS, P. N.; DAHLEN, G.; SANDROS, J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. **Eur J Oral Sci**, v. 105, n. 5 Pt 1, p. 389-396, 1997.

PAPASPYRIDAKOS, P.; CHEN, C. J.; SINGH, M.; WEBER, H. P.; GALLUCCI, G. O. Success criteria in implant dentistry: a systematic review. **J Dent Res**, v. 91, n. 3, p. 242-248, 2012.

- PASSOS, S. P.; GRESSLER MAY, L.; FARIA, R.; OZCAN, M.; BOTTINO, M. A. Implant-abutment gap versus microbial colonization: Clinical significance based on a literature review. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 101, n. 7, p. 1321-1328, 2013.
- PAYER, M.; HESCHL, A.; KOLLER, M.; ARNETZL, G.; LORENZONI, M.; JAKSE, N. All-ceramic restoration of zirconia two-piece implants--a randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 4, p. 371-376, 2015.
- PEREZ-CHAPARRO, P. J.; DUARTE, P. M.; SHIBLI, J. A.; MONTENEGRO, S.; LACERDA HELUY, S.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; FERES, M. The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. **J Periodontol**, v. 87, n. 11, p. 1295-1304, 2016.
- PESSOA, R. S.; SOUSA, R. M.; PEREIRA, L. M.; NEVES, F. D.; BEZERRA, F. J.; JAECQUES, S. V.; SLOTEN, J. V.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W.; SPIN-NETO, R. Bone Remodeling Around Implants with External Hexagon and Morse-Taper Connections: A Randomized, Controlled, Split-Mouth, Clinical Trial. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 19, n. 1, p. 97-110, 2017.
- PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial. **Biomaterials**, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1999.
- PITA, M. S.; DO NASCIMENTO, C.; DOS SANTOS, C. G. P.; PIRES, I. M.; PEDRAZZI, V. Experimental conical-head abutment screws on the microbial leakage through the implant-abutment interface: an in vitro analysis using target-specific DNA probes. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 7, p. e68-e75, 2017.
- PJETURSSON, B. E.; TAN, K.; LANG, N. P.; BRAGGER, U.; EGGER, M.; ZWAHLEN, M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 6, p. 667-676, 2004.
- PJETURSSON, B. E.; THOMA, D.; JUNG, R.; ZWAHLEN, M.; ZEMBIC, A. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. **Clin Oral Implants Res**, v. 23 Suppl 6, p. 22-38, 2012.
- PYE, A. D.; LOCKHART, D. E.; DAWSON, M. P.; MURRAY, C. A.; SMITH, A. J. A review of dental implants and infection. **J Hosp Infect**, v. 72, n. 2, p. 104-110, 2009.
- QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. **J Clin Periodontol**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1995.
- RAFFAINI, F. C.; FREITAS, A. R.; SILVA, T. S. O.; CAVAGIONI, T.; OLIVEIRA, J. F.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; PEDRAZZI, V.; RIBEIRO, R. F.; DO NASCIMENTO, C. Genome analysis and clinical implications of the bacterial communities in early biofilm formation on dental implants restored with titanium or zirconia abutments. **Biofouling**, v. 34, n. 2, p. 173-182, 2018.

RAKIC, M.; GRUSOVIN, M. G.; CANULLO, L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 31, n. 2, p. 359-368, 2016.

RIMONDINI, L.; CERRONI, L.; CARRASSI, A.; TORRICELLI, P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 6, p. 793-798, 2002.

ROEHLING, S.; ASTASOV-FRAUENHOFFER, M.; HAUSER-GERSPACH, I.; BRAISSANT, O.; WOELFLER, H.; WALTIMO, T.; KNIHA, H.; GAHLERT, M. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. **J Periodontol**, v. 88, n. 3, p. 298-307, 2017.

SAILER, I.; PHILIPP, A.; ZEMBIC, A.; PJETURSSON, B. E.; HAMMERLE, C. H.; ZWAHLEN, M. A systematic review of the performance of ceramic and metal implant abutments supporting fixed implant reconstructions. **Clin Oral Implants Res**, v. 20 Suppl 4, p. 4-31, 2009.

SAILER, I.; ZEMBIC, A.; JUNG, R. E.; SIEGENTHALER, D.; HOLDEREGGER, C.; HAMMERLE, C. H. Randomized controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for canine and posterior single-tooth implant reconstructions: preliminary results at 1 year of function. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 3, p. 219-225, 2009.

SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of human oral microbiota. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 3, p. 277-285, 2005.

SALEH, M. H. A.; RAVIDA, A.; SUAREZ-LOPEZ DEL AMO, F.; LIN, G. H.; ASA'AD, F.; WANG, H. L. The effect of implant-abutment junction position on crestal bone loss: A systematic review and meta-analysis. **Clin Implant Dent Relat Res**, 2018.

SALVI, G. E.; COSGAREA, R.; SCULEAN, A. Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases. **J Dent Res**, v. 96, n. 1, p. 31-37, 2017.

SALVI, G. E.; LANG, N. P. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 19 Suppl, p. 116-127, 2004.

SAMARANAYAKE, L.; MATSUBARA, V. H. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. **Dent Clin North Am**, v. 61, n. 2, p. 199-215, 2017.

SANZ, M.; CHAPPLE, I. L.; WORKING GROUP 4 OF THE, V. E. W. O. P. Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4. **J Clin Periodontol**, v. 39 Suppl 12, p. 202-206, 2012.

SCARANO, A.; PIATTELLI, M.; CAPUTI, S.; FAVERO, G. A.; PIATTELLI, A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. **J Periodontol**, v. 75, n. 2, p. 292-296, 2004.

SCHMITT, C. M.; NOGUEIRA-FILHO, G.; TENENBAUM, H. C.; LAI, J. Y.; BRITO, C.; DORING, H.; NONHOFF, J. Performance of conical abutment (Morse Taper) connection implants: a systematic review. **J Biomed Mater Res A**, v. 102, n. 2, p. 552-574, 2014.

- SEGUNDO ADE, L.; PISANI, M. X.; NASCIMENTO, C.; SOUZA, R. F.; PARANHOS HDE, F.; SILVA-LOVATO, C. H. Clinical trial of an experimental cleaning solution: antibiofilm effect and integrity of a silicone-based denture liner. **J Contemp Dent Pract**, v. 15, n. 5, p. 534-542, 2014.
- SHIBLI, J. A.; MELO, L.; FERRARI, D. S.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; FERES, M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 10, p. 975-982, 2008.
- SICILIA, A.; QUIRYNEN, M.; FONTOLLIET, A.; FRANCISCO, H.; FRIEDMAN, A.; LINKEVICIUS, T.; LUTZ, R.; MEIJER, H. J.; ROMPEN, E.; ROTUNDO, R.; SCHWARZ, F.; SIMION, M.; TEUGHEL, W.; WENNERBERG, A.; ZUHR, O. Long-term stability of peri-implant tissues after bone or soft tissue augmentation. Effect of zirconia or titanium abutments on peri-implant soft tissues. Summary and consensus statements. The 4th EAO Consensus Conference 2015. **Clin Oral Implants Res**, v. 26 Suppl 11, p. 148-152, 2015.
- SMALL, P. N.; TARNOW, D. P. Gingival recession around implants: a 1-year longitudinal prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 4, p. 527-532, 2000.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**, v. 38, p. 135-187, 2005.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L., JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; SMITH, C.; MARTIN, L.; HAFFAJEE, J. A.; UZEL, N. G.; GOODSON, J. M. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, n. 6, p. 352-362, 2004.
- SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; LEVIN, A. E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, v. 17, n. 4, p. 788-792, 1994.
- SOUZA, V.; MARDAS, N.; FARIAS, B.; PETRIE, A.; NEEDLEMAN, I.; SPRATT, D.; DONOS, N. A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients. **Clin Oral Implants Res**, v. 27, n. 7, p. 787-844, 2016.
- SUBRAMANI, K.; JUNG, R. E.; MOLENBERG, A.; HAMMERLE, C. H. Biofilm on dental implants: a review of the literature. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 4, p. 616-626, 2009.
- TALLARICO, M.; CANULLO, L.; CANEVA, M.; OZCAN, M. Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on periimplantitis: A systematic review and meta-analysis. **J Prosthodont Res**, v. 61, n. 3, p. 233-241, 2017.
- TEIXEIRA, W.; RIBEIRO, R. F.; SATO, S.; PEDRAZZI, V. Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, n. 1, p. 56-62, 2011.
- TELES, R. P.; GURSKY, L. C.; FAVERI, M.; ROSA, E. A.; TELES, F. R.; FERES, M.; SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 37, n. 4, p. 313-323, 2010.

TEUGHEL, W.; VAN ASSCHE, N.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clin Oral Implants Res**, v. 17 Suppl 2, p. 68-81, 2006.

TRICHES, T. C.; ZIMMERMANN, G. S.; DE FREITAS, S. F. T.; XIMENES, M.; VIEIRA, R. S.; CORDEIRO, M. M. R. Efficacy of a single session protocol for endodontic treatment in primary teeth: in vivo study. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 19, n. 1, p. 47-55, 2018.

VAN BRAKEL, R.; CUNE, M. S.; VAN WINKELHOFF, A. J.; DE PUTTER, C.; VERHOEVEN, J. W.; VAN DER REIJDEN, W. Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an in vivo study in man. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 6, p. 571-577, 2011.

VAN BRAKEL, R.; MEIJER, G. J.; VERHOEVEN, J. W.; JANSEN, J.; DE PUTTER, C.; CUNE, M. S. Soft tissue response to zirconia and titanium implant abutments: an in vivo within-subject comparison. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 10, p. 995-1001, 2012.

VAN STEENBERGEN, T. J.; TIMMERMAN, M. F.; MIKX, F. H.; DE QUINCEY, G.; VAN DER WEIJDEN, G. A.; VAN DER VELDEN, U.; DE GRAAFF, J. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 10, p. 955-959, 1996.

VECHIATO-FILHO, A. J.; PESQUEIRA, A. A.; DE SOUZA, G. M.; DOS SANTOS, D. M.; PELLIZZER, E. P.; GOIATO, M. C. Are Zirconia Implant Abutments Safe and Predictable in Posterior Regions? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Prosthodont**, v. 29, n. 3, p. 233-244, 2016.

VEITZ-KEENAN, A.; KEENAN, J. R. Implant outcomes poorer in patients with history of periodontal disease. **Evid Based Dent**, v. 18, n. 1, p. 5, 2017.

VETTORE, M. V.; LEAO, A. T.; LEAL MDO, C.; FERES, M.; DE FIGUEIREDO, L. C.; SHEIHAM, A. Periodontal bacterial load: a proposed new epidemiological method for periodontal disease assessment. **J Contemp Dent Pract**, v. 11, n. 1, p. E049-056, 2010.

WEBER, H. P.; KIM, D. M.; NG, M. W.; HWANG, J. W.; FIORELLINI, J. P. Peri-implant soft-tissue health surrounding cement- and screw-retained implant restorations: a multi-center, 3-year prospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 4, p. 375-379, 2006.

WELANDER, M.; ABRAHAMSSON, I.; BERGLUNDH, T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 7, p. 635-641, 2008.

XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 9, p. 648-657, 2000a.

XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 10, p. 722-732, 2000b.

XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOM, S.; THOMPSON, M.; TORRESYAP, G.; SOCRANSKY, S. S. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 9, p. 637-647, 2000.

ZANGRANDO, M. S.; DAMANTE, C. A.; SANT'ANA, A. C.; RUBO DE REZENDE, M. L.; GREGHI, S. L.; CHAMBRONE, L. Long-term evaluation of periodontal parameters and implant outcomes in periodontally compromised patients: a systematic review. **J Periodontol**, v. 86, n. 2, p. 201-221, 2015.

ZEMBIC, A.; BOSCH, A.; JUNG, R. E.; HAMMERLE, C. H.; SAILER, I. Five-year results of a randomized controlled clinical trial comparing zirconia and titanium abutments supporting single-implant crowns in canine and posterior regions. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 4, p. 384-390, 2013.

ZEMBIC, A.; KIM, S.; ZWAHLEN, M.; KELLY, J. R. Systematic review of the survival rate and incidence of biologic, technical, and esthetic complications of single implant abutments supporting fixed prostheses. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29 Suppl, p. 99-116, 2014.

ZEMBIC, A.; SAILER, I.; JUNG, R. E.; HAMMERLE, C. H. Randomized-controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for single-tooth implants in canine and posterior regions: 3-year results. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 8, p. 802-808, 2009.

ZHUANG, L. F.; WATT, R. M.; MATTHEOS, N.; SI, M. S.; LAI, H. C.; LANG, N. P. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. **Clin Oral Implants Res**, v. 27, n. 1, p. 13-21, 2016.

Anexo

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

Andamento do projeto - CAAE - 0066.0.138.000-10				
Título do Projeto de Pesquisa Avaliação da contaminação peri e intra-implantar de próteses cimentadas sobre conectores de titânio ou zircônia pelas técnicas DNA Checkerboard e 16S rDNA-based PCR.				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	19/08/2010 14:15:43	03/11/2010 10:51:44		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	19/08/2010 14:15:43	Folha de Rosto	0066.0.138.000-10	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	17/08/2010 10:12:43	Folha de Rosto	FR363800	Pesquisador
3 - Protocolo Aprovado no CEP	03/11/2010 10:51:44	Folha de Rosto	2010.1.1099.58.4	CEP

Apêndice

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Nós, Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro (pesquisador responsável) e Cássio do Nascimento, convidamos você, _____, a participar da pesquisa **“Avaliação da contaminação peri e intra-implantar de próteses cimentadas sobre conectores de titânio ou zircônia pelas técnicas DNA Checkerboard e 16S rDNA-based PCR”**.

A utilização de implantes dentários de dois componentes tem sido amplamente utilizada nas clínicas odontológicas para a reposição de dentes ausentes. Sobre o implante colocado no osso, são usados conectores para a colocação final da prótese (dente artificial). Uma das principais causas de complicações neste tipo de tratamento é a imperfeita adaptação entre o implante e seus componentes. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar, utilizando técnicas de diagnósticos moleculares (identificação por DNA), a possível passagem de espécies bacterianas presentes na cavidade oral por meio da junção entre implantes e seus componentes protéticos fabricados em dois diferentes tipos de materiais atualmente disponíveis no mercado brasileiro, titânio ou zircônia.

Os pacientes participantes do projeto de pesquisa serão tratados com implantes e próteses unitárias (dentes) cimentadas. O paciente não terá nenhuma despesa ao participar deste estudo. Após a colocação dos implantes, serão colhidas amostras de placa bacteriana dos sulcos periodontais, peri-implantares (gengiva) e interior dos implantes no momento da reabertura dos implantes (instalação da coroa provisória) e após 3 e 6 meses da instalação das coroas provisórias. O período estabelecido para a colheita das amostras não trará complicações nem prejuízos para o paciente, uma vez que servirá para avaliar o comportamento biomecânico da prótese previamente à cimentação da coroa definitiva, possibilitando a realização de ajustes que garantam o sucesso da prótese definitiva.

Apesar dos baixos índices de complicações durante a cirurgia de colocação dos implantes, o paciente deve estar ciente da possibilidade dos riscos de perda do implante. Nestes casos, serão avaliadas as causas do insucesso para a possibilidade de realizar novamente a cirurgia de implante.

O paciente deverá comparecer à FORP-USP todas as vezes em que houver solicitação do dentista ou dos pesquisadores desse projeto.

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

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

Você receberá uma cópia deste termo, com o endereço e telefone dos pesquisadores e da secretaria do comitê de ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida você poderá entrar em contato pelos telefones e endereços abaixo.

PROF. DR. RICARDO FARIA RIBEIRO

Telefones para contato: **(16) 3602-4046 / 3602-3983**
rribeiro@forp.usp.br

E-mail:

Cássio do Nascimento

Telefones para contato: **(16) 3602-4095 / 8192-4729**
cassionasc@forp.usp.br

E-mail:

Nome do Secretário do CEP: Sr. Daniel Mesquita de Moraes

Endereço e telefone do CEP: Seção de Apoio Acadêmico, Prédio da Administração FORP/USP. Fone (16) 3602-4129

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

Sujeito da pesquisa

RG: _____

Telefone: () _____

Endereço: _____