UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

MARÍLIA LAMENHA LINS PINHEIRO

**Comparação da contaminação microbiana de dois sistemas de encaixe
para sobredentaduras mandibulares retidas por implantes**

Estudo clínico randomizado

Ribeirão Preto

2018

MARÍLIA LAMENHA LINS PINHEIRO

**Comparação da contaminação microbiana de dois sistemas de encaixe
para sobredentaduras mandibulares retidas por implantes**

Estudo clínico randomizado

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

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Jr.

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

Pinheiro, Marília Lamenha Lins

Comparação da contaminação microbiana de dois sistemas de encaixe para sobredentaduras mandibulares retidas por implantes. *Estudo clínico randomizado*. Ribeirão Preto, 2018.

132p. : il.; 30 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Júnior

1. DNA- Checkerboard; 2. Contaminação bacteriana; 3. Encaixe de precisão; 4. Sobredentadura

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pinheiro, MLL. **Comparação da contaminação microbiana de dois sistemas de encaixe para sobredentaduras mandibulares retidas por implantes. *Estudo clínico randomizado.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Odontologia. Área de concentração:
Reabilitação Oral.

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Julgamento: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

À minha companheira de todos os momentos, dedico este trabalho à mãe de todos nós, *Nossa Senhora Aparecida*, pelo olhar e cuidado sempre fortemente sentidos. À *Deus* por possibilitar todos os encontros da vida, que com sabedoria nos coloca ao caminho as pedras que podemos carregar.

Ao meu noivo, *Paulo Henrique*, grande responsável por nem me deixar cogitar desistir. Impulsionou minha coragem, lembrou minha força e garra para encarar os desafios e me mimou com afeto. Ensinou-me a exercer a paciência e tolerância. Ainda, a amar, respeitar, sentir o carinho e cuidado àqueles que queremos o bem. Você é meu amor, meu grande companheiro em todos os momentos, minha calma, meu porto. Agradeço todos os dias por ter recebido você em minha vida!

À minha mãe, *Valéria*, quem mesmo de longe sempre se fez presente nesta etapa tão importante de meu crescimento. Nunca se opôs à minha saída do ninho, permitiu alçar voo, tornando-o mais alto e estável.

Ao meu primo, *Tiago*, *in memoriam*, a quem sempre foi para mim o maior doce de ente familiar. Desde pequena admirei sua dedicação aos estudos, foi referência para que eu pudesse me lançar, mesmo sozinha, no lugar mais indicado para minha área. Reconheço que de alguma forma me esforcei para receber seu olhar, como no dia que brilhei quando recebi seu telefonema pela aprovação no vestibular e suas palavras de orgulho. Sua vida foi extremamente curta, mas suficientemente longa para deixar sua linda marca no meu coração. Serás eternamente lembrado, meu amor!

Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, **Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Jr.**, quem com sua grande dedicação à docência, esteve sempre disponível para me receber e a explicar detalhadamente tudo o que pudesse e o que sentisse oportuno. Foi responsável por meu amadurecimento nesta primeira etapa de formação para a vida acadêmica. Demonstrou grande humildade em reconhecer as lacunas de seu conhecimento ou algumas incertezas, porém estando disposto a imediatamente pesquisar as respostas e a esclarecer as dúvidas. Ensinou-me a não buscar ser mais uma, mas a ser a Marília, que com a minha individualidade devo sempre empregar a maior dedicação possível, independente do trabalho exercido. Reconheço seu esforço, com alto perfeccionismo e rigor para formar orientandos com senso crítico, além de capacidade de desenvolvimento de soluções, clara e sucinta redação e desenvoltura na pesquisa. Meu reconhecimento!

Forte agradecimento ao **Prof. Dr. Cássio do Nascimento**, quem conquista a todos com sua simpatia e disponibilidade, estando junto a sanar as dúvidas sempre que requisitado. Como integrante responsável pelo laboratório, o convívio me proporcionou grande aprendizado.

À **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, quem tanto contribuiu com as análises e investigações deste trabalho, sempre se mostrando aberta e disponível para os questionamentos que eventualmente surgiam, independentemente do dia da semana, do horário ou mesmo da distância física. Sua inteligência e humildade me encantaram!

À equipe **LABDOM**, especialmente ao doutorando **Thalisson Saymo de Oliveira Silva** quem soube ser bem mais que um amigo, foi um grande parceiro nesta caminhada. De alguma forma fui abençoada por fazer parte deste laboratório que com o acolhimento irmão, pude me sentir em casa. À amiga **Alice Ramos de Freitas** por estar sempre presente tornando esta jornada mais tranquila e feliz. Formamos um belo trio, desejo que nossa amizade permaneça firme, ainda que em lugares distantes, possamos manter o laço de união que foi tão forte e importante.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão, **Vinícius**, por se tornar um amigo. A distância fez as relações familiares se tornarem saudosas e a valorizar cada momento que nos é colocado como oportunidade para sermos pessoas melhores. Aos meus **tios**, **primos** e **avó Cleusa**, por tantas lembranças de momentos felizes e pelo carinho constantemente recebido.

Aos sogros, **Elenice** e **Paulo**, por me acolherem de forma tão intensa. Desde o primeiro dia me fizeram sentir em casa, de fato como parte da família. Passar as datas comemorativas com vocês me fizeram sentir acolhida, feliz e mais forte, ainda que longe dos meus. Aos cunhados, **Carina** e **Celso**, pelo suporte ofertado de coração e pelas constantes reuniões e bons momentos. Em breve vocês todos também serão minha família!

Aos **amigos da vida** quase que inteira, que estiveram comigo com uma presença incrível, sempre alegres dando prioridade às nossas reuniões quando havia oportunidade. Hoje tenho a certeza de que nada vai mudar nosso laço de irmandade.

Aos **amigos que Ribeirão Preto** e **Guaíra** me deram; às **amigas alagoanas** em **Ribeirão** e à melhor **turma de Mestrado**, onde a minoria paulista também se tornou nordestina, incorporando o espírito de acolhimento e parceria. Todos vocês fizeram meus dias muito felizes. Levarei a todos com grande saudade deste rico período da minha vida!

À **Prof. Dra. Regina Maura Fernandes** quem foi grande espelho, exemplo de profissional dedicada e amante da Odontologia. Sua empolgação me encheu os olhos, ensinou-me que estar em sala de aula compartilhando experiências com um material de qualidade é muito possível aos também apaixonados pela prática clínica.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)**, ao seu conceituado **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral** e aos **Docentes e funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, por todo apoio e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte e bolsa de mestrado.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

Resumo

Pinheiro, MLL. **Comparação da contaminação microbiana de dois sistemas de encaixe para sobredentaduras mandibulares retidas por implantes. Estudo clínico randomizado.** [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2018.

RESUMO

A colonização e proliferação de micro-organismos periodontopatogênicos na gengiva marginal aos implantes dentários, assim como ao redor de seus componentes protéticos, pode representar riscos à saúde dos tecidos peri-implantares, à semelhança do que ocorre com os tecidos periodontais. O objetivo deste estudo foi identificar e quantificar 32 espécies microbianas de biofilmes coletados das superfícies de dois sistemas de encaixe para sobredentaduras retidas por implantes: um esférico (*Retentive Anchor*, *Institut Straumann AG*, Suíça - RA) e um cilíndrico (*Locator*, *Zest Anchors Inc.*, CA-USA - Loc), das próteses, implantes e sulcos peri-implantares, ao longo do tempo. Os biofilmes analisados foram coletados em um estudo randomizado envolvendo 24 pacientes portadores de prótese total superior e sobredentadura inferior retida por dois implantes com sistemas de encaixe esférico RA (n= 12) ou cilíndrico Loc (n= 12). Amostras de biofilme foram coletadas de sete sítios para cada implante, nos períodos: após a instalação de novos encaixes (*baseline*), assim como aos 3 e 12 meses subsequentes. A identificação e quantificação das espécies microbianas foram realizadas por meio da técnica de hibridização *DNA-DNA Checkerboard*. Os resultados foram submetidos à análise não paramétrica de modelo misto “ANOVAF”, e matriz de covariância não estruturada para cada tratamento, com nível de significância de 0.05, posteriormente ajustado por “Benjamini-Hochberg” *false discovery rate* (FDR). Considerando-se todos os sítios e períodos investigados em conjunto e as 32 espécies bacterianas investigadas, apenas a *S. constellatus* foi encontrada em maior abundância nos biofilmes associados ao sistema RA. A análise sítio-específica revelou maior prevalência das espécies *S. constellatus* e *P. micra* na rosca do componente macho do encaixe esférico RA e da espécie *S. sanguinis* na superfície externa do componente macho do encaixe cilíndrico Loc. De modo geral, pôde-se concluir que os sistemas de encaixe para retenção de sobredentaduras RA e Loc são colonizados por microbiotas com perfis semelhantes, embora esses sistemas exerçam influência seletiva sobre o padrão de colonização das espécies bacterianas *S. constellatus*, *P. micra* e *S. sanguinis*.

Palavras-chave: DNA-checkerboard; contaminação bacteriana; encaixe de precisão; sobredentadura.

Abstract

Pinheiro, MLL. **Microbial contamination comparison of two attachment systems for implant retained mandibular overdentures - Randomized clinical trial.** [Dissertation].
Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2018.

ABSTRACT

The colonization and proliferation of periodontopathogenic microorganisms in the dental implants marginal gingiva, as well as around their prosthetic components, may represent risks to the health of the peri-implant tissues, similar to what occurs with the periodontal tissues. The objective of this study was to identify and quantify 32 microbial species of biofilms collected from the surfaces of two attachment systems for implant retained mandibular overdentures: one spherical (*Retentive Anchor*, *Institut Straumann AG*, Switzerland - RA) and one cylindrical (*Locator*, *Zest Anchors Inc.*, CA-USA - Loc), of prostheses, implants and peri-implant sulcus, over time. The biofilms analyzed were collected in a randomized study involving 24 patients with superior complete dentures and inferior overdenture retained by two implants with spherical attachment RA (n = 12) or cylindrical Loc (n = 12) systems. Biofilm samples were collected from seven sites of each implant, at the periods: after new attachments installation (baseline), as well at the next 3 and 12 months. The microbial species identification and quantification were carried out using DNA-DNA Checkerboard hybridization technique. The results were submitted to the mixed model non-parametric analysis "ANOVAF" and non-structured covariance matrix for each treatment, with 0.05 significance level, later adjusted by "Benjamini-Hochberg" false discovery rate (FDR). Considering all the sites and periods investigated together and the 32 bacterial species investigated, only *S. constellatus* was found in greater abundance in the biofilms associated to the RA system. The site-specific analysis revealed a higher prevalence of *S. constellatus* and *P. micra* species on the male component of the RA spherical attachment and of *S. sanguinis* species on the outer surface of the male component of the cylindrical Loc attachment. In general, it can be concluded that the overdenture attachment systems RA and Loc are colonized by microbiotas with similar profiles, although these systems exert a selective influence on the colonization pattern of *S. constellatus*, *P. micra* and *S. sanguinis* bacterial species.

Key-words: DNA- checkerboard; bacterial contamination; precision attachment; overdenture.

Lista de Figuras

A decorative wavy line that starts with a small upward curve, followed by a larger downward curve, and then levels out into a straight line extending to the right.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Sistema de retenção por encaixe de geometria esférica (Retentive Anchor, Institut Straumann®, AG, Suíça).....	81
Figura 2-	Sistema de encaixe de geometria cilíndrica (Locator, Zest Anchors Inc.®, CA USA).....	82
Figura 3-	Coleta das amostras no sulco peri-implantar: sítio “b”.....	83
Figura 4-	Coleta das amostras realizadas nos sítios “a”, “c”, “d”, “e”, “f” e “g”, com <i>microbrush</i>	84
Figura 5-	Armazenamento dos materiais coletados em microtubos <i>eppendorf</i>	85
Figura 6-	Esquema do teste realizado para calibração da detecção e quantificação de células bacterianas.....	87
Figura 7-	Resultado do teste para calibração do processo de quantificação de células bacterianas, registrado em filme radiográfico (HyperFilm).....	88
Figura 8-	Aplicação das amostras nas canaletas do <i>Minislot 30</i>	89
Figura 9-	<i>Miniblitter 45</i>	90
Figura 10-	Filme radiográfico com imagem formada após sua sensibilização por quimiluminescência.....	91
Figura 11-	Esquema do cruzamento entre as amostras e sondas de DNA dos micro-organismos avaliados no estudo pelo método DNA <i>Checkerboard</i>	92
Figura 12-	Posicionamento do filme radiográfico em negatoscópio.....	93
Figura 13-	Somatória dos escores medianos das 32 espécies microbianas presentes nos 7 sítios avaliados, nos três períodos experimentais, para os encaixes Loc e RA....	98
Figura 14-	Gráfico em colunas empilhadas das médias dos escores medianos para cada micro-organismo nos períodos experimentais <i>baseline</i> , 3 meses e 12 meses, para os sistemas de encaixe: Loc e RA.....	99
Figura 15-	Valores médios dos micro-organismos avaliados nos três períodos experimentais, agrupados segundo as cores de patogenicidade propostas por Socransky et al. (1998).....	103
Figura 16-	Valores médios dos escores microbianos de cada sítio avaliado nos três períodos experimentais.....	103

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Espécies microbianas-alvo.....	86
Tabela 2-	Média dos escores medianos das espécies bacterianas avaliadas nos períodos: <i>baseline</i> , 3 e 12 meses, coletados dos sistemas de encaixe Loc e RA.....	97
Tabela 3-	Escores medianos das 32 espécies microbianas presentes, nos 7 sítios investigados (“a”- “g”) para cada tipo de sistema de retenção por encaixe: Loc e RA.....	100
Tabela 4-	Escores medianos das 32 espécies microbianas selecionadas para o estudo nos 7 sítios avaliados em cada um dos três períodos experimentais.....	101
Tabela 5-	Medianas dos escores relacionados aos sítios “a”- componente macho do encaixe e “f”- componente fêmea do encaixe, nos três períodos experimentais e para cada um dos sistemas de encaixe testados. FDR: valores de “p” ajustados para comparações múltiplas pelo método “Benjamini-Hochberg” <i>false discovery rate</i> , após ANOVA F.....	102

Sumário

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	39
1.1 Justificativa	45
2. REVISÃO DA LITERATURA	47
2.1 Colonização bacteriana em desdentados totais	49
2.2 Colonização bacteriana de implante e doença peri-implantar	51
2.3 Colonização bacteriana em próteses totais:	57
2.4 Problemas inerentes às sobredentaduras:	59
2.5 Sistema de retenção por encaixe para sobredentadura:	60
2.6 Encaixes: Locator® (cilíndrico) e Retentive Anchor® (esférico)	64
2.7 Higienização dos encaixes	65
2.8 Adesão dos micro-organismos aos diferentes materiais utilizados em sistemas de encaixe	67
2.9 Infiltração bacteriana na interface implantes/componentes	69
3. PROPOSIÇÃO	75
4. MATERIAIS E MÉTODOS	79
5. RESULTADOS	95
6. DISCUSSÃO	105
7. CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS	121

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida nos países desenvolvidos e em desenvolvimento ao longo das últimas décadas reflete a elevação na proporção de idosos na população mundial. Junto ao envelhecimento populacional, o estado de saúde bucal dos idosos ganhou em importância com a expectativa de um aumento no número de indivíduos com necessidade de próteses totais em todo o mundo (MERSEL; BABAYOF; ROSIN, 2000; PETERSEN; YAMAMOTO, 2005).

A utilização de próteses totais por desdentados ainda exige procedimentos regulares de higiene da mucosa oral, assim como de suas dentaduras, necessários para a manutenção da saúde bucal e o sucesso do tratamento a longo prazo. Em geral, o conhecimento limitado dos pacientes em relação à necessidade de cuidados diários com a higienização das próteses e da cavidade oral denota falta de ênfase por profissionais da área às orientações fundamentais à manutenção do tratamento reabilitador (DIKBAS; KOKSAL; CALIKKOCAOGLU, 2006; PERACINI et al., 2010).

O biofilme é capaz de sofrer maturação, em diferentes complexidades, nas inúmeras superfícies da cavidade oral, atuando na dependência de fatores relacionados ao ambiente oral, de sua localização, e de fatores genéticos, mostrando-se únicos para cada indivíduo (PASTER et al., 2001; SACHDEO; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2008). O processo para se atingir a longevidade no tratamento protético envolve o conhecimento e o controle da microbiota associada às superfícies mucosas e protéticas, incluindo a identificação de micro-organismos associados a cada tipo de superfície (SACHDEO; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2008).

Aproximadamente 700 espécies bacterianas colonizam as superfícies da cavidade oral (PASTER et al., 2001). Destas, aproximadamente 500 podem ser detectadas no biofilme subgengival (MOORE; MOORE, 1994; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Diferenças acentuadas na composição microbiana podem ocorrer entre indivíduos, entre diferentes locais da cavidade oral de um mesmo indivíduo (ex.: dorso da língua e região supragengival) ou mesmo entre locais contíguos (ex.: duas bolsas periodontais). Assim, caracterizar a relação entre as espécies bacterianas é útil na compreensão dos fenômenos envolvidos na formação e manutenção do biofilme subgengival e no planejamento de estratégias para seu controle (SOCRANSKY et al., 1998).

Além de influenciado pela higienização, a composição do biofilme é também dependente de cofatores individuais que incluem hábito alimentar, genética, motilidade da língua e composição salivar (DEMLING et al., 2009). Espécies patogênicas periodontais foram detectadas em quantidades significativas por Sachdeo; Haffajee e Socransky (2008), até mesmo em indivíduos desdentados, contrariando estudos que sugerem que com a perda de todos os dentes, as bactérias anaeróbias estritas, associadas às superfícies duras e ao sulco periodontal, tendem a ser encontradas em pequenas quantidades (THEILADE; BUDTZ-JORGENSEN; THEILADE, 1983; ABDUL-KAREEM, 2012) ou mesmo desaparecerem da cavidade oral (DANSER et al., 1995). Além de prejudiciais à saúde bucal, estas espécies foram associadas à problemas locais e sistêmicos relevantes, como o desenvolvimento de estomatite protética (CAMPOS et al., 2008) e o risco de bacteremia (DRINNAN; GOGAN, 1990), doença cardiovascular (KINANE, 1998), pneumonia bacteriana (MERGRAN; CHOW, 1986) e na indução de parto prematuro (OFFENBACHER et al., 1998). Deste modo, portadores de prótese total podem estar sob riscos aumentados de doenças em virtude da presença de agentes patogênicos com potencial acesso à circulação sanguínea por traumas ou patologias da mucosa oral (LI et al. 2000), ou mesmo por sua aspiração (MERGRAN; CHOW, 1986).

A redução no custo, maior popularidade, e altos índices de sucesso com o uso de implantes dentários, têm facilitado o acesso da população à este tipo de tratamento. A associação de implantes e próteses totais tornou-se uma opção vantajosa devido ao aumento na retenção e estabilidade das próteses conferidos pelos implantes por meio dos sistemas de encaixe (KRENNMAIR et al., 2012). No entanto, o valor empregado na confecção de um tratamento com sobredentadura retida por dois implantes é maior do que para as próteses convencionais, embora a diferença é considerada válida diante do benefício que o tratamento proporciona. A literatura sugere que prótese total convencional não é mais o tratamento protético de primeira escolha e o mais apropriado, este tem seu lugar tomado gradativamente pelo tratamento com sobredentadura retida por dois implantes na reabilitação de mandíbulas desdentadas (FEINE et al., 2002).

Existem hoje no mercado, diversos sistemas pré-fabricados de encaixe. Estes são compostos basicamente por dois componentes, um macho, que permanece acoplado ao implante, justaposto por um torque aproximado de 30N, e o outro fêmea, componente incorporado à base da prótese. Juntos, promovem o encaixe da sobredentadura mandibular aos implantes, favorecendo a retenção e estabilidade do conjunto e proporcionando aos indivíduos desdentados melhor qualidade de vida e maior eficiência mastigatória que as dentaduras

convencionais (NAERT; ALSAADI E QUIRYNEN, 2004; HEYDECKE et al., 2005; TRAKAS et al., 2006; KRENNMAIR et al., 2012; MUMCU, BILHAN E GECKILI, 2012). Apesar das vantagens citadas deste tratamento, os componentes de encaixe utilizados na prótese e no implante, apresentam diferenças em sua morfologia e no material ao qual são fabricados (ligas metálicas, nylon). Ainda, o tipo de sistema de encaixe sofre de forma diferente a deformação superficial dos componentes ao longo do tempo, podendo também favorecer o surgimento de trincas na base da prótese (ELSYAD; ERRABTI E MUSTAFA, 2015). Estes fatores podem gerar diferentes graus em formações bacterianas ao longo de suas superfícies. Considerando o ambiente oral favorável, somado à deficiência na remoção mecânica do biofilme, evidencia-se um aumento na adesão e proliferação bacteriana, podendo também ocorrer modificações bacterianas qualitativas e quantitativas, com maior prevalência de patógenos periodontais, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (PAOLANTONIO et al., 1997; SACHDEO; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2008).

A longevidade do tratamento protético depende, em grande parte, do controle efetivo das infecções bacterianas na região peri-implantar, a fim de impedir a destruição dos tecidos de suporte que mantêm os implantes integrados ao osso. Estima-se que a taxa de insucesso por perda dos implantes, em um longo prazo de 10 anos, gira em torno de 3% (BUSER et al., 2012). Embora diversos fatores etiológicos possam estar associados à destruição precoce do tecido ósseo peri-implantar, aqueles que levam à perda tardia dos implantes são os menos compreendidos, mas estão provavelmente relacionados ao ambiente peri-implantar e a fatores singulares do hospedeiro. Assim sendo, discriminar as causas de falha no implante se faz importante para instituir uma terapia reabilitadora com maior chance de sucesso (TABANELLA, NOWZARI e SLOTS, 2009).

A colonização dos implantes por espécies bacterianas patogênicas periodontais, como *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, encontradas no complexo vermelho de Socransky, o de maior patogenicidade, está fortemente associada à presença de inflamação e destruição dos tecidos de suporte (SOCRANSKY et al., 1998). Espécies deste complexo são mais frequentes nos sítios com doença periodontal estabelecida mas podem também ser encontradas ao redor de implantes osseointegrados saudáveis. Neste caso, as espécies *Streptococcus intermedius*, *S. Oralis*, *S. Sanguinis*, *S. Gordonii*, *V. Parvula*, *F. Nucleatum* e *C. gingivalis* são predominantes (TABANELLA, NOWZARI; SLOTS, 2009).

A predominância de bactérias anaeróbias patogênicas, *T. forsythia*, *Fusobacterium* spp, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Parvimonas micra*, em sítios gengivais profundos podem acelerar a destruição tecidual na região (EDWARDSSON et al., 1999). Além disso, bolsas periodontais profundas e ativas colonizadas por essas bactérias podem agir como reservatórios para disseminação da infecção para sítios peri-implantares saudáveis (GOUVOUSSIS; SINDHUSAKE; YEUNG, 1997)

Com o objetivo de estudar as relações ecológicas entre as espécies bacterianas a partir de amostras de biofilme supra ou subgengival, a técnica de hibridização DNA-DNA Checkerboard, desenvolvida por Socransky et al. em 1994, revolucionou as análises por permitir rápida detecção de múltiplas espécies em um mesmo processamento (TANNER et al., 1997). Esta técnica é utilizada para determinar a similaridade entre sequências de DNA de origens diferentes e a quantidade de repetição da sequência em uma mesma amostra, constituindo-se em ferramenta útil para a enumeração de espécies bacterianas presentes em grande número de amostras em sistemas microbiologicamente complexos, mesmo aquelas não usuais e presentes em pequeno número (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Entretanto, uma das limitações desta técnica é a detecção apenas de espécies para as quais sondas de DNA puderam ser preparadas (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

A etiologia das patologias periodontais têm sido há algum tempo reconhecida na relação com o acúmulo bacteriano e composição do biofilme dental. Por possuir formação microbiana complexa (LI et al., 2004), e estando fortemente associada à etiologia das infecções peri-implantares, estudos profundos são necessários a fim de desvendar detalhes sobre o desenvolvimento e a composição da matriz do biofilme bacteriano aderido em torno das estruturas de titânio do implante e de seus componentes protéticos.

Ainda não há relatos esclarecedores a respeito da contaminação bacteriana dos diversas tipos de encaixes para sobredentaduras e da relação entre a composição da microbiota associada a estes componentes e a do sulco peri-implantar. Este estudo contribuirá com a caracterização do biofilme associado aos implantes dentários, às próteses suportadas por implantes e à dois sistemas de encaixe para sobredentaduras, incluindo espécies associadas à perda de implantes. Serão investigadas ainda, possíveis relações entre os biofilmes encontrados nesses sítios. Consequentemente, o estudo poderá auxiliar ainda no desenvolvimento de sistemas de encaixe menos susceptíveis ao acúmulo de biofilme e com maior facilidade de higienização pelos pacientes, além de contribuir com o desenvolvimento de medidas preventivas e o tratamento de problemas peri-implantares.

1.1 Justificativa

Evidências científicas atuais disponíveis na literatura sugerem que a restauração da mandíbula edêntula com prótese convencional não é mais o tratamento protético de primeira escolha ou o mais apropriado. Diversos estudos demonstram que uma sobredentadura retida por dois implantes deve se tornar a primeira escolha no tratamento para a mandíbulas desdentadas (FEINE et al., 2002; HEYDECKE et al., 2005; BILHAN et al., 2011; KRENNMAIR et al., 2012; MUMCU; BILHAN; GECKILI, 2012; KÜRKÇÜOĞLU et al., 2016). O custo total da confecção de sobredentaduras mandibulares retidas por dois implantes é, certamente, maior do que o de próteses totais convencionais. No entanto, em se tratando do benefício que proporciona, a diferença passa a ser secundária, particularmente no que se refere ao expressivo aumento na qualidade de vida das pessoas associado à este tipo de tratamento (NAERT; ALSAADI; QUIRYNEN, 2004; HEYDECKE et al., 2005; TRAKAS et al., 2006; KRENNMAIR et al., 2012; MUMCU; BILHAN; GECKILI, 2012). Apesar disto, estudos aprofundados sobre as próteses totais retidas/suportadas por implantes ainda são necessários para o esclarecimento de aspectos mecânicos e biológicos envolvidos nesta modalidade terapêutica reabilitadora cirúrgico-protética. Particularmente no âmbito microbiológico, diversos fenômenos permanecem incompreendidos.

A literatura, sobre a capacidade de infiltração microbiana entre os componentes dos implantes e das próteses, é enfática e conclusiva. Diversos autores comprovaram a capacidade de infiltração e contaminação bacteriana entre as áreas superficiais e componentes internos dos sistemas de implante e região peri-implantar (PERSSON et al., 1996; JANSEN et al., 1997; DO NASCIMENTO et al., 2008; DO NASCIMENTO et al., 2009; HARDER et al., 2010; COSYN et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2012; JERVØE-STORM et al., 2015; NASSAR; ABDALLA, 2015; DO NASCIMENTO et al., 2015; TALLARICO et al., 2017). Quando presente na conexão implante-pilar é um importante fator contribuinte para reações inflamatórias peri-implantares. Essas reações podem causar desconforto ao indivíduo, reabsorção óssea e até mesmo a perda do implante (TANNER et al., 1997; CARLSSON; LINDQUIST; JEMT, 2000; TABANELLA; NOWZARI; SLOTS, 2009; JERVØE-STORM et al., 2014). Este fenômeno patológico passa a ser ainda mais preocupante quando ocorre em locais ou condições que dificultem ou inviabilizem a higienização, como partes internas de implantes intraósseos e superfícies de conectores protéticos. Estes locais passam a abrigar espécies microbianas que sobrevivem na ausência de oxigênio, as anaeróbias facultativas ou estritas, frequentemente de alta virulência (PERSSON et al., 1996; DO NASCIMENTO et al.,

2009; COSYN et al., 2011; JERVØE-STORM et al., 2014; DO NASCIMENTO et al., 2015; TALLARICO et al., 2017). Desta forma, as superfícies dos implantes, componentes protéticos e próteses tornam-se reservatórios para estes micro-organismos, que passam a ter acesso facilitado aos tecidos adjacentes, dos quais depende a osseointegração dos implantes e, por consequência, o sucesso do tratamento (JERVØE-STORM et al., 2014; TALLARICO et al., 2017). Diante da redução imunológica do hospedeiro ou mesmo descuido dos hábitos de higienização, estes micro-organismos podem se disseminar e prevalecer na microbiota regional com maior facilidade, resultando na instalação de doença peri-implantar (EDWARDSSON et al., 1999; LI et al., 2000; HUTTNER et al., 2009; DE ARAÚJO NOBRE et al., 2015).

Ainda, o tratamento com sobredentadura retida por implantes é realizado em indivíduos que perderam todos os dentes de pelo menos uma das arcadas. Esses indivíduos são comumente idosos em condições fisiológicas com alguma redução da habilidade motora, essencial para a higienização, além de apresentarem um tecido epitelial fragilizado com menor capacidade regenerativa, o que predispõe a infecção bacteriana dos tecidos peri-implantares e coloca em risco o sucesso do tratamento (DE ROSSI; SLAUGHTER, 2007; HUTTNER et al., 2009).

Os diversos sistemas de retenção por encaixe para sobredentaduras retidas por implantes disponíveis no mercado odontológico, fabricados em diferentes materiais com variadas geometrias e superfícies, podem apresentar susceptibilidade variável à colonização microbiana e efeitos distintos sobre o ambiente bucal. A presença de fatores inerentes às condições de deterioração dos componentes dos encaixes e das próteses, tais como: deformação superficial, desgaste, trinca, fissura e porosidade, ao longo do tempo, precisam ser considerados, pois tendem a influenciar o acúmulo de biofilme (CORNELIUS et al., 2002; TEUGHELS et al., 2006; ELSYAD et al., 2015; KÜRKÇÜOĞLU et al., 2016).

Diante do exposto, a avaliação qualitativa e quantitativa da colonização microbiana dos implantes, próteses e componentes protéticos, ao longo do tempo, é essencial para a compreensão dos processos de adesão microbiana e maturação do biofilme sobre suas superfícies e pode contribuir com o desenvolvimento de métodos para a prevenção de patologias relacionadas ao tratamento protético sobre implantes. Estudos que contribuam com o esclarecimento desses fenômenos poderão ser utilizados também para auxiliar os clínicos da área odontológica na seleção de materiais e tipos de sistema de retenção por encaixes para sobredentaduras retidas por implantes com maiores chances de sucesso.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Colonização bacteriana em desdentados totais

O biofilme presente na superfície protética, quando em contato com a mucosa, representa um importante fator etiológico na patogênese da estomatite protética e hiperplasia papilar inflamatória, além de outras condições associadas (ABELSON, 1981). Procedimentos de higiene oral regulares e eficientes desempenham um papel importante na manutenção da saúde bucal e são fundamentais para o sucesso a longo prazo do tratamento protético removível. O acúmulo de biofilme na superfície da prótese pode provocar consequências indesejáveis na saúde bucal do indivíduo (DIKBAS; KOKSAL; CALIKKOCAOGLU, 2006). A quantidade considerável de biofilme encontrada em próteses totais removíveis é, frequentemente, o resultado da falta de instrução sobre a limpeza das próteses e falha dos pacientes em retornar às consultas periódicas de manutenção do tratamento reabilitador e em continuar usando os aparelhos contaminados (DIKBAS; KOKSAL; CALIKKOCAOGLU, 2006; PERACINI et al., 2010; MIRANZI et al., 2015).

Numerosas pesquisas demonstraram a relação direta entre a presença do biofilme na superfície protética, hábitos de higienização oral deficientes e a presença, em graus variados, de inflamação mucosa, além de outras condições mais graves, como o aumento nas taxas de prevalência de doença periodontal/peri-implantar, xerostomia e ao câncer bucal (ABELSON, 1981; MARCHINI et al., 2004; PETERSEN; YAMAMOTO, 2005; DIKBAS; KOKSAL; CALIKKOCAOGLU, 2006; BARAN; NALÇACI, 2009).

O impacto negativo das condições orais precárias, particularmente maior entre indivíduos desdentados totais, pode provocar danos significativos à saúde geral. A perda dos dentes reduz a eficiência de mastigação e também afeta a escolha dos alimentos. Indivíduos desdentados tendem a evitar o consumo de alimentos fibrosos, dando preferência àqueles com maior facilidade de trituração, fato que pode vir a afetar diretamente a saúde geral, já que os alimentos macios são geralmente ricos em carboidratos, gorduras saturadas e colesterol (MAKILA, 1969; MOYNIHAN et al., 2000; WALLS et al., 2000). Sabe-se que uma nutrição inadequada pode provocar hipovitaminose e afetar a saúde geral, debilitando o sistema imunológico, fator que pode provocar inflamação da mucosa e gerar maior desconforto ao uso de aparelhos protéticos (PAPAS et al., 1998; MOYNIHAN et al., 2000; MARSHALL et al., 2002), além de predispor a doenças infecciosas orais e até ao câncer bucal (JOSHUPURA; WILLET E DOUGLAS, 1996; KRALL; HAYES E GARCIA, 1998).

Com a finalidade de fornecer dados significativos que descrevessem as relações ecológicas microbianas na cavidade oral do paciente edêntulo, Sachdeo; Haffajee e Socransky (2008) avaliaram a microbiota salivar dos tecidos moles e das superfícies duras presentes (dentadura). Neste estudo, participaram sessenta e um pacientes desdentados totais, usuários de próteses totais em ambos os arcos. Amostras de biofilme “supra gengival” foram retirados de 28 dentes artificiais das próteses de cada paciente. Amostras de biofilme também foram coletadas das superfícies dorsal, lateral e ventral da língua, assoalho da boca, mucosa bucal, palato duro, vestibulo labial, gengiva inserida e saliva. As amostras foram analisadas individualmente pelo cruzamento de 41 espécies-alvo bacterianas por meio do método de hibridização *DNA Checkerboard*. A identificação e quantificação de cada espécie foi determinada para cada local da amostra. Os resultados revelaram que patógenos periodontais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* estavam presentes nas amostras dos indivíduos. Os perfis microbianos nas amostras das superfícies dos tecidos moles diferiram entre as localizações: as amostras do dorso da língua exibiram as contagens bacterianas mais elevadas seguidas pela gengiva inserida e as superfícies laterais da língua, enquanto as menores contagens foram encontradas em amostras da mucosa bucal e dos vestibulos labiais. Os autores concluíram que um dos principais achados neste estudo foi a detecção em quantidade significativa de patógenos periodontais, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, já que se pensava que estas espécies desapareceriam após a extração de todos os dentes naturais. Os perfis microbianos diferiram de acordo com as superfícies avaliadas. A microbiota dos dentes artificiais, das superfícies dorsal e laterais da língua e salivar foram semelhantes entre si, mas diferiram em relação às do tecido mole e da região palatina da dentadura. Ao comparar as contagens médias de bactérias entre as superfícies avaliadas, os maiores valores foram encontrados no dorso a língua, seguidos da superfície polida (exterior) palatina da dentadura, enquanto que os mais baixos foram encontrados na superfície do palato duro.

O estudo de Kulak-Ozkan; Kazazoglu e Arikan (2002), avaliou a influência dos hábitos de higiene bucal e limpeza das próteses sobre a presença de leveduras e, consequentemente, da ocorrência de estomatite protética na mucosa oral de idosos. Neste estudo, setenta usuários de prótese total foram investigados clínica e quanto à presença de fungos. Os indivíduos foram avaliados de acordo com a presença de estomatite protética, presença de leveduras, hábitos de higienização, frequência de escovação e métodos de limpeza da prótese. Para a investigação micológica, amostras foram retiradas do palato dos indivíduos as colônias de leveduras foram identificadas. De acordo com os resultados obtidos,

os autores não encontraram relação estatística entre a estomatite protética, a frequência de escovação e os métodos de limpeza oral e dos aparelhos protéticos. No entanto, houve uma relação estatisticamente significativa entre a estomatite protética, a presença de leveduras e o grau de limpeza das próteses.

A investigação da microbiota oral de pacientes edêntulos tem se tornado cada vez mais importante pela recente e extensiva utilização de implantes no tratamento do edentulismo. Considerando este quadro, Abdul-Kareem (2012) realizou um estudo com 28 pacientes desdentados recentes. Amostras de saliva foram coletadas para avaliação microbiológica em dois intervalos: antes do procedimento de moldagem de trabalho, para confecção do aparelho protético; e após um mês de uso das próteses totais. Os resultados indicaram que o número total de micro-organismos diminuiu no período pós-inserção sem variação significativa entre as espécies. A microbiota apresentou espécies de *Neisseria* que desapareceram após a inserção da prótese dentária, enquanto que *E. coli*, *Klebsiella* e *Moraxella* (*Branhamella*) foram observadas após um mês do uso protético. Houve redução de *Streptococcus* e *Cândida*. Por outro lado, *S. aureus*, *Diphtheroids*, *Veillonella* e *Acinetobacter* foram considerados como parte da microbiota normal do paciente edêntulo, sua presença não sofreu alteração com utilização de dentadura. Concluíram que não há aumento quantitativo e qualitativo significativo dos micro-organismos da cavidade oral após curtos períodos de utilização de próteses em pacientes com boa higienização bucal, embora suas superfícies possam servir como local para colonização de vários micro-organismos.

2.2 Colonização bacteriana de implante e doença peri-implantar

O estudo de Socransky et al. (1998), reportou a existência de espécies bacterianas sob a forma de complexos no biofilme subgingival dos dentes. Diante disto, os autores definiram grupos espécie-específicos usando dados de um grande número de amostras de biofilme e diferentes técnicas de agrupamento e ordenação. As amostras de biofilme subgingivais foram retiradas do sítio mesial de cada dente em 185 indivíduos (idade média 51 ± 16 anos) com periodontite (n=160) ou sem periodontite (n=25). A identificação e quantificação de 40 espécies-alvo subgingivais foram realizadas em 13.261 amostras de biofilme avaliadas pelo método de hibridação *DNA Checkerboard*. A cada visita, avaliações clínicas periodontais eram realizadas nos participantes do estudo. Cinco complexos principais foram consistentemente observados pelos autores. O primeiro complexo consistiu no grupo bem relacionado entre as espécies: *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e

Treponema denticola, denominado de complexo vermelho. O 2º complexo, também demonstrando boa relação entre as espécies, formou um grupo que incluiu: *Fusobacterium nucleatum*, *Periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Peptostreptococcus micra*, denominado de complexo laranja. As espécies associadas a este grupo laranja incluíram: *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracillis*. O 3º complexo consistiu em *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. intermedius*, chamado de complexo amarelo. O 4º complexo foi composto de 3 espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo a, denominado complexo verde. O 5º complexo consistiu em *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*, chamado de complexo roxo. *A. actinotnycetemcomitans* sorotipo b, *Selenomonas noxia* e *Actinomyces naeslundii* genoespecies 2 (*A. viscosus*) foram outliers, com pouca relação entre eles e com os 5 complexos principais. Enquanto as espécies dentro dos complexos mostraram-se intimamente associadas, os complexos pareciam ter relações específicas entre si. Os complexos descritos como amarelo, azul, verde e roxo foram relatados como constitutivos da base da pirâmide do biofilme: são os colonizadores iniciais da superfície dental e não se relacionam com a doença periodontal, sendo muitos deles foram considerados benéficos. Segundo os autores, esses complexos basais fornecem receptores e criam condições ecológicas para a implantação de bactérias do complexo laranja, relacionadas à patogênese das doenças periodontais. Este precede e cria condições para a implantação do complexo vermelho, considerado como agente etiológico da periodontite crônica e fortemente relacionado às medidas clínicas da doença periodontal, particularmente à profundidade de sondagem e ao sangramento gengival.

Diversas pesquisas avaliaram sítios periodontais e peri-implantares com a finalidade de relacionar a microbiota residente desses dois ambientes (GOUVOUSSIS; SINDHUSAKE e YEUNG, 1997; TANNER et al., 1997; LEE et al., 1999; FURST et al., 2007). Em função disto Ellen (1998), realizou um estudo com o objetivo de fornecer uma avaliação crítica da literatura a respeito da colonização microbiana e seu impacto na infecção peri-implantar e doença periodontal. Assim, considerando a colonização microbiana do ambiente peri-implantar e a sua relevância para a longevidade do tratamento com implantes, realizou uma revisão de literatura com a finalidade de compilar as informações até então disponíveis. As referências bibliográficas que proporcionaram avanços significativos ou novidades no assunto, foram incluídas nesta revisão. Os resultados apontaram a existência de muitas semelhanças entre as microbiotas peri-implantar e periodontal, tanto no estado de saúde como

de doença. Em pacientes parcialmente desdentados, as bolsas periodontais servem como reservatórios para a colonização dos tecidos peri-implantares por micro-organismos periodontopatogênicos. Tanto o modelo do implante quanto sua composição afetam a colonização de suas superfícies. As infecções em torno de implantes dentais podem ser tratadas por estratégias similares usadas para o tratamento da periodontite. Com base nisto, pesquisadores têm adotado projetos de pesquisa usados em periodontia para estudar a patogênese e o tratamento de infecções peri-implantares.

Segundo TANNER et al., (1997), a microbiota relacionada aos implantes é semelhante à dos dentes em diferentes condições clínicas. Os implantes que falham por causa do estresse mecânico são colonizados por espécies encontradas em dentes saudáveis. Os implantes infectados são colonizados por espécies subgengivais patogênicas, como: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter gracilis*, *Streptococcus intermedius* e *Peptostreptococcus micros*. Diferentes sítios e indivíduos podem ser colonizados por diferentes complexos microbianos. Diante disto, os autores concluíram que o tratamento deve ser direcionado à infecção específica.

Gouvoussis, Sindhusake e Yeung (1997) avaliaram a ocorrência de infecção cruzada entre sítios periodontais acometidos por doença para sítios associados à implantes dentários de uma mesma boca. Neste estudo, um total de 25 sítios de dentes e implantes de 9 participantes foram avaliados quanto à presença de micro-organismos periodontopatogênicos putativos utilizando o método de hibridização DNA *Checkerboard*, com sondas de DNA específicas para as espécies-alvo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema Denticola* e *Campylobacter recta*. Cada indivíduo teve entre 2 e 4 sítios orais amostrados, dos quais pelo menos um era de implante. Os resultados apontaram que 5 dos 9 pacientes apresentaram probabilidade de transmissão de micro-organismos de dentes para implantes. Esses pacientes apresentaram alto número de micro-organismos periodontopatogênicos putativos em dentes ou periodonto. Os autores observaram um risco significativo de transmissão de micro-organismos periodontopatogênicos putativos provenientes de sítios com periodontite para sítios associados à implantes de uma mesma boca. Sugeriram o desenvolvimento de um protocolo clínico apropriado para atendimento de indivíduos com doença periodontal com indicação para tratamento com implantes dentários.

Furst et al. (2007) avaliaram a colonização precoce de implantes de titânio imediatamente após sua implantação e durante as 12 primeiras semanas pós-cirúrgicas, e

compararam a microbiota de sítios subgengivais interproximais de dentes e implantes. Amostras de biofilme subgengival coletadas desses sítios foram avaliadas pelo método de hibridização *DNA checkerboard* antes da cirurgia (apenas região dentada), 30 minutos após a colocação do implante e 1, 2, 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia. Os resultados da comparação da carga microbiana nos locais de implante entre 30 minutos após a cirurgia de implantação com os dados de 1 semana mostraram que apenas os níveis de *Veillonella parvula* aumentaram ($p < 0.05$). A quantidade de bactérias associadas à sítios dentários na 12ª semana foi significativamente maior que no pré-cirúrgico para 15 das 40 espécies avaliadas (valores de p variando entre 0,05 e 0,01). Em comparação ao pós-cirúrgico imediato, 29 das 40 espécies avaliadas foram mais comumente encontradas após 12 semanas nos locais com implantes, incluindo *Porphyromonas gingivalis* ($p < 0.05$), *Tannerella forsythia* ($p < 0.01$) e *Treponema denticola* ($p < 0.001$). Imediatamente após a cirurgia, *Staphylococcus aureus* estava presente em 5,9% dos implantes e em 26,2% dos dentes. Já na semana 12, esta espécie foi encontrada em 15% dos implantes e 39,1% dos dentes. A concentração bacteriana foi significativamente maior em sítios dentários 30 min após a colocação dos implantes para 27 das 40 espécies avaliadas. Esta diferença aumentou para 35 das 40 espécies 12 semanas após a cirurgia. As conclusões dos autores foram as de que a colonização bacteriana ocorreu dentro de 30 minutos após a colocação do implante e que os padrões de colonização precoce diferiram entre o implante e as superfícies dos dentes.

Em se tratando dos problemas relacionados à perda do tratamento com implantes dentários, a falha dos tecidos do hospedeiro em estabelecer e manter a osseointegração pode ocorrer diante de alguns fatores, como: forças oclusais ou parafuncionais, carregamento prematuro, estresse mal dirigido ou infecção microbiana. A perda óssea precoce peri-implantar (período que compreende desde a colocação do implante até a aplicação de carga) várias etiologias têm sido propostas, os fatores associados às falhas nos implantes não estão definidos, mas provavelmente estão relacionados ao ambiente microbiano peri-implantar e aos fatores relacionados ao hospedeiro. Discriminar as causas da falha do implante é importante para a instituição de uma terapia implantar bem-sucedida (TABANELLA, NOWZARI e SLOTS, 2009).

Berglundh; Persson e Klinge (2002), em revisão de literatura sistemática, procuraram compilar as informações que dizem respeito aos incidentes biológicos e mecânicos que podem acometer os implantes dentários dentro de um período de pelo menos 5 anos. Observaram que dentre os 51 estudos relacionados, submetidos à meta análise, cerca de 2,5 % dos implantes são perdidos antes do seu carregamento funcional, quando os cuidados da terapia e os

procedimentos de rotina são respeitados, com a exceção de implantação unitária realizada em conjunto com procedimentos de estimulação óssea, que apresentam maiores taxas insucesso. Quando colocados em função, as reabilitações com sobredentaduras possuem uma taxa de perda maior que 5% enquanto as reabilitações fixas apresentam taxas de 2-3%. Além disso, foi relatada uma maior incidência de complicações dos tecidos moles para pacientes tratados com sobredentaduras retidas por implantes, e maior frequência de perda de implantes maxilares funcionais. Entretanto, os autores reportaram ainda a limitação de informações sobre peri-implantites e sobre o registro de implantes com perda óssea acentuada, o que gera dados maquiados no que diz respeito às taxas de sucesso do tratamento. Um dos problemas encontrados foi o uso indiscriminado do termo “perda do implante” para a caracterização de insucesso pelos autores, sem identificação do motivo da perda.

Complicações mecânicas se referem à danos dos componentes protéticos ou de suas supraestruturas, em virtude de sobrecargas e falhas no planejamento e direcionamento das forças funcionais. Já as complicações biológicas são caracterizadas como distúrbios na função do implante por processos biológicos que afetam os tecidos que o suportam. A perda implantar é então classificada como complicação biológica, que pode ser subdividida em inicial ou tardia. Por outro lado, a detecção de reações peri-implantares, que podem envolver tecidos duros e moles, requer exames clínicos e radiográficos adequados. (ROSENBERG; TOROSIAN e SLOTS, 1991).

A longevidade do tratamento com implantes osseointegrados depende, em grande parte, do controle da infecção bacteriana na região peri-implantar. No intuito de desvendar as causas das falhas biológicas associadas à esses implantes, diversos pesquisadores investigaram os fatores que levam às inflamações em torno dos implantes, as peri-implantites. (MOMBELLI; MERICSKE- STERN, 1990; MOMBELLI; LANG, 1994; LEE et al., 1999; TABANELLA; NOWZARI E SLOTS, 2009; MOMBELLI; DE´CAILLET, 2011).

Em 1990, Mombelli e Mericske-Stern publicaram um estudo sobre a microbiota associada a implantes osseointegrados usados em próteses do tipo sobredentadura em 18 pacientes edêntulos, após 2 anos da colocação dos implantes. Encontraram 52,8% de cocos anaeróbicos facultativos, 17,4% de bastonetes anaeróbicos facultativos, enquanto que os bastonetes anaeróbicos Gram-negativos representaram apenas 7,3%. *Fusobacterium sp.* e *Bacteroides intermedius* foram encontrados em 8,8% das amostras, enquanto *B. gingivalis* e espiroquetas não foram encontradas. Os dados microbiológicos e clínicos foram obtidos de 9 pacientes no 3º, 4º e 5º anos após a implantação. Não foram observadas diferenças significativas entre os períodos ou sítios investigados considerando as condições do estudo.

Mombelli e Lang (1994), em revisão da literatura reuniram informações sobre estudos relacionados à micro-organismos envolvidos na saúde e doença dos tecidos peri-implantares e às espécies associadas à implantes dentários mais frequentes e populosas. Nesta revisão os autores puderam concluir que existe uma clara distinção entre a microbiota de implantes clinicamente estáveis e aqueles com patologia peri-implantar instalada. A predominância bacteriana com características anaeróbicas, não é correspondente à flora fisiológica de sítios implantares saudáveis, e que a presença de espiroquetas pode ser indicadora de uma microbiota anaeróbica e patogênica. Os estudos são enfáticos em afirmar que vários fatores podem influenciar a saúde dos tecidos moles em torno dos implantes, particularmente durante a fase cicatricial inicial. Outros estudos indicaram a existência de diferentes formas de doença peri-implantar, incluindo infecções específicas e falhas não associadas à microorganismos (ROSENBERG, TOROSIAN e SLOTS, 1991), ressaltando a importância de testes microbiológicos como ferramentas valiosas para o diagnóstico diferencial de problemas com implantes osseointegrados.

Lee et al. (1999), realizaram um estudo com o objetivo de determinar se o tipo do implante, o tempo transcorrido até a aplicação de carga funcional, a presença de restaurações protéticas unitárias ou múltipla, e a história prévia de doença periodontal ou de peri-implantite teriam influência na microbiota peri-implantar. Quarenta e três pacientes parcialmente desdentados, apresentando implantes dentários osseointegrados participaram deste estudo. Amostras de biofilme foram coletadas de sítios peri-implantares e subgengivais e avaliadas microbiologicamente por meio do método de hibridização DNA *Checkerboard*, com cruzamento com 23 espécies-alvo subgengivais. Os resultados demonstraram colonização principalmente pelas espécies: *Streptococci* orais, *Capnocytophagae*, *Veillonella parvula*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum*. Alguns sítios apresentaram as espécies periodontopatogênicas: *P. gingivallis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *C. rectus*. A microbiota apresentou-se similar, tanto em torno dos implantes, quanto em dentes com prótese fixa unitária. Os autores concluíram que enquanto a presença de prótese fixa unitária possuía pouco impacto na microbiota peri-implantar, modificações microbianas puderam ser observadas ao longo do tempo e em pacientes que apresentavam história prévia de doença periodontal ou peri-implantar. No entanto, a maior influência na microbiota peri-implantar foi dada pela microbiota presente nos dentes remanescentes. *P. gingivalis* e *B. forsythus*, espécies periodontopatogênicas do complexo vermelho de Socransky (1998), estiveram presentes na colonização de vários implantes, embora todos apresentassem osseointegração considerada bem-sucedida.

Tabanella; Nowzari e Slots (2009), procuraram identificar as características clínicas, radiográficas e a microbiota dos locais com doença peri-implantar instalada. Neste estudo, implantes dentários de 15 pacientes foram avaliados com radiografias periapicais. O diagnóstico radiográfico de peri-implantite foi caracterizado pela perda óssea além da terceira rosca do implante, enquanto os tecidos peri-implantares foram considerados saudáveis quando havia osso acima da primeira rosca do implante. A identificação microbiológica foi realizada utilizando técnicas de cultura anaeróbica convencional. Os autores observaram que a perda óssea peri-implantar estava associada à ausência da lâmina dura, profundidade de sondagem, dor na mastigação e presença de bactérias periodontopatógenas putativas, tais como *Tannerella forsythia*, *Campylobacter sp.* e *Peptostreptococcus micros*. A dor foi associada à *P. micros*, *Fusobacterium sp.* e *Eubacterium sp.* Concluíram que a ausência radiográfica da lâmina dura e a presença dos principais patógenos periodontais no local parecem estar associados à peri-implantite.

Mombelli e De´caillet (2011), realizaram uma revisão da literatura sobre o biofilme presente na doença peri-implantar. Identificaram 29 artigos descrevendo indivíduos com "doença peri-implantar" e contendo dados microbiológicos de amostras coletadas dos locais afetados. Os que as amostras associadas às doenças peri-implantares apresentam misturas de bactérias de locais não específicos. As análises de tais amostras, por métodos variados, indicaram que a doença peri-implantar pode ser vista como uma infecção anaeróbica mista, sendo que na maioria dos casos a composição da microbiota foi semelhante à microbiota subgingival da periodontite crônica, com predomínio de bactérias Gram-negativas. Com base nisso, concluíram que as infecções peri-implantares podem, ocasionalmente, ser ligadas a uma microbiota com alto número de peptostreptococos ou estafilococos.

2.3 Colonização bacteriana em próteses totais:

O biofilme presente na superfície interna de próteses totais superiores em indivíduos com a mucosa palatina saudável foi estudado por Theilade; Budtz-Jorgensen e Theilade (1983). Os achados do estudo revelaram uma microbiota predominante composta por bactérias Gram-positivas. Dentre as bactérias Gram-negativas presentes, apenas a *Veillonella parvula* foi comum. Os resultados evidenciaram ainda, que a microbiota do biofilme de bases acrílicas de próteses associadas à tecidos subjacentes saudáveis é altamente variável e similar ao biofilme dental.

Danser et al. (1995) avaliaram a prevalência de patógenos periodontais putativos colonizando a mucosa oral de 26 indivíduos portadores de prótese total, com história prévia de periodontite. A microbiota da cavidade oral foi examinada 9,3 anos após as extrações dentárias, em média. As amostras foram retiradas de vários sítios da mucosa oral, da saliva e do biofilme aderido às superfícies protéticas. Os resultados mostraram que o micro-organismo *A. actinomycetemcomitans* não foi detectado em nenhum dos 26 indivíduos. *Porphyromonas gingivalis* foi detectada apenas em 2 indivíduos, com a proporção da microbiota cultivável de 0,002% e 12,5%. *Prevotella intermedia* foi encontrada em 7 indivíduos com uma proporção de 0,5%. A análise mostrou que os indivíduos que possuíam *P. intermedia* estavam usando próteses totais por um período de tempo mais longo (média de 20,2 anos) do que em indivíduos em que a *P. intermedia* não pôde ser detectada (média de 6,6 anos). Este resultado sugere que a ausência de *P. intermedia* logo após a extração pode ser reflexo apenas de um evento temporário. Outras espécies de *Prevotella* foram encontradas em 22 indivíduos, constituindo menos de 2% da microbiota cultivável total. Os autores concluíram que a cavidade oral desses indivíduos edêntulos portadores de próteses totais, com baixa prevalência de *P. gingivalis* e a ausência de *A. Actinomycetemcomitans*, representa um habitat não viável para essas espécies. O habitat considerado preferencial da *Prevotella spp.*, com exceção de *P. Intermedia*, foi a mucosa oral.

Uma lesão bastante comum que afeta os usuários de reabilitações protéticas é a estomatite protética. A sua etiologia multifatorial parece depender de um biofilme complexo e pouco caracterizado. Com o objetivo de avaliar a composição do biofilme microbiano de usuários de próteses totais com e sem estomatite protética, Campos et al. (2008) utilizaram o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Um total de 20 indivíduos saudáveis usuários de prótese total (n=10) e de usuários de prótese total com estomatite protética generalizada (n=10) participaram desse estudo, no qual foram realizadas coletas de amostras de biofilme das regiões palatinas da mucosa e da parte correspondente interna da prótese. As sequências parciais de rDNA 16S revelaram um total de 82 espécies bacterianas identificadas ao todo. Destas, 27 espécies bacterianas foram detectadas em ambos os biofilmes, 29 espécies estavam exclusivamente presentes em pacientes com estomatite protética e 26 foram encontradas apenas em indivíduos saudáveis. Ambos os biofilmes apresentaram *Candida sp.* Os resultados deste estudo revelaram a extensão da microbiota de portadores de próteses totais e sugeriram a existência de biofilmes distintos em indivíduos saudáveis ou com estomatite protética.

2.4 Problemas inerentes às sobredentaduras:

Hiperplasias e mucosites foram as reações de tecidos moles mais observadas em pacientes desdentados com sobredentaduras retidas por implantes e sistemas de encaixes (THEILADE; BUDTZ-JORGENSEN; THEILADE, 1983; NAERT; GIZANI; STEENBERGHE, 1998). A hiperplasia foi mais comumente observada em torno da região dos implantes, enquanto que a mucosite foi mais frequente em outras regiões da área chapeável. Naert, Gizani e Steenberghe (1998) relataram que mesmo com a orientação, por parte dos profissionais aos pacientes, de remoção das próteses dentárias durante a noite, apenas cerca de metade deles cumprem. Quando essas reações teciduais ocorrem, a melhoria das medidas de higienização, orientações sobre o uso das próteses, o ajuste das dentaduras, juntamente à remoção cirúrgica do tecido hiperplásico são capazes de resolver problema.

A fratura da base da sobredentadura retida por implantes é um problema de longa data e de ocorrência clínica comum na prática odontológica. Esta fratura tende a ocorrer na porção anterior, região onde existe concentração de estresse, usualmente na área do implante, devido à espessura inadequada do acrílico em torno dos encaixes. Em geral, ocorre inicialmente a formação de trincas e fissuras, as quais se propagam para áreas de alta concentração de tensão resultando em fratura da sobredentadura (ELSYAD; ERRABTI E MUSTAFA, 2015).

Elsyad, Errabti e Mustafa (2015), realizaram um estudo *in vitro* para avaliar e comparar a deformação da base da de sobredentaduras mandibulares retidas por implantes e sistemas de retenção por encaixe do tipo bola ou Locator® (TioLogic, Dentaurem®, Ispringen, Germany). Construíram um modelo experimental de acrílico coberto com silicone resiliente para simulação da mucosa e colocaram dois implantes nas regiões correspondentes às áreas dos caninos. Duas sobredentaduras experimentais foram construídas, duplicadas e conectadas aos sistemas de retenção por encaixe do tipo bola (GI) ou Locator® (GII). Para medir a tensão da sobredentadura em torno dos encaixes, medidores de tensão (*strain gauges*) foram anexados à superfície lingual das sobredentaduras. Os autores concluíram neste estudo que os sistemas de retenção por encaixe do tipo bola para sobredentaduras retidas por implantes foram associados à deformação significativa da base da sobredentadura mandibular retida por implantes em comparação com encaixes do tipo Locator®. Portanto, o reforço da base da dentadura pode ser recomendado com encaixe do tipo bola para aumentar a resistência à fratura da base.

2.5 Sistema de retenção por encaixe para sobredentadura:

As sobredentaduras mandibulares suportadas por dois implantes com sistema de retenção por encaixes favorecem, em geral, a preservação dos implantes e das condições clínicas e radiográficas compatíveis ao estado de saúde dos tecidos orais. Entretanto, este tipo de tratamento pode exigir manutenção intensiva e estar associado à redução da satisfação do paciente ao longo do tempo. Além disso, alguns sistemas de encaixe estão relacionados à maiores níveis de insatisfação por parte dos pacientes. (CEPA et al., 2016).

Dois fatores são considerados importantes para o usuário de sobredentaduras retidas por implantes: a facilidade de higienização do conjunto e a satisfação no tratamento. Ao mesmo tempo em que as pesquisas a respeito da facilidade de limpeza dessas sobredentaduras são escassas (AMBARD et al. 2002), apenas alguns estudos compararam a satisfação dos pacientes tratados com sobredentaduras retidas por implantes entre diferentes sistemas de retenção. (NAERT; GIZANI e STEENBERGHE, 1998; AMBARD et al., 2002; FEINE et al., 2002; BILHAN et al., 2011; CORDARO et al., 2012; KRENNMAIR et al., 2012, MUMCU; BILHAN e GECKILI, 2012; CEPA et al., 2016).

Kleis et al. (2010) realizaram uma comparação do sistema Locator® (*Zest Anchors, Inc., Escondido, CA, EUA*) com dois outros sistemas de retenção esféricos tradicionais para sobredentaduras retidas por implantes, o *Dal-Ro®*, com componente de matriz de ouro rotacional, e o *TG-O-Ring®*, com anel de borracha. Neste estudo clínico, 60 pacientes receberam implantes mandibulares e tratamento com sobredentaduras, randomizados para os três sistemas de retenção. Vinte e três pacientes receberam o Locator® e 33 pacientes um dos sistemas esféricos: *Dal-Ro®* (*BIOMET 3i Implant Innovations*; n = 25) e *TG-O-Ring®* (*Cendres e Metaux SA, Biel-Bienne, Suíça*; n = 8). Após 12 meses da entrega das sobredentaduras, foram avaliadas: a manutenção protética, complicações biológicas, experiências subjetivas dos pacientes com o tratamento, e a qualidade de vida relacionada à saúde bucal (instrumento para avaliação do impacto da Saúde Oral na qualidade de vida das pessoas: OHIP-G49). Os resultados demonstraram que após um ano, 8 de 120 implantes foram perdidos (9,6%); o sistema *Locator®* apresentou 34 complicações protéticas, especialmente a necessidade de mudança das partes macho ou ativação por causa da perda de retenção. Os pacientes com *TG-O-Ring®* apresentaram 14 complicações, a maioria delas relativas à alteração dos *O-Rings®*. Os pacientes com o sistema *Dal-Ro®* tiveram 7 complicações menores em 12 meses de uso clínico. As complicações biológicas e a qualidade de vida relacionada à saúde bucal dos pacientes não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos experimentais. Os autores concluíram que a manutenção das próteses se

restringiu aos problemas com a retenção que ocorreram com todos os sistemas, e que dentro do período de observação deste estudo, o sistema de retenção *Locator*® mostrou uma maior necessidade de manutenção do que os sistemas esféricos. Concluíram ainda que não há evidências de um sistema de retenção notório, sua escolha deve ser orientada pela situação clínica e as necessidades individuais dos pacientes.

Bilhan et al. (2011) avaliaram a qualidade de vida relacionada à saúde bucal (OHRQL) de indivíduos edêntulos portadores de sobredentaduras com sistemas de retenção por encaixe do tipo *Locator*® (*Locator*, Astra Tech AB®) ou bola (*Ball Abutments*, Astra Tech AB®). Neste estudo do tipo *crossover* e randomizado, 25 indivíduos receberam dois implantes mandibulares e foram divididos em dois grupos, cada um tendo um dos dois sistemas de encaixe a serem testados instalados em suas próteses. Após 3 meses, os sistemas de encaixe foram trocados. O OHRQL foi avaliado para ambos os tratamentos usando a forma mais curta do questionário do perfil de impacto de saúde oral (OHIP-14), que investiga fatores relacionados à limitação funcional, dor física, desconforto psicológico, deficiência física, deficiência psicológica, deficiência social e dificuldades apresentadas pelo tratamento. Uma subanálise dos indivíduos com espaço protético para colocação do encaixe abaixo da média também foi realizada. Os *scores* no quesito deficiência física do OHIP-14 foram significativamente melhores para o encaixe *Locator*® ($p = 0.049$, Wilcoxon). Entre os indivíduos com espaço protético abaixo da média, os itens limitação funcional, desconforto psicológico, deficiência física, deficiência psicológica e resultados totais de OHIP-14, foram significativamente melhores para o encaixe do tipo *Locator*® ($p = 0.041$, $p = 0.047$, $p = 0.048$, $p = 0.026$ e $p = 0.005$, respectivamente). O sistema de retenção por encaixe do tipo *Locator*® para sobredentaduras mandibulares retidas por 2 implantes foi considerado igual ou superior ao encaixe tradicional do tipo bola em todos os quesitos do OHIP-14. Os autores puderam concluir, dentro das limitações do estudo, que o sistema de retenção por encaixe do tipo *Locator*® é comparável ao do tipo bola quanto ao OHRQL, porém pode ser superior nos casos de indivíduos com espaço protético reduzido.

O estudo de KRENNMAIR et al. (2012), visou determinar a satisfação e a preferência do tratamento com dentaduras mandibulares sobre implantes (IOD) retidas por sistemas de retenção por encaixes do tipo bola ou *Locator*®. A pesquisa avaliou ainda as condições peri-implantares e as necessidades de manutenção protética para cada sistema após 1 ano em função. Nesse estudo clínico *crossover*, 20 pacientes desdentados totais foram recrutados para receber dois implantes mandibulares na região canina, sobredentaduras

mandibulares retidas por implantes, e novas próteses totais maxilares. Os dois sistemas de retenção foram instalados em ordem aleatória e, após 3 meses em função, substituídos pelo outro tipo. Questionários sobre satisfação/queixas com as próteses foram administrados no período inicial (próteses totais convencionais antigas) e após 3 meses com cada sistema de encaixe em função. Após esse período, o sistema de retenção preferido pelo paciente foi instalado na prótese. A partir desse ponto, as condições peri-implantares (reabsorção óssea marginal peri-implantar, profundidade de sondagem e índice de biofilme, índice gengival e índice de sangramento), bem como as necessidades de manutenção protética e o escores de satisfação foram avaliados após um período de inserção de 1 ano. Os resultados revelaram que 19 (95%) pacientes completaram o estudo (1 desistência); a satisfação do paciente melhorou significativamente ($p < 0,05$) com a instalação de novas próteses retidas com cada um dos dois tipos de sistema de retenção por encaixe para todos os quesitos de satisfação. No entanto, não houve diferenças significativas entre os encaixes do tipo bola ou Locator® para quaisquer itens de satisfação avaliados e nenhum dos sistemas de encaixe foi particularmente preferido pelos pacientes. Não foram observadas diferenças nos parâmetros peri-implantares ou na satisfação do paciente com os sistemas de encaixe escolhidos (bola, $n = 10$; Locator®, $n = 9$) após 1 ano. Embora o número de ocorrências de manutenções protéticas não tenha permitido a comparação estatística entre as duas modalidades de sistema de encaixe, o Locator® exigiu manutenção mais frequente para ativação da retenção do que o sistema do tipo bola.

Os estudos de Ambard et al. (2002) e Krennmair et al. (2012) demonstraram que não há diferenças nos parâmetros relacionados à tecidos moles (índice de placa e índice de sangramento) entre os diferentes sistemas de retenção por encaixe, sejam entre encaixes individuais e unidos por barra, ou sejam entre os tipos individuais esférico e cilíndrico (Locator®), sugerindo que os tipos investigados permitem cuidados de limpeza adequados pelos usuários, resultando em índices de higienização aceitáveis.

Mumcu Bilhan e Geckili (2012) compararam a qualidade de vida e a satisfação de pacientes com dois tipos de sistema de retenção por encaixe para sobredentaduras mandibulares suportadas por diferentes números de implantes. Sessenta e dois pacientes edêntulos, usuários de sobredentadura com sistema de retenção por encaixe do tipo barra ou individual (Locator® ou esférico/bola), suportadas por dois, três ou quatro implantes mandibulares, foram avaliados neste estudo. Os participantes foram divididos em cinco grupos: dois grupos foram formados pelos indivíduos com dois implantes com sistema de retenção por encaixe individual ($n = 14$, cada), sendo um do tipo Locator® e outro do tipo esférico; um grupo composto por usuários de três implantes com sistema de retenção por

encaixe individual do tipo esférico ($n = 12$) e outros dois grupos por implantes unidos por barra ($n = 11$, cada), sendo um com três e outro com quatro implantes. O questionário de satisfação, baseado em escala analógica visual (VAS) de 100mm incluiu 7 quesitos: conforto geral, retenção, mastigação, fala, manutenção de higienização, estética e dor. O questionário utilizado para avaliação da qualidade de vida foi o perfil de impacto em saúde oral (OHIP-14) que investiga fatores relacionados à limitação funcional, dor física, desconforto psicológico, deficiência física, deficiência psicológica, deficiência social e dificuldades apresentadas pelo tratamento. Os autores não encontraram associações entre os escores VAS e o tipo de sistema de retenção por encaixe utilizado, levando em conta o número de implantes. No OHIP-14 as pontuações totais para pacientes com barras retidas por 4 implantes foram significativamente menores do que todos os outros tipos de sistema de retenção por encaixe. Concluíram que uma sobredentadura mandibular suportada por quatro implantes com sistema de retenção por encaixe com barra está associada ao maior índice de "qualidade de vida" de pacientes com sobredentaduras mandibulares, enquanto que a satisfação desses pacientes não é influenciada pelo número de implantes ou tipo de sistema de retenção por encaixe.

Cepa et al. (2016) verificaram que as vantagens dos sistemas de retenção por encaixes individuais pré-fabricados, em comparação aos sistemas do tipo barra, são atribuídas a sua maior facilidade de higienização e à relação custo-benefício, derivada da redução dos procedimentos clínicos e laboratoriais.

Cordaro et al. (2012) realizaram um estudo para avaliar o desempenho clínico e a satisfação de pacientes e profissionais com dois sistemas de retenção para sobredentaduras retidas por implantes na mandíbula. Neste estudo retrospectivo, participaram pacientes com quatro implantes interforaminais com pelo menos 12 meses de acompanhamento, desde a entrega da prótese. Um total de 39 pacientes foram tratados com o sistema de retenção Locator® ($n = 19$) ou com barra usinada por sistema CAD-CAM ($n = 20$). Foram avaliados parâmetros clínicos peri-implantares, como: profundidade de sondagem (PPD), índice de placa (PI) e sangramento à sondagem (BOP). As percepções dos pacientes e dos clínicos sobre os resultados foram avaliadas com o uso de questionários e escalas analógicas visuais (VAS). Os resultados indicaram que o grupo Locator® apresentou valores PPD, PI e BOP mais favoráveis que o grupo que recebeu o sistema com barra. A satisfação dos pacientes foi elevada em ambos os grupos, enquanto os profissionais apontaram melhores condições de higienização e saúde dos tecidos moles para o grupo Locator®. Esses profissionais observaram ainda, que a dificuldade de higienização com o sistema do tipo barra pode aumentar a frequência de inflamações crônicas em torno dos implantes.

2.6 Encaixes: Locator® (cilíndrico) e Retentive Anchor® (esférico)

As próteses totais sobre implantes podem ser retidas por uma variedade de sistemas de retenção, tais como barras, cilindros, bolas e ímãs. Independentemente do seu tipo, o sistema de retenção apresentará necessidade de manutenção, que exige tempo e é dispendiosa para o paciente (MACKIE et al., 2011; KRENNMAIR et al., 2012; VERE et al., 2012;).

Apesar do sistema de retenção por encaixe de configuração cilíndrica (Locator, Zest Anchors Inc®, CA-USA) se encontrar disponível no mercado desde o ano 2000, poucos trabalhos estudaram as necessidades de manutenção deste sistema (MACKIE et al., 2011; VERE et al., 2012). O Locator® se tornou popular por apresentar dupla retenção (interna e externa) com resiliência variável, ser auto-alinhável, possuir altura reduzida, e estar disponível em diferentes cores, de acordo com os diferentes valores de retenção (TRAKAS et al. 2006). São formados por uma parte protética, componente fêmea, composta por nylon resiliente com 4,7 mm de diâmetro, que fornece encaixe para o componente do implante, composto por uma liga de titânio de 4,0 mm de diâmetro (MACKIE et al. 2011).

Vere et al. (2012) investigaram a necessidade de manutenção protética de pacientes reabilitados com sobredentaduras retidas por implantes usando o sistema de retenção Locator®. A revisão de casos foi realizada para 50 pacientes que tiveram 112 visitas de retorno não planejadas ao longo de um período de 3 anos. Os motivos mais comuns para o retorno foram ajustes da prótese (n = 45), retenção inadequada (n = 39) e afrouxamento dos pilares do implante (n = 14). Os autores concluíram neste estudo que as sobredentaduras retidas por implantes usando o sistema de retenção Locator® possuíam requisitos de manutenção semelhantes aos de outros sistemas, em geral com problemas de resolução simples no consultório.

O sistema de retenção por encaixe do tipo esférico (Retentive Anchor, Straumann®), é produzido com matriz protética em de liga de ouro do tipo *Dalla Bona*, que se prende ao componente do implante, composto de uma esfera em liga de titânio de 2,25 mm de diâmetro (MACKIE et al. 2011).

Mackie et al. (2011) perceberam que as matrizes de ouro do componente protético do sistema de retenção por encaixe esférico (Retentive Anchor, Straumann® AG, Suíça) apresentaram necessidades periódicas de ativação da retenção, mas sua manutenção era facilmente realizada. Os autores descobriram ainda, que a matriz de nylon do sistema de retenção Locator® (Zest Anchors®) perde frequentemente sua retenção, mas poder ser facilmente substituída numa sessão clínica breve. O "fator de incômodo" deste sistema é o acúmulo de biofilme e detritos alimentares no interior e nas superfícies retentivas dos

componentes. Este fato, pode impedir o assentamento completo da sobredentadura e foi identificado e relatado como um problema significativo para pacientes idosos com destreza manual limitada. O estudo reporta ainda, que a taxa de sucesso do tratamento com o sistema de retenção cilíndrico Locator® foi de 90% e com o Retentive Anchor® 75%.

2.7 Higienização dos encaixes

Além da resposta do hospedeiro e de outros fatores individuais, a diversidade microbiana do biofilme peri-implantar parece ser influenciada por cofatores, como a dificuldade de higienização das infraestruturas suportadas pelos implantes e características dos locais que podem abrigar o biofilme (DEMLING et al. 2009; HEUER et al. 2013).

A associação de métodos mecânicos e químicos para a remoção de biofilme é, em geral, mais eficiente do que o uso de métodos isolados. Keltjens; Schaeken e Van Der Hoeven (1987), estudaram os efeitos de uma solução de fluoreto e clorexidina para inibir ou prevenir a colonização bacteriana em pacientes tratados com sobredentaduras. Trinta e quatro pacientes com próteses retidas por raízes dentárias foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, que receberam diferentes géis para aplicação diária contendo: flúor, clorexidina-fluoreto, ou agente placebo. Amostras de biofilme supragengival de duas raízes pilares foram realizadas uma semana, um, 3 e 6 meses após a entrega da sobredentadura. Os grupos placebo e gel de fluoreto não influenciaram a contagem total de micro-organismos, nem especificamente *S. sanguinis* e *A. viscosus/ naeslundii*. Apenas no grupo placebo, os níveis de *S. mutans* aumentaram significativamente. O uso de gel de clorexidina-fluoreto resultou em uma supressão da contagem total de micro-organismos em longo prazo. Além disso, *S. mutans* foi seletivamente suprimido; *A. viscosus/ naeslundii* foram inicialmente fortemente suprimidos, mas após 3 meses observou-se um retorno parcial da população. *S. sanguinis* foi relativamente insensível ao gel de clorexidina-fluoreto. Os autores concluíram que uma aplicação diária de um gel de clorexidina-fluoreto é eficaz contra a formação do biofilme e a colonização dos pilares das sobredentaduras por *S. mutans*.

Em pacientes tratados com sobredentaduras retidas por implantes, a realização de terapia peri-implantar apropriada pode promover o sucesso a longo prazo do tratamento e dos componentes do sistema de retenção. Estudos que examinaram o efeito da avaliação clínica e manutenção regular, e o reforço nos procedimentos de higiene bucal diária, relataram que a profundidades de sondagem ou outros índices gengivais não sofreram mudanças significativas ao longo de anos (KNOEMSCILD; LEFEBVRE e ALLEN, 1992).

As sobredentaduras suportadas por implantes podem ser mantidas em condições saudáveis e estáveis, independentemente do sistema de retenção usado para o encaixe. Evidências atualizadas da literatura indicam que a saúde do tecido mole peri-implantar não é afetada pelos diferentes tipos de sistemas de retenção por encaixe (CUNE e PUTTER 1994; AMBARD et al. 2002; TRAKAS et al. 2006).

Cune e Putter (1994), avaliaram a sobrevida de cinco sistemas de implantes e seus efeitos na saúde dos tecidos peri-implantares e/ou nível de higiene bucal em duas modalidades de tratamento com sobredentadura retida por implantes mandibulares. Os sistemas de implante avaliados foram: Bonefit ITI (n = 71), IMZ (n = 150), Brånemark (n = 47), Screw-Vent (n = 35) e Bosker TMI (n = 27), observados por um período médio de 21,2 meses (DP 8,8) após a implantação. As opções de tratamento protético incluíram sobredentaduras retidas por implantes não conectados (n = 72 pacientes) ou conectados com barras (n = 255 pacientes). A saúde dos tecidos peri-implantares e a higiene oral foram avaliadas por dois observadores independentes. No que diz respeito à sobrevida dos implantes e à higiene bucal, não foram observadas diferenças importantes, tanto entre os sistemas de implantes quanto as opções protéticas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na saúde dos tecidos peri-implantares entre grupos com implantes conectados ou não. Os autores concluíram que para as três variáveis avaliadas: "sobrevida do implante", "saúde dos tecidos peri-implantares" e "higiene bucal", as diferenças entre os sistemas de implantes e as diferenças entre os tipos de sobre-estruturas do tratamento protético foram pequenas e não clinicamente relevantes.

Ambard et al. (2002), investigaram a capacidade de higienização e a aceitação do tratamento com sobredentaduras retidas por implantes com sistemas de encaixes do tipo cilíndrico (ERA®; Sterngold) ou barra (Hader®; Sterngold, Attleboro, Mass.). Foram avaliados dois grupos de 10 pacientes: Grupo A, composto por pacientes com sobredentaduras e sistema de retenção ERA®, e Grupo B, constituído por pacientes com o sistema de barras de Hader®. Os autores avaliaram os indivíduos aos 18 e 24 meses após a entrega das sobredentaduras por meio de um questionário e um exame clínico para coleta de dados sobre índices gengivais, biofilme e cálculo. Os resultados demonstraram que o Grupo A apresentou melhores valores do que o Grupo B para os índices avaliados, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Os autores não encontraram diferença significativa entre os dois grupos experimentais no quesito satisfação. Concluíram que os dois tipos de sistemas de retenção estudados são igualmente satisfatórios e de fácil higienização.

Agentes de limpeza específicos para aparelhos protéticos disponíveis no mercado são algumas vezes recomendados à pacientes que receberam sobredentaduras retidas por implantes. Entretanto, não se sabe ao certo o efeito desses agentes sobre os diferentes materiais utilizados na fabricação dos sistemas de retenção por encaixe. Cornelius et al. (2002) relataram que o hipoclorito de sódio (NaOCl) é capaz de modificar a morfologia da superfície do nylon, causando porosidades e rachaduras que podem ser observadas em microscopia eletrônica de varredura. Aparentemente, isso poderia produzir efeitos deletérios sobre os tecidos de suporte pelo aumento na adesividade de micro-organismos.

Kürkcüoglu et al. (2016) avaliaram *in vitro* a retenção do sistema de retenção protética Locator (Zest Anchors®), após sua imersão em 3 soluções de limpeza diferentes. Para a simulação, o sistema de encaixe foi acoplado à um implante análogo (diâmetro de 4,1 mm) incluído em bloco de resina acrílica. Sete componentes protéticos do Locator®, com diferentes cores e níveis de retenção (bege < rosa < azul), foram embebidos nas soluções de limpeza a serem testadas (NaOCl, perborato de sódio e bicarbonato de sódio/perborato de sódio) e em água (controle) em um aparelho que simulou 6 meses de uso clínico. Após o ensaio, a retenção dos componentes protéticos do encaixe foi testada em uma máquina de tração. Os resultados mostraram que retenção dos componentes protéticos do encaixe de cor bege foi significativamente menor após a exposição à solução de bicarbonato de sódio ($p = 0,001$). A retenção dos componentes protéticos do encaixe de cor rosa não mudou após sua exposição às diferentes soluções, enquanto a retenção dos componentes de cor azul diminuiu significativamente após terem sido expostos ao NaOCl e bicarbonato de sódio ($p = 0,002$). Os autores concluíram que a retenção dos componentes do encaixe de diferentes cores e retenções foram afetados de forma diferente pelos agentes de limpeza, e sugeriram que os profissionais não recomendem agentes de limpeza que contenham NaOCl ou bicarbonato de sódio/perborato de sódio para pacientes que usam sobredentaduras com sistemas de retenção por encaixe do tipo Locator® com componentes protéticos nas cores bege ou azul, para evitar uma possível diminuição da retenção.

2.8 Adesão dos micro-organismos aos diferentes materiais utilizados em sistemas de encaixe

Para resistir às forças constantemente presentes e sobreviver, as bactérias precisam aderir às superfícies duras ou moles do ambiente oral. A descamação do epitélio de revestimento bucal é um mecanismo de defesa rápido e efetivo do hospedeiro, pois evita o

acúmulo de grandes massas de micro-organismos. Dentes, próteses ou implantes osseointegrados, no entanto, fornecem superfícies que não se renovam, o que permite a formação de biofilmes espessos. Em geral, o biofilme estabelecido mantém um equilíbrio com o hospedeiro. No entanto, um acúmulo descontrolado de bactérias nas superfícies duras pode ocorrer e se constituir na principal causa de cárie dentária, gengivite, periodontite, peri-implantite e estomatite. Considerando importante o impacto das características da superfície (energia livre, rugosidade, química) na formação do biofilme, supra e subgengival, Teughels et al. (2006) realizaram uma revisão sistemática sobre o tema. Realizaram uma pesquisa eletrônica no *Medline*, limitando a busca entre os anos de 1966 a 2005 e utilizando as seguintes palavras-chave: "formação de biofilmes e implantes dentários/ orais/ características de superfície", "características de superfície e implantes", "formação de biofilmes e placa oral", "placa / biofilme e rugosidade", "placa / biofilme e energia livre de superfície", e "formação de placa e implantes". Foram incluídos estudos clínicos apenas sobre a região orofaríngea. A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que o aumento da rugosidade superficial (acima do limite Ra de 0,2 μm) e/ou da energia livre de superfície facilita a formação de biofilme em materiais restauradores. Quando ambas estão presentes, a rugosidade da superfície foi predominante em relação ao acúmulo. A formação de biofilme também é influenciada pela composição química ou pelo tipo de revestimento de superfície do biomaterial. A conclusão dessa revisão sistemática foi a de que os dados da literatura parecem indicar que superfícies de implantes transmucosos com maior rugosidade superficial e energia livre de superfície facilitam a formação de biofilme.

Li et al. (2012) estudaram as características da superfície de vários materiais usados na confecção de sobredentaduras retidas por implantes, a capacidade de adesão de *Candida albicans* e formação de biofilme nessas superfícies, e o papel da mucina salivar na formação do biofilme. Nessa pesquisa, foram avaliados 7 materiais utilizados rotineiramente no tratamento protético e com implantes: hidroxiapatita, zircônia, titânio comercialmente puro, resina acrílica, polietileno tereftalato (PET) e ligas metálicas à base de cobalto-cromo e ouro-prata-paládio. Como material do grupo controle, foi utilizado colágeno tipo I revestido de polietileno. Foram preparados 12 discos (13 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) para a avaliação das seguintes propriedades de superfície de cada material: rugosidade superficial, ângulos de contato superficial (como índice de hidrofília do material), e absorção de mucina salivar. As médias de rugosidade da superfície de todos os materiais foram padronizadas a 0,07-0,10 mm. Os discos foram divididos em dois grupos, onde apenas um grupo foi coberto por saliva. Todos foram inoculados com 1 ml de suspensão de *Candida albicans* e incubados

aerobicamente a 37 °C durante 90 minutos (fase de adesão inicial) e cuidadosamente lavados com solução PBS (salina tamponada com fosfato) para remoção das células não aderidas. As amostras foram novamente incubadas em condições aeróbicas a 37°C durante dois dias para a fase de formação de biofilme. As características morfológicas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Análise univariada e análise de regressão linear múltipla foram utilizadas para avaliação dos efeitos do revestimento salivar e das propriedades superficiais do material na adesão inicial, na formação do biofilme e na sua remoção. Os resultados indicaram uma correlação positiva entre o ângulo de contato superficial ou o índice de hidrofobicidade dos materiais com a adesão inicial e a formação de biofilme de *C. albicans*. A correlação negativa entre a absorção de mucina e remoção do biofilme de *Candida* foi considerada indicativa do papel importante da mucina na formação do biofilme e na sua rigidez. A observação por SEM revelou menor número de células de *Candida* em Ti coberto por saliva do que na hidroxiapatita ou resina acrílica cobertas por saliva. As conclusões deste trabalho foram as de que os materiais com propriedades e composições hidrófobas diferentes apresentam diferentes maneiras de absorção da mucina salivar, de adesão inicial e formação de biofilme, e que os materiais hidrofóbicos estimulam o aumento da adesão inicial do fungo, resultando na formação ativa do biofilme. Além disso, a mucina tem efeitos decisivos na imobilização de *Candida* e no desenvolvimento de biofilme nos materiais.

2.9 Infiltração bacteriana na interface implantes/componentes

Em uma reabilitação protética com implantes, essencialmente duas partes podem ser identificadas quanto à sua disposição espacial na área do rebordo, onde os implantes são posicionados: uma parte endo-óssea (implante propriamente dito), e outra supraóssea (componentes protéticos). Ambas as partes se conectam, o implante à uma supraestrutura ou pilar protético, onde embora estejam intimamente ligados, um *microgap* inevitavelmente aparece na interface (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; COSYN et al., 2009; ALOISE et al., 2010). Sua magnitude é dependente do fabricante mas parece ser limitada a menos de 10µm, nos sistemas de implantes mais comumente utilizados (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997).

O estudo de Persson et al. (1996) examinou a microbiota da superfície interna dos componentes de 28 implantes Branemark® em 10 pacientes parcialmente desdentados que foram tratados com prótese parcial fixa. O período em que as próteses estiveram em função

variou de 1 a 8 anos. As próteses fixas foram avaliadas quanto à presença de mobilidade e foram então removidas. Os parafusos dos pilares foram avaliados, removidos e classificados como estáveis, facilmente removidos ou soltos. Em seguida, amostras bacterianas das várias superfícies internas do sistema de implante foram obtidas e semeadas em placas ágar sangue para estimativa e identificação das espécies mais predominantes, com base na reação de Gram, sensibilidade ao oxigênio e testes bioquímicos. As superfícies internas de diferentes componentes dos implantes Branemark®, após diferentes períodos em função na cavidade bucal, abrigaram consistentemente uma microbiota heterogênea e principalmente anaeróbica. Não se observou neste estudo uma relação entre o tipo, comprimento e estabilidade do pilar, perda óssea peri-implantar e as espécies ou números de micro-organismos encontrados nas amostras. A microbiota consistiu principalmente de *Streptococos* facultativos e anaeróbios, bacilos anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos, assim como espécies de *Propionibacterium*, *Eubacterium* e *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyomonas*. Em conclusão os autores sugeriram que esta presença bacteriana é o resultado da contaminação dos componentes de fixação e do pilar durante o 1º e/ou 2º estágio da instalação do implante e/ou da transmissão de micro-organismos do ambiente oral para a prótese.

A infiltração bacteriana presente na conexão implante-pilar é um importante fator contribuinte para reações inflamatórias peri-implantares. A prevenção da infiltração microbiana nas conexões implante-pilar a fim de minimizar reações inflamatórias e maximizar a estabilidade óssea na região cervical do implante ainda é um grande desafio para a construção de sistemas de implantes de dois estágios. Lacunas e cavidades dentro do implante e entre implante e pilar ainda ocorrem nos sistemas de implante e encaixes (HARDER et al., 2010). A possibilidade de penetração de bactérias ou endotoxinas na interface implante-pilar foi demonstrada por diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; DO NASCIMENTO et al., 2008; COSYN et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2009; HARDER et al., 2010; DO NASCIMENTO et al., 2012; JERVØE-STORM et al., 2015; NASSAR; ABDALLA, 2015; DO NASCIMENTO et al., 2015; TALLARICO et al., 2017).

Com o intuito de estudar a contaminação das partes internas dos implantes através da penetração bacteriana pelas interfaces de seus componentes, Do Nascimento et al. (2008) estudaram a capacidade de infiltração, *in vitro*, do micro-organismo *Fusobacterium nucleatum* através da interface implante e pilares protéticos pré-fabricados ou fundidos (n = 10) sem aplicação de carga. Uma cultura pura de *F. nucleatum* (ATCC 25586), incubada em

condições anaeróbicas, foi utilizada nesta avaliação. Os implantes, sob condições de esterilidade, tiveram sua parte interna inoculada com 3.0 µL de suspensão de *F. nucleatum*. Os pilares foram cuidadosamente conectados aos implantes com parafusos de liga de titânio apertados em 32 Ncm, de acordo com as instruções do fabricante. Foram então imersos em 5,0 ml de meio de cultura de solução de soja tríptica esterilizada e incubados a 35°C sob condições anaeróbicas por 14 dias para avaliar a infiltração bacteriana através da interface implante-pilar. Os autores observaram o crescimento bacteriano no meio de cultura, indicativo de infiltração microbiana, em apenas 1 de 9 amostras (11,1%) de cada grupo, e concluíram que ambos os pilares, pré-fabricados e fundidos, conectados a implantes hexagonais externos estão associados à baixas porcentagens de infiltração bacteriana através da interface nas condições testadas.

Harder et al. (2010) investigaram a influência da justaposição do pilar protético na contaminação por endotoxinas de dois sistemas de implante – *AstraTech®* e *Ankylos®*, com diferentes conexões cônicas internas, sob condições estáticas. O sistema *AstraTech®* apresenta conexão interna com parafuso para fixação, já o sistema *Ankylos®* é um “cone morse verdadeiro”, as partes, implante e pilar, são fixadas apenas pela justaposição das paredes. No estudo, foram inoculadas uma solução contendo a endotoxina nas superfícies internas de 8 implantes de cada sistema, os respectivos pilares protéticos foram unidos conforme suas especificidades seguindo as recomendações do fabricante. Os conjuntos foram armazenados em condições isostáticas em um sobrenadante de água sem pirogênio durante 168 horas. Amostras de sobrenadantes foram retiradas após 5 min, 24 h, 72 h e 168 h, e avaliadas quanto a presença de endotoxina. Apenas um implante do grupo *AstraTech®* não mostrou sinal de contaminação por endotoxina após 168 h, enquanto os outros implantes mostraram contaminação após os períodos de armazenamento. Os implantes no grupo *Ankylos®* mostraram contaminação pela endotoxina após 5 minutos de armazenamento na solução sobrenadante. Os autores concluíram que as conexões cônicas internas testadas não evitam o vazamento de endotoxinas, entretanto, os implantes *AstraTech®* apresentaram significativo maior selamento da interface implante/pilar que os implantes *Ankylos®*.

Cosyn et al. (2009), realizaram um estudo para comparar a microbiota do sulco peri-implantar e a dos componentes internos de implantes sem sinais clínicos de peri-implantite e em função por muitos anos. O método de hibridação DNA *Checkerboard* foi utilizado para identificar e quantificar 40 espécies microbianas. Cinquenta e oito implantes de titânio *Branemark®* foram examinados em 8 pacientes sistemicamente saudáveis. Todos os

implantes situavam-se na maxila, suportando uma prótese total parafusada por uma média de 9,6 anos. Amostras de fluidos gengivais foram coletadas dos sulcos mais profundos de cada implante para análise microbiológica. À medida que as próteses sobre implantes eram removidas, o material utilizado para recobrimento do compartimento intracoronário da prótese (algodão encerado), assim como o parafuso do pilar eram recolhidos para avaliação microbiológica. Os resultados obtidos revelaram que a contaminação bacteriana do material de recobrimento intracoronário foi bastante semelhante à do fluido do sulco peri-implantar em relação a praticamente todas as espécies-alvo avaliadas no estudo. Ao avaliar o parafuso do pilar, a maioria das espécies foram detectadas em menor frequência e quantidade em comparação com o material de recobrimento do compartimento intracoronário e ao sulco peri-implantar. De modo geral, foi marcante a alta prevalência de numerosas espécies associadas à patologia peri-implantar, mesmo não havendo sinais clínicos de doença associada aos implantes. Os autores relataram forte contaminação dos compartimentos intracoronários de próteses totais fixas parafusadas e consideraram os espaços entre implantes e próteses o caminho principal para a infiltração bacteriana. Concluíram ainda, que a contaminação dos parafusos dos pilares provavelmente ocorreu a partir do sulco peri-implantar, através das interfaces implante-pilar e pilar-prótese.

Do Nascimento et al. (2012) realizaram um estudo *in vitro* em condições estáticas, no qual foram utilizados 30 implantes de plataforma hexagonal conectados a pilares pré-fabricados com torque de 32 Ncm, de acordo com as especificações do fabricante. Os conjuntos foram incubados individualmente em saliva humana sob condições anaeróbicas durante 7 dias a 37°C. Posteriormente, os conteúdos das partes internas dos implantes foram coletados e avaliados pelos métodos tradicionais de cultura microbiana (n=15) ou pelo método *DNA Checkerboard* (n=15), com 13 espécies-alvo bacterianas. Os dois métodos de análise demonstraram sinais positivos de infiltração bacteriana em 6 das 15 amostras avaliadas. As espécies *Capnocytophaga gingivalis* e *Streptococcus mutans*, seguidas pela *Veillonella parvula*, foram as mais frequentemente detectadas na superfície interna dos implantes. Os autores concluíram que os dois métodos testados apresentam validade na identificação e quantificação de espécies microbianas ao longo da interface implante-pilar.

O estudo longitudinal de Jervøe-Storm et al. (2015), teve o objetivo de investigar a colonização bacteriana da cavidade interna do implante e avaliar uma possível associação entre essa contaminação e a perda óssea peri-implantar. Um total de 264 amostras foram colhidas por cones de papel da cavidade interna de 66 implantes do tipo hexágono interno com pilar para prótese cimentada de 26 pacientes, nos seguintes períodos experimentais:

inicial (imediatamente após a inserção do implante) e após 3, 4 e 12 meses. As amostras foram avaliadas quanto a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, e quanto às contagens bacterianas totais pelo método *real-time PCR*. Além disso, a perda óssea foi avaliada em radiografias padronizadas nos períodos logo após a inserção do implante, 3, 4, 12 e 25 meses subsequentes. Os resultados mostraram um aumento na frequência de detecção, bem como nas contagens médias das bactérias avaliadas ao longo do tempo. Foi ainda observada uma associação significativa entre a presença de *P. Intermedia* aos 4 e 12 meses e a perda óssea peri-implantar aos 25 meses. Concluiu-se neste estudo que houve uma colonização progressiva por bactérias periodontopatogênicas das cavidades internas dos implantes ao longo do tempo e que a colonização com a *P. Intermedia* está associada à perda óssea peri-implantar.

Considerando as espécies bacterianas que colonizam as superfícies dos implantes e que podem levar à inflamação dos tecidos duros e moles e comprometer o sucesso do tratamento com implantes a longo prazo, Do Nascimento et al. (2015) avaliaram, em estudo *in vitro*, o ajuste marginal e a infiltração microbiana ao longo da interface implante-pilar associados às próteses parciais fixas, antes e depois da ocorrência de cargas funcionais. No estudo, foram investigados 48 implantes com hexágono externo (EH; n = 24) e com conexões cone-morse (MC; n = 24). Os modelos experimentais foram constituídos por 2 implantes suportando uma prótese parcial fixa de 3 elementos, os quais foram divididos em 2 grupos (n = 12), de acordo com a plataforma de conexão EH ou MC. O desajuste vertical na interface implante-pilar foi medido antes e depois do carregamento funcional (150 Ncm durante 500.000 ciclos a 1,8 Hz). O método de hibridização DNA *Checkerboard* foi utilizado para identificar e quantificar até 38 espécies bacterianas e 5 de *Cândida*, colonizando as partes internas dos implantes após o carregamento funcional. Os valores médios (mm, $\pm$ DP) do desajuste vertical para EH foram $0,0131 \pm 0,002$ antes do carregamento e $0,0138 \pm 0,002$ após o carregamento, e para MC foram $0,0132 \pm 0,003$ antes do carregamento e $0,0137 \pm 0,001$ após o carregamento. Vinte e uma espécies bacterianas, incluindo patógenos periodontais e *C. albicans*, foram encontradas colonizando as superfícies internas dos implantes de EH após o carregamento. Nenhuma das espécies-alvo foi detectada nas partes internas dos implantes com conexão MC. As conclusões do estudo foram as de que os implantes EH apresentaram maiores contagens microbianas do que os implantes MC, cuja colonização microbiana não foi observada após o carregamento. As espécies detectadas incluíram micro-organismos não patogênicos e outras relacionadas à doença periodontal/ peri-implantar.

Nassar e Abdalla (2015), realizaram uma pesquisa para comparar a infiltração bacteriana *in vitro* pela interface entre implantes e componentes protéticos com duas geometrias diferentes de conexões internas. Foram utilizados 20 implantes dentários (BioHorizons Implant Systems Inc®.), divididos em dois grupos: grupo 1 (n=10) com geometria hexagonal interna e grupo 2 (n=10) com uma conexão interna *tri-lobe*. Todos os conjuntos implante-conectores foram submersos em solução bacteriana preparada contendo *Staphylococcus aureus* e incubados a 37°C durante 14 dias. Os espécimes foram desmontados e amostras das superfícies internas dos implantes foram coletadas com pontas de papel estéril e levadas para meio de cultura, incubado à 37°C por 24 h. Os micro-organismos que cresceram no meio foram identificados por meio de coloração de Gram e reações bioquímicas. As conexões com geometria hexagonal interna apresentaram maior número de bactérias que os implantes com conexão interna *tri-lobe*. Assim, os autores concluíram que a infiltração bacteriana parece ser inevitável e que a geometria da interface do pilar de fixação desempenha um papel importante na quantidade de infiltração.

Em revisão sistemática da literatura e meta-análise, Tallarico et al. (2017) avaliaram a colonização microbiana de interfaces implante-pilar em nível ósseo possivelmente associadas às condições clínicas peri-implantares. O estudo investigou a contagem bacteriana e o início de peri-implantite associados à implantes osseointegrados conectados à pilares protéticos em função por pelo menos 1 ano. Este estudo englobou a literatura de língua inglesa on-line (MedLine, Google scholar, biblioteca Cochrane) de 1990 à março de 2015. A avaliação da qualidade dos artigos selecionados foi realizada de acordo com as diretrizes de *Arrive* e *Consort*. Na análise dos dados, as contagens bacterianas totais e as de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* relacionadas à interface implante-pilar com ou sem patologia peri-implantar foram calculadas e comparadas. Um total de 14 artigos, relatando dados de 1126 implantes, preencheram os critérios de inclusão e foram avaliados. Os resultados mostraram que os estudos selecionados revelaram contaminação da interface implante-pilar em pacientes que receberam sistemas de implantes de duas peças. A meta-análise indicou ainda diferença significativa na contagem bacteriana total entre implantes afetados por peri-implantite e implantares associados à tecidos saudáveis. Menores contagens bacterianas foram identificadas na interface implante-pilar saudável para todas as bactérias gram-negativas investigadas, exceto para a *T. forsythia*. Os autores puderam concluir que foram encontradas contagens bacterianas significativamente maiores para bactérias periodontopatogênicas nas interfaces implante-pilar em pacientes com peri-implantite, em comparação com os implantes com tecidos peri-implantares saudáveis.

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

Avaliar qualitativa e quantitativamente o biofilme formado sobre as superfícies de dois sistemas de encaixe para sobredentaduras retidas por implantes, próteses, implantes e sulcos peri-implantares, ao longo do tempo.

Objetivos específicos

- i) Identificar e quantificar 32 espécies microbianas-alvo dos biofilmes coletados dos seguintes sítios:
 - a) componente macho do encaixe
 - b) sulco peri-implantar;
 - c) superfície interna do implante;
 - d) plataforma do implante;
 - e) rosca do componente macho;
 - f) componente fêmea do encaixe;
 - g) base da sobredentadura em torno do encaixe.
- ii) Comparar as microbiotas associadas à dois sistemas retenção por encaixe:
 - a) Esférico (*Retentive Anchor, Institut Straumann AG, Suíça*) e
 - b) Cilíndrico (*Locator, Zest Anchors Inc., CA-USA*).
- iii) Comparar a microbiota de cada sítio entre os diferentes períodos experimentais (*baseline*, 3 meses e 12 meses).

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta investigação é baseada na análise de biofilmes coletados em estudo clínico com delineamento experimental randomizado, aprovado pelo conselho de ética institucional: *Research ethics board*, da *McGill University Health Centre*, de nº BMD#07-010, envolvendo 24 participantes de ambos os sexos com idade igual ou superior a 65 anos, em que foram comparadas as microbiotas associadas à dois sistemas de retenção por encaixes para sobredentaduras mandibulares retidas por implantes.

Nessa pesquisa, foram coletados biofilmes das superfícies dos implantes, sistemas de encaixe, prótese e do sulco peri-implantar, para análise posterior. Todos os participantes do estudo eram portadores de prótese total convencional maxilar e sobredentadura mandibular retida por dois implantes de titânio (Straumann standard, Ø4,1 mm; Straumann®, Suíça), posicionados na região dos caninos (total de 48 implantes) com sistema de retenção por encaixe de geometria esférica (Retentive Anchor, Straumann®, Suíça; RA; n = 12) ou cilíndrica (Locator, Zest Anchors Inc.®, CA-USA; Loc; n = 12), instalados de forma aleatorizada (Figuras 1 e 2).

Figura 1- Sistema de retenção por encaixe de geometria esférica (Retentive Anchor, Institut Straumann®, AG, Suíça). (A) Componentes fêmeas dos encaixes instalados nas próteses; (B) componentes machos dos encaixes instalados aos implantes; (C) sistema de encaixe completo com os componentes (macho e fêmea) vistos separadamente.

Figura 2- Sistema de encaixe de geometria cilíndrica (Locator, Zest Anchors Inc.®, CA-USA). (A) Componentes fêmeas dos encaixes instalados nas próteses; (B) componentes machos dos encaixes instalados aos implantes; (C) sistema de encaixe completo com os componentes (macho e fêmea) vistos separadamente.

Os sistemas de encaixe são basicamente compostos por dois componentes: um para instalação na base da prótese, frequentemente denominado “componente fêmea” ou simplesmente “fêmea”, e outro para instalação no implante, ou “macho” que, quando conectados, conferem retenção às próteses. No sistema RA, o componente “macho” apresenta geometria esférica (também popularizada como “tipo bola”), enquanto no sistema Loc o componente para conexão ao implante apresenta geometria cilíndrica. Embora o fabricante do sistema Loc denomine o componente do implante como “fêmea”, provavelmente devido à presença de uma cavidade na sua parte mais central, e o componente da prótese como “macho”, provavelmente devido à presença de um pino na sua porção de *nylon*, iremos utilizar neste estudo os termos “fêmea” para os componentes instalados nas próteses e “macho” para os componentes instalados nos implantes, *para ambos os sistemas de encaixe*, a fim de padronizar a terminologia. O sistema de encaixe RA tem como componente fêmea, uma cápsula metálica com garras de retenção internas produzidas em de liga de ouro, que se prende ao componente macho, este composto por uma esfera em liga de titânio com 2,25 mm de diâmetro. Já o sistema Loc apresenta diferentes graus de retentividade, dependente da escolha do profissional pela cor da cápsula de *nylon*. Neste estudo o componente fêmea foi composto por uma cápsula em liga metálica onde se prendeu internamente uma cápsula em *nylon* resiliente transparente com 4,7 mm de diâmetro, fornecendo encaixe para o componente macho, formado por uma liga de titânio de 4 mm de diâmetro.

Os sistemas de encaixe foram instalados após a remoção de encaixes desgastados e aplicação de um protocolo de limpeza dos implantes que consistiu em uma sequência de três abundantes irrigações com o antisséptico *Listerine*® (LA, Morris Plains, NJ, USA) e soro fisiológico, alternadas por fricção com miniescovas de *nylon* do tipo *microbrush* (KG Brush; KG Sorensen®, Brasil), cujo objetivo foi o de promover a descontaminação inicial das superfícies envolvidas. Os novos sistemas de encaixe foram instalados com torque final de 20N, conforme recomendação dos fabricantes.

A coleta de material biológico foi realizada para cada implante em sete sítios, considerados como clinicamente importantes: a- componente macho do encaixe; b- sulco peri-implantar; c- superfície interna do implante; d- plataforma do implante; e- rosca do componente macho; f- componente fêmea do encaixe e g- base da sobredentadura em torno do encaixe (Figuras 3 e 4).

As coletas foram realizadas em três períodos experimentais: *baseline* (inicial), 3 meses e 12 meses, com os sistemas de encaixe em função. As amostras foram coletadas dos 24 indivíduos participantes do estudo, nos 7 sítios descritos acima, para cada um dos implantes (n= 48), resultando em 336 amostras de material biológico para cada período experimental. Um total de 1008 amostras em todo o estudo, sendo 504 amostras para cada sistema de encaixe. Os procedimentos de instalação dos encaixes e coleta de material biológico foram realizados por pesquisadores calibrados, experientes e com especialização em prótese dentária.

As amostras dos sulcos peri-implantares, sítio “b”, foram realizadas com cones de papel absorvente nº 35 (Dentsply Maillefer®, Ballaigues, Suíça) posicionados por 30 segundos em 4 sítios peri-implantares: méso-vestibular, disto-vestibular, méso-lingual e disto-lingual e armazenadas em conjunto (Figura 3).

Figura 3- Coleta das amostras no sulco peri-implantar: sítio “b”.

Os biofilmes foram coletados das superfícies dos implantes, próteses e sistemas de retenção por encaixe, nos sítios “a”, “c”, “d”, “e”, “f” e “g”, com o auxílio de mini escovas de *nylon* do tipo *microbrush* (KG Brush; KG Sorensen®, Brasil), conforme a Figura 4.

Figura 4- Coleta das amostras realizadas nos sítios “a”, “c”, “d”, “e”, “f” e “g”, com *microbrush*.

As amostras de cada um dos sete sítios foram armazenadas individualmente em microtubos *ependorf* contendo 150 μ L de solução tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) e 150 μ L de solução NaOH 0,5 M (Figura 5), a 4⁰ C, até o processamento laboratorial.

Figura 5- Armazenamento dos materiais coletados em microtubos *ependorf* com 150 μ L de solução tampão TE e 150 μ L de solução NaOH 0,5 M.

No presente estudo, a detecção e quantificação de 32 espécies bacterianas para cada amostra foi determinada por meio do método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Espécies bacterianas com participação na colonização inicial do biofilme dental, espécies com potencial periodontopatogênico e outras, colonizadoras do ambiente oral, foram selecionadas para este estudo (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies microbianas-alvo avaliadas nas amostras de biofilme oral, identificadas por cores segundo o grau de patogenicidade proposto por Socransky et al. (1998).

1	<i>Aa comitans a</i>	}	Colonizadores iniciais
2	<i>Aa comitans b</i>		
3	<i>E. corrodens</i>		
4	<i>C. gingivalis</i>		
5	<i>S. oralis</i>		
6	<i>S. sanguinis</i>		
7	<i>S. gordonii</i>		
8	<i>S. mitis</i>		
9	<i>V. parvula</i>		
10	<i>F. nucleatum</i>	}	Patógenos periodontais/peri-implantares
11	<i>F. periodonticum</i>		
12	<i>S. constellatus</i>		
13	<i>P. intermedia</i>		
14	<i>P. micra</i>		
14	<i>P. gingivalis</i>		
16	<i>T. denticola</i>		
17	<i>T. forsythia</i>		
18	<i>B. fragilis</i>	}	Outros colonizadores
19	<i>E. faecalis</i>		
20	<i>L. casei</i>		
21	<i>N. mucosa</i>		
22	<i>P. putida</i>		
23	<i>P. aeruginosa</i>		
24	<i>P. melaninogenica</i>		
25	<i>P. endodontalis</i>		
26	<i>S. mutans</i>		
27	<i>S. parasanguinis</i>		
28	<i>S. sobrinus</i>		
28	<i>S. salivarius</i>		
30	<i>S. aureus</i>		
31	<i>S. pasteurii</i>		
32	<i>S. moorei</i>		

Para confecção das sondas de detecção dos micro-organismos, o DNA genômico das espécies bacterianas selecionadas foram extraídos de acordo com uma modificação do método originalmente descrito por Pitcher, Sanders e Owen (1989), realizada por do Nascimento et al.

(2008). As sondas completas de DNA genômico das 32 espécies foram marcadas de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante do marcador genômico (Amersham Gene Images Alkphos Direct labelling and Detection System, GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA genômico do micro-organismo a ser estudado, atingindo uma concentração final de 1 ng/μl da sonda na solução de hibridização.

Testes com diferentes concentrações de sondas de DNA foram realizados inicialmente de modo a otimizar a quantidade necessária para a detecção de células bacterianas nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 , onde foi constatado que a detecção visual não é possível para as concentrações aproximadas a 10^3 e 10^4 (Figuras 6 e 7). A sensibilidade do teste foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridização positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células bacterianas, de acordo com a quantidade de sonda utilizada (SOCRANSKY et al., 1994). Após os testes de calibração, as sondas de DNA marcadas foram testadas com as amostras de biofilme oral coletadas.

Figura 6- Esquema do teste realizado para calibração da detecção e quantificação de células bacterianas. Os cruzamentos representam as reações entre as sondas de DNA confeccionadas a partir da espécie bacteriana selecionada para o teste e amostras com diferentes concentrações de células dessa mesma espécie. As duas últimas colunas correspondem às concentrações de 10^5 e 10^6 , utilizadas como padrão de comparação em todo estudo.

Figura 7- Resultado do teste para calibração do processo de quantificação de células bacterianas, registrado em filme radiográfico (HyperFilm). O retângulo delineado em vermelho destaca os resultados obtidos a partir de amostras com concentrações variadas (10^3 a 10^6 , da esquerda para a direita) de uma das espécies avaliadas; para essa espécie, observa-se pouca visibilidade de sinais na concentração de 10^5 , sinais mais fortes na concentração de 10^6 e ausência de sinais visíveis nas concentrações de 10^3 e 10^4 .

Para o processamento das amostras pelo método *DNA Checkerboard*, os microtubos contendo as amostras em solução de TE e NaOH sofreram descongelamento à temperatura ambiente e foram levados ao agitador de tubos (AP 56, Phoenix®, Brasil) para a desagregação do conteúdo coletado com as miniescovas e pontas de papel absorventes, as quais foram removidas cuidadosamente com pinças estéreis após o período de agitação de 4 minutos. Os microtubos foram então aquecidos em água fervente (95°C) por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA, e imediatamente resfriados em gelo durante o mesmo tempo para manutenção das cadeias de nucleotídeos abertas. As amostras foram neutralizadas pela adição de 800 μL de acetato de amônio 5M, procedimento que permite a lise e suspensão do DNA na solução.

Com o auxílio de pipetas automáticas de precisão, o conteúdo de cada microtubo foi cuidadosamente depositado no interior de uma canaleta do *Minislot 30* (Immuntics®, Cambridge, MA, EUA), dispositivo metálico disposto sobre uma membrana de *nylon* de 15 x 15 cm (Hybond N+, GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK) previamente posicionada no aparelho (Figura 8). Das 30 canaletas do *Minislot 30*, 28 foram individualmente preenchidas por material das amostras, as outras 2 últimas canaletas foram reservadas para aplicação dos controles correspondentes a 10^5 e 10^6 células, utilizados posteriormente como padrão de comparação. Após o material ter sido aplicado, o DNA foi depositado sobre a membrana de *nylon* pela aspiração do conteúdo líquido realizada pelo acionamento da cânula lateral do *Minislot 30* em bomba à vácuo.

Figura 8- Aplicação das amostras nas canaletas do *Minislot 30*. Das 30 canaletas que o dispositivo metálico possui, 28 foram preenchidas por amostras e as 2 últimas pelos controles correspondentes a 10^5 e 10^6 células bacterianas previamente preparadas, utilizados como padrão de comparação. Na lateral direita da imagem situa-se a cânula para aspiração à vácuo.

A membrana de *nylon* foi removida cuidadosamente do dispositivo, protegida por um invólucro de papel *kraft* e levada à exposição ao calor de estufa a 120°C (SX 1.2 DTME, Sterilifer Ind. e Com. Ltda.®, Diadema, SP, Brasil), durante 20 minutos para fixação do DNA. Em seguida, a membrana passou por um processo de pré-hibridização a $63,5^{\circ}\text{C}$ sob agitação suave, em solução composta por NaCl a 1 M (Sigma Chemical Co.®, St. Louis, MO, EUA) e *Blocking reagent* 4% (GE Healthcare®) diluídos em 30 mL de *Hybridization Buffer* (GE Healthcare®), durante 6 horas.

Após a pré-hibridização, a membrana foi posicionada em um dispositivo acrílico, *Miniblotter 45* (Immunetics®, MA, EUA), de forma que as amostras de DNA previamente aplicadas fiquem posicionadas formando um ângulo de 90° com as canaletas do dispositivo, formando um cruzamento entre as amostras e as sondas, em padrão *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez), onde as reações de hibridização podem ocorrer independentes. Cada canaleta do *Miniblotter 45* (Figura 9) recebeu individualmente a aplicação de 150 μL das sondas de DNA marcadas das 32 espécies de micro-organismos alvo. O dispositivo foi firmemente envolvido por filme de PVC e saco plástico, evitando a desidratação da membrana posicionada internamente, e levado ao forno de hibridização a $63,5^{\circ}$, sob agitação suave, durante a noite (16 horas).

Figura 9- *Miniblotter 45*. Dispositivo acrílico, onde a membrana de *nylon* é internamente posicionada. Das 45 canaletas, 32 foram preenchidas pelas espécies-alvo do estudo.

Após a reação de hibridização, a membrana passou por um processo de lavagem sob agitação vigorosa em forno de hibridização, para remoção das sondas que não hibridizaram completamente. Foram realizadas duas lavagens de 30 minutos cada, a 67,5°C, com 500 mL de solução contendo Ureia 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 Trisma 1 M (Sigma Chemical Co.®), NaCl 2M (Sigma Chemical Co.®) e MgCl₂ 1M (Sigma Chemical Co.®).

Completadas as lavagens, 6,7 mL do reagente de detecção *CDP-Star*® (GE Healthcare®) foram aplicados sobre a membrana e deixados em contato com toda sua superfície por 5 minutos, em seguida, o excesso do reagente foi removido e a membrana selada em saco plástico para o procedimento de exposição. A detecção dos sinais de hibridização do DNA das amostras com o DNA das sondas marcadas de cada um dos 32 micro-organismos- alvo é obtida por meio de uma reação de quimiluminescência. Desta forma, a membrana foi posicionada em um cassete apropriado (Hypercassette, GE Healthcare®), em câmara escura, onde permaneceu em contato com um filme fotossensível para autorradiografia (HyperFilm, GE Healthcare®) durante uma hora. Por fim, o filme exposto foi revelado e fixado em soluções de processamento radiográfico convencional (Kodak®, Rochester, NY, EUA) para a detecção dos sinais de quimiluminescência (Figura 10).

Figura 10- Filme radiográfico com imagem formada após sua sensibilização pela quimiluminescência decorrente das reações de hibridização entre as sondas de DNA e as amostras coletadas no estudo. Colunas representam as amostras ($n=28$) e controles ($n=2$); linhas representam as espécies bacterianas avaliadas. Os sinais marcados em tons de cinza nas duas últimas colunas à direita (controle) se originaram de amostras com concentrações padrão de DNA correspondentes à 10^5 e 10^6 células bacterianas e foram usadas como referência na determinação dos escores microbianos.

Ao final do processamento das amostras, foram obtidos 36 filmes radiográficos com sinais de hibridização decorrentes das reações entre as amostras e sondas, nos quais as linhas representam as 32 sondas marcadas e as colunas representam as 28 amostras e 2 controles (10^5 e 10^6) previamente aplicados sobre a membrana, configurando um “tabuleiro de xadrez” ou DNA *Checkerboard* (Figura 11).

Figura 11- Esquema do cruzamento entre as amostras e sondas de DNA dos micro-organismos avaliados no estudo pelo método DNA *Checkerboard*. Os sinais nas interseções indicam a presença dos micro-organismos nas amostras correspondentes. A intensidade de cada sinal deve ser comparada à intensidade do sinal presente na região correspondente da coluna controle para que o escore daquela amostra possa ser determinado.

A quantificação de cada espécie microbiana foi realizada a partir da comparação visual das intensidades dos sinais quimiluminescentes das amostras e dos controles (10^5 e 10^6 células), decorrentes das reações de hibridização pelo método DNA *Checkerboard* e registrados nos 36 filmes radiográficos. Este método permite uma quantificação aproximada da concentração microbiana em cada amostra dentro de uma faixa pré-determinada, segundo o esquema abaixo:

- Escore 0 _ ausência de sinal;
- Escore 1 _ $< 10^5$ células;
- Escore 2 _ aproximadamente 10^5 células;
- Escore 3 _ entre 10^5 e 10^6 células;
- Escore 4 _ aproximadamente 10^6 células;
- Escore 5 _ $> 10^6$ células.

O método utilizado na leitura dos sinais foi o da identificação visual, realizado a olho nu por um único observador, com o auxílio de um aparelho negatoscópio (Figura 12). Os resultados foram registrados em planilha segundo o sistema de escores descrito acima e de acordo com o método originalmente proposto por Socransky et al. (1994).

Figura 12- Posicionamento do filme radiográfico no negatoscópio para a comparação visual das intensidades dos sinais de hibridização.

Os dados obtidos foram tabelados e organizados usando o *software Microsoft Excel* (Microsoft Corporation®, Tulsa, USA) e posteriormente submetidos à análise estatística utilizando testes bicaudais e nível de significância de 0.05 com o programa SAS 9.3 (SAS Institute Inc.®, Cary, NC).

Comparações entre os dois tipos de encaixe foram realizadas quanto à presença de cada espécie bacteriana e de complexos microbianos caracterizados por graus de diferenciados de patogenicidade, segundo proposto por Socransky et al. (1998). Todas as análises levaram em consideração a dependência dos dados resultantes de medidas repetidas nos três tempos do estudo, *baseline*, 3 meses e 12 meses. Para tanto, foi utilizada análise não paramétrica de modelo misto proposta por Brunner e Langer, 1999, com o método “ANOVAF”, usando estimador “MIVQUE0” e matriz de covariância não estruturada para cada tratamento. Os modelos foram construídos considerando o indivíduo como efeito aleatório e as demais variáveis como efeitos fixos (tempo, sítio e tipo de sistema de encaixe), além dos escores bacterianos do *baseline*. Para minimizar o impacto das comparações estatísticas múltiplas, foi utilizado o ajuste “Benjamini-Hochberg” *false discovery rate* (FDR).

5. Resultados

5. RESULTADOS

Neste estudo, foram avaliados biofilmes coletados das superfícies de implantes, sulcos peri-implantares, próteses, e de dois sistemas de retenção por encaixe para sobredentaduras, após a instalação dos encaixes (*baseline*) e após 3 e 12 meses de uso das próteses, por meio do método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*.

As 32 espécies bacterianas investigadas foram identificadas nos biofilmes coletados dos dois sistemas de encaixe e nos três períodos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2- Média dos escores medianos das espécies bacterianas avaliadas nos períodos: *baseline*, 3 e 12 meses, identificadas por cores, de acordo com o grau de patogenicidade proposto por Socransky et al. (1998), coletados dos sistemas de encaixe Loc e RA.

Espécies	Aa		Aa b		E. corrodens		C. gingivalis		S. oralis		S. sanguinis		S. gordonii		S. mitis	
	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA
<i>Baseline</i>	0.48	0.49	0.49	0.43	0.88	0.64	0.45	0.45	1.2	0.88	0.77	0.83	0.28	0.38	0.24	0.30
3 m	0.6	0.52	0.6	0.55	0.58	0.53	0.70	0.69	0.79	0.55	1.1	0.79	0.66	0.78	0.68	0.55
12 m	0.66	0.61	0.85	0.78	0.91	0.89	0.79	0.75	1.2	1.13	0.98	0.92	0.74	0.53	0.4	0.39

Espécies	F. nucleatum		F. periodonticum		S. constelatus		P. intermedia		P. micra		P. gingivalis		T. denticola		T. forsythia	
	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA
<i>Baseline</i>	0.35	0.33	0.4	0.58	0.93	0.94	0.73	0.68	0.79	0.95	0.88	0.39	0.66	0.69	0.63	0.73
3 m	1.93	1.79	0.36	0.36	0.76	0.73	0.18	0.21	0.86	0.64	0.6	0.48	0.86	0.8	0.72	0.63
12 m	0.74	0.79	1.05	1.02	0.95	1.29	1.24	1.1	0.74	0.82	0.95	0.91	1.08	1.15	1.05	0.89

Espécies	V. parvula		B. fragilis		E. faecalis		L. casei		N. mucosa		P. putida		P. aeruginosa		P. melaninogenica	
	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA
<i>Baseline</i>	0.44	0.32	0.47	0.53	0.36	0.47	0.38	0.57	0.40	0.44	0.28	0.32	0.45	0.42	0.48	0.38
3 m	1.1	0.93	0.77	0.79	1.03	0.9	0.86	0.5	0.85	0.74	0.96	0.79	0.52	0.45	0.48	0.46
12 m	1.61	1.31	0.95	0.91	0.89	0.8	1.73	1.6	0.64	0.56	0.88	0.92	0.38	0.38	1.19	0.95

Espécies	P. endodontalis		S. mutans		S. parasanguinis		S. sobrinus		S. salivarius		S. aureus		S. pasteurii		S. moorei	
	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA
<i>Baseline</i>	0.43	0.28	1.13	1.13	0.58	0.83	0.83	0.63	0.99	1.18	0.34	0.4	0.56	0.53	0.34	0.48
3 m	0.36	0.31	0.95	0.68	1.17	1.09	0.42	0.26	0.67	0.55	0.15	0.1	1.61	1.39	0.77	0.71
12 m	0.98	1.02	1.63	1.32	1.67	1.61	1.01	1.02	1.65	1.25	1.46	1.48	0.61	0.73	1.67	1.79

A análise dos escores medianos encontrados nos 7 sítios, quando avaliados em conjunto, em cada período experimental, não revelou diferenças estatísticas entre os sistemas de encaixe Loc e RA investigados (Figura 13).

Figura 13- Somatória dos escores medianos das 32 espécies microbianas presentes nos 7 sítios avaliados (componente macho do encaixe; sulco peri-implantar; superfície interna do implante; plataforma do implante; rosca do componente macho; componente fêmea do encaixe e base da sobredentadura em torno do encaixe) em cada um dos três períodos experimentais para os encaixes Loc e RA.

Individualmente, apenas a espécie *S. constellatus* apresentou diferença significativa entre as medianas dos escores (intervalos interquartis) dos sistemas de encaixe após 12 meses de uso (Loc = 1, intervalo interquartil = 0,54 – 1,32; RA = 1, intervalo interquartil = 0,57 – 1,86), com escores maiores para o encaixe RA ($p = 0,008$; Figura 14).

Figura 14- Gráfico em colunas empilhadas das médias dos escores medianos para cada micro-organismo nos períodos experimentais *baseline* (seção verde), 3 meses (seção azul) e 12 meses (seção amarela), para os sistemas de encaixe: Loc e RA. O símbolo “*” indica diferença estatística para o *S. constellatus* entre os dois sistemas de encaixe após 12 meses em função ($p = 0,008$; ANOVA F).

A Tabela 3 lista os escores medianos das 32 espécies microbianas encontradas em cada sítio avaliado. Diferenças estatisticamente significantes entre os dois sistemas de encaixe foram encontradas para sete espécies em quatro sítios. Escores maiores para o encaixe RA foram identificados no sítio “b” para as espécies *S. gordonii* ($p = 0,05$) e *L. casei* ($p = 0,04$), no sítio “c” para *P. gingivalis* ($p = 0,007$) e *P. endodontalis* ($p = 0,02$) e no sítio “e” para *S. constellatus* ($p = 0,04$) e *P. micra* ($p = 0,02$). Escores maiores para o encaixe Loc foram vistos apenas no sítio “a” para *S. sanguinis* ($p = 0,04$).

Tabela 3- Escores medianos das 32 espécies microbianas presentes, identificadas pelas cores de acordo com o grau de patogenicidade proposto por Socransky et al., (1998), nos 7 sítios investigados (“a”- “g”) para cada tipo de sistema de retenção por encaixe: Loc e RA. O símbolo “*”, ao lado direito dos escores, indica os micro-organismos com diferenças significantes entre os tipos de encaixe em cada sítio ($p < 0,05$, ANOVA F).

Sítios	a		b		c		d		e		f		g	
Encaixes	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA	Loc	RA
Espécies														
Aa a	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0,5	1	1	0
Aa b	1	1	0	0	0	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1
E corrodens	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C. gingivalis	1	1	1	0,5	0	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1
S oralis	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
S sanguinis	2	1 *	1	0	1	0	1	1	0,5	1	1	1	1	1
S gordonii	1	1	0	0,5 *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S mitis	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V parvula	2	1	1	0,5	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
F nucleatum	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F periodonticum	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S constellatus	1	1	0	1	1	1	1	1	0,5	1 *	1	1	1	1
P intermedia	1	0	0	0	1	1	0,5	1	1	1	1	1	0	0
P micra	1	1	1	0	0,5	1	1	1	0,5	1 *	1	1	1	1
P gingivalis	1	1	0	0	0,5	0,5 *	1	0,5	1	0	1	0	1	0
T denticola	1	1	1	0	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T forsythia	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B fragilis	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E faecalis	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L casei	1	1	0	0,5 *	0,5	0,5	1	0	1	0	1	0	1	0,5
N. mucosa	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0,5	0
P. putida	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P. aeruginosa	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P. melaninogenica	1	1	0	0	0	0	1	0	0,5	0	1	1	0	0
P. endodontalis	1	0	0	0	0,5	0,5 *	0	0	0	0	0,5	0	1	0
S. mutans	1	1	0	0	1	1	1,5	1	1	1	2	1	1	1
S. parasanguinis	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S. sobrinus	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
S. salivarius	1	1	1	0	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S. aureus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
S. pasteurii	1	1	0	0	0,5	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1
S. moorei	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Os escores microbianos encontrados em cada um dos sítios e períodos experimentais investigados podem ser vistos na Tabela 4. Os micro-organismos *S. pasteurii*, *S. mutans* e *F. nucleatum* apresentaram maiores frequências em concentrações mais elevadas, seguidos das espécies *S. moorei*, *S. constellatus*, *T. forsythia* e *T. denticola*. Outros micro-organismos foram observados com escores mais elevados em sítios específicos, como *V. parvula*, *E. faecalis*, *P. intermedia*, *S. parasanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* e *S. oralis*, identificados em maior quantidade no sítio “a” (componente macho do encaixe). Por outro lado, as espécies encontradas nos diversos sítios em menores quantidades foram *P. aeruginosa*, *S. mitis*, *S. aureus* e *S. gordonii*.

Tabela 4- Escores medianos das 32 espécies microbianas selecionadas para o estudo nos 7 sítios avaliados em cada um dos três períodos experimentais (B- *baseline*; 3m- 3 meses e 12m- 12 meses). O símbolo “*” indica diferença estatisticamente significativa entre períodos experimentais ($p < 0,05$; ANOVA F).

Sítios	a			b			c			d			e			f			g				
Períodos	B	3m	12m	B	3m	12m	B	3m	12m	B	3m	12m	B	3m	12m	B	3m	12m	B	3m	12m		
Espécies																							
A.a.a	0	1	1	*	0	0	1		0	1	0	*	0	1	1		0	0,5	1		0	1	1
A.a.b	0	1	1	*	0	0	1	*	0	1	1		0	0,5	1		0	1	1	*	1	1	1
E. corrodens	0	1	1	*	0	0	1	*	0,5	0	1	*	0	1	1		1	0	1	*	1	0,5	1
C. gingivalis	0	1	1		0	1	1		0	1	0		0	1	1		0	1	1		0,5	1	1
S.oralis	1	1	2	*	0	0	0		1	0	0		1	1	1		1,5	0	1	*	0	1	1
S.sanguinis	0	1	1		0	1	1		0	0	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1
S.gordonii	0	1	1		0	0	0		0	0	0		0	1	0	*	0	0	0		0	1	0
S.mitis	0	1	1		0	0	0		0	0	0		0	1	0	*	0	0	0		0	1	0
V.parvula	0	2	3		0	1	1	*	0	1	1		0	1	1	*	0	1	1		0	1	1,5
F.nucleatum	0	2	1	*	0	2	1	*	0	2	1	*	0	2	1	*	0	2	1	*	0	2	1
F.periodonticum	0	0	1	*	0	0	1	*	0	0	1	*	1	0	1	*	0	0	1	*	0	0	1
S.constellatus	1	1	1,5	*	0	1	1		0,5	1	1		1	1	1	*	1	1	1	*	0	1	1
P.intermedia	0	0	2	*	0	0	1	*	1	0	1	*	1	0	1	*	1	0	1	*	0	0	1
P.micra	1	1	1		0	0	1		0	0	1		0	1	1		1	1	1		1	1	1
P.gingivalis	0	1	1	*	0	0	1	*	0	0	1	*	0	0	1	*	0	0	1	*	0	1	1
T.denticola	0	1	2	*	0	1	0,5		0	1	1		1	1	1		1	1	1	*	0	1	1
T.forsythia	1	1	1	*	0	1	1		1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1
B.fragilis	0	1	1	*	0	1	1		0,5	1	1		1	1	1	*	0	1	1		0,5	1	1
E.faecalis	0	2	1		0	1	1		0	2	1		0	1	1	*	0	1	1		0	1	1
L.casei	0	0	2	*	0	0	1	*	0	0	1	*	0	0	1	*	0	0	2	*	0	0	2
N.mucosa	0	0	1		0	0	1		0	0	1	*	0	0	1		0	0,5	1	*	0	0	1
P.putida	0	1	1	*	0	1	0	*	0	1	0		0	1	1		0	1	0		0	1	0,5
P.aeruginosa	0	1	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0
P.melaninogenica	0	1	1	*	0	1	1	*	0	1	1	*	0	1	1	*	0	1	1	*	0	1	1
P.endodontalis	0	0,5	1	*	0	0	1	*	0	0	1	*	0	1	1	*	0	0	1	*	1	0	1
S.mutans	0	1	3	*	0	0	1		1	1	1		2	1	1		1	1	1	*	0	1	3
S.parasanguinis	0	0	2	*	0	0	1	*	0	0	1	*	1	0	1	*	0	0	1	*	0,5	0	1
S.sobrinus	0,5	1	2	*	0	0	1	*	1	0	1	*	1	1	1	*	1	1	1	*	1	1	1
S.salivarius	0	0	2	*	0	0	1	*	0	0	1	*	0	0	1,5	*	0	0	1	*	0	0	2
S.aureus	0	0	1	*	0	0	0	*	0	0	0	*	0	0	1	*	0	0	0	*	0,5	0	1
S.pasteuri	0	2	2	*	0	1	1	*	1	1	1	*	1	1	2	*	0	1	1	*	1	1	2
S.moorei	0	1	2	*	0	1	1	*	0	1	2	*	0	1	2	*	0	1	2	*	0	1	2

De modo geral, o sítio “a” apresentou escores significativamente mais elevados que o sítio “f” para todas as espécies microbianas ($p < 0,05$). A exceção foi apenas para o *S. aureus* ($p = 0,115$; Tabela 5). Foi notória a presença de micro-organismos periodontopatogênicos em ambos os sistemas de encaixe. Dentre esses, estão as espécies *P. intermedia*, *T. denticola* e *T. forsythia*, com escores elevados (≥ 2) aos 12 meses de avaliação. Já o *F. nucleatum* e o *S. pasteurii* apresentaram escore 2 aos 3 meses, porém com redução na contagem no período seguinte (12 meses). Outras espécies com menor potencial patogênico, como o *S. oralis*, *S. sanguinis*, *V. parvula*, *L. casei*, *S. mutans*, *P. melanogênica*, *S. parasanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. aureus* e *S. moorei*, também apresentaram escores elevados. *S. oralis*, *P. intermedia*, *P. melanogênica*, *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentaram redução nos escores bacterianos do *baseline* aos 3 meses.

Tabela 5- Medianas dos escores relacionados aos sítios “a”- componente macho do encaixe e “f”- componente fêmea do encaixe, nos três períodos experimentais e para cada um dos sistemas de encaixe testados. FDR: valores de “p” ajustados para comparações múltiplas pelo método “Benjamini-Hochberg” *false discovery rate*, após ANOVA F.

Encaixes Períodos Sítios	Locator						Retentive Anchor						FDR
	Baseline		3 m		12 m		Baseline		3 m		12 m		
	a	f	a	f	a	f	a	f	a	f	a	f	
Espécies													
Aa a	0	0	1	0,5	1	1	0	0	1	0,5	1	0,5	0.0001
Aa b	0,5	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0.0002
E corrodens	0	1	1	0,5	1	1	0	0	1	0,5	1	1	0.0001
C. gingivalis	0	0	1	1	1	1	0	0,5	1	1	1	1	0.0001
S oralis	1	1,5	1	1	2	1	1	1	1	0	2	1	0.0001
S sanguinis	0	1	2	1	1	1	0,5	0	1	1	1	1	0.0001
S gordonii	0	0	1	0	1	0	0,5	0	1	1	1	0	0.0001
S mitis	0	0	1	0,5	0	0	0,5	0	0,5	0	1	0	0.0001
V parvula	0	0	2	1	2	1	0	0,5	1	1	2	1	0.0001
F nucleatum	0	0	2	2	1	1	0	0	2	2	1	1	0.0488
F periodonticum	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0.0025
S constelatus	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1,5	1	0.0001
P intermedia	0,5	1	0	0	2	1	0	1	0	0	2	1	0.0001
P micra	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.0001
P gingivalis	0,5	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0.0001
T denticola	0	1	1	1	2	1	0,5	0	1	1	2	1	0.0001
T forsythia	0,5	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0.0007
B fragilis	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0.0002
E fecalis	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0.0283
L casei	0	0,5	1	1	2,5	2	0	0	1	0	2	2	0.0001
N. mucosa	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0.0001
P. putida	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0.0001
P. aeruginosa	0	0	1	0,5	1	0	0	0	1	0	0,5	0	0.0001
P. melaninogenica	0	1	1	0	2	1	0	0,5	1	0	2	1	0.0001
P. endodontalis	0	0	1	0,5	1	1	0	0	0	0	1	1	0.0001
S. mutans	1	2	1	1	2	2	0,5	1	1	0	2	1	0.0001
S. parasanguinis	0	0,5	2	1	2,5	2	0	0,5	2	1	2	2	0.0001
S. sobrinus	0,5	1	1	0	1,5	1	0	0	0	0	2	1	0.0001
S. salivarius	0	1	1	1	3	1	1	0	1	1	2	1	0.0001
S. aureus	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	1,5	0.1155
S. pasteurii	0	0,5	2	2	1	1	0	0	1,5	1,5	1	0,5	0.0001
S. moorei	0	0	1	1	2	2	0	0,5	1	1	2	2	0.0001

Quando os micro-organismos foram agrupados de acordo com a classificação proposta por Socransky et al. (1998), por cores segundo o grau de patogenicidade, pôde-se observar que o conjunto dos escores microbianos revelou um padrão de contaminação que obedece a sequência cronológica do estudo, isto é, que ocorreu um aumento aparente no acúmulo de biofilme nas superfícies estudadas ao longo do tempo, embora esses dados não tenham sido analisados estatisticamente (Figura 15).

Figura 15- Valores médios dos micro-organismos avaliados nos três períodos experimentais, agrupados segundo as cores de patogenicidade propostas por Socransky et al. (1998). Os micro-organismos avaliados que não se enquadraram em nenhum desses grupos foram agrupados na categoria “outros”.

A análise por meio do modelo ANOVA F com efeitos fixos revelou que os resultados podem ser organizados segundo a ordem decrescente: $a > g > d > f > e > c > b$ em relação aos escores microbianos encontrados nos diferentes sítios analisados (Tabela 4).

A Figura 16 ilustra esta tendência em função dos escores médios encontrados. O sítio “a” (componente macho do encaixe) foi o que exibiu a maior frequência de espécies bacterianas e os maiores escores, seguida do sítio “g” (base da sobredentadura em torno do encaixe); sítio “d” (plataforma do implante); sítio “f” (componente fêmea do encaixe); sítio “e” (rosca do componente macho); sítio “c” (superfície interna do implante) e sítio “b” (sulco peri-implantar).

Figura 16- Valores médios dos escores microbianos de cada sítio avaliado nos três períodos experimentais.

6. *Discussão*

6. DISCUSSÃO

A proposta principal deste estudo foi a de avaliar qualitativa e quantitativamente o biofilme formado sobre as diversas superfícies associadas à dois sistemas de retenção por encaixe para sobredentaduras retidas por implantes, um esférico (RA) e outro de geometria cilíndrica (Loc), ao longo do tempo.

Considerando todos os sítios, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois sistemas de encaixe para os micro-organismos avaliados, com exceção da espécie *S. constellatus*, que apresentou maiores escores para o sistema de encaixe RA em comparação ao Loc, 12 meses após o início do estudo. Quando os sítios foram analisados individualmente, *S. constellatus* e *P. micra* foram encontrados em maiores quantidades na rosca do componente macho do sistema de encaixe RA, e o *S. sanguinis* na superfície externa do macho do sistema Loc. Ainda, comparações entre os componentes macho e fêmea dos sistemas de encaixe (“a” e “f”, respectivamente), em cada tempo e para cada tipo de encaixe, revelaram maior concentração microbiana no sítio “a”.

A ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os dois sistemas de encaixe para diversas espécies microbianas avaliadas neste estudo, respalda os resultados de estudos anteriores (CUNE; PUTTER, 1994; AMBARD, 2002; KRENNMAIR et al., 2012), que reportaram similaridades entre a condição clínica peri-implantar associada aos diferentes sistemas de encaixe: individuais, dos tipos esférico e cilíndrico, e do tipo barra.

A diferença encontrada para o micro-organismo *S. constellatus* parece estar associada à dimensão deste micro-organismo e à morfologia dos componentes do encaixe RA. Embora a adaptação dos componentes machos dos sistemas de encaixe aos implantes não tenha sido avaliada neste estudo, é possível que o resultado tenha sido influenciado por este fator. Devido à maior altura que o componente macho do encaixe RA possui em relação ao sistema Loc, a incidência de forças laterais e oblíquas geram maior estresse na interface implante/ encaixe com consequente prejuízo na capacidade de vedamento do sistema (STEINEBRUNNER et al., 2005; TRAKAS et al., 2006; PETROPOULOS; MANTE, 2011), o que pode acarretar em micromovimentos, favorecendo a ocorrência de um efeito de “bombeamento” de microrganismos para a câmara interna do implante (STEINEBRUNNER et al., 2005; DO NASCIMENTO et al. 2012; DO NASCIMENTO et al. 2015). Sobredentaduras completas retidas por implantes concentram as forças resultantes do ato mastigatório na região dos pilares dos dois implantes anteriores e fibromucosa (BARÃO et

al., 2013) e, portanto, podem intensificar esse efeito. Embora as concentrações de outras espécies encontradas no sítio “e” possam ter sido também influenciadas por diferenças na precisão da adaptação entre os dois sistemas, é provável que o impacto desse fator sobre a espécie *S. Constellatus*, e secundariamente à *P. micra*, tenham sido maiores devido às dimensões comparativamente reduzidas destas espécies (MURDOCH, 1998; WHILEY et al., 1999). Assim, o menor tamanho destes micro-organismos pode ter facilitado a penetração através da interface implante/encaixe e a colonização das roscas dos componentes, resultando em escores mais elevados para esse sítio. Explicação semelhante sustenta o achado de maiores escores identificados nas superfícies internas dos implantes (sítio “c”) para os micro-organismos *P. gingivalis* e *P. endodontalis* também no sistema de encaixe RA. As possíveis falhas no vedamento e o efeito de “bombeamento” relatados podem fazer com que bactérias, fluidos e nutrientes se movam a partir do sulco peri-implantar (COSYN et al., 2009) através da interface implante-pilar (DO NASCIMENTO et al., 2012) até a região interna ao implante, que por se tratar de uma área de difícil penetração de oxigênio e impossibilidade de higienização, torna o ambiente favorável para o crescimento bacteriano anaeróbico (PERSSON et al. 1996; MARSH, 2004; SOCRANSKY; HAFFAJE, 2005; COSYN et al., 2009), característica esta dos dois tipos de *Porphyromonas* encontrados e também das espécies *S. Constellatus* e *P. micra*. Pôde-se notar que, embora as diferenças na colonização entre os encaixes foram apontadas para diferentes espécies nos sítios “c” e “e”, o sistema de encaixe RA apresentou nessas superfícies internas, e aparentemente “protegidas” espécies pertencentes aos complexos de maior patogenicidade de Socransky et al. (1998): sendo o *S. constellatus* e *P. micra* (complexo laranja), *P. gingivalis* (complexo vermelho) e a *P. endodontalis*, não pertencente a um complexo mas com características de alta patogenicidade. A presença destes micro-organismos nesses sítios pode ser indicativa de maior falha no vedamento e consequente infiltração no componente macho do sistema de encaixe RA, além da formação de um ambiente propício à colonização de espécies anaeróbicas no interior dos implantes, o que torna preocupante já que essas espécies estão associadas à infecção e destruição dos tecidos de suporte e por se encontrarem em posicionamento estratégico, podem vir a contaminar o ambiente peri-implantar subjacente. O sulco peri-implantar (sítio “b”) também apresentou escores maiores no sistema RA para as espécies *S. gordonii* e *L. casei*, embora, devido às reduzidas concentrações bacterianas encontradas neste sítio, os escores podem ter apresentado estas diferenças quando comparadas aos predominantes escores 0 detectados, sendo esta uma falha apontada na metodologia *Checkerboard*, onde a ausência de

sinal não é indicativa de ausência celular no sítio investigado, já que o método não é capaz de identificar concentração bacteriana menor que 10^4 .

A espécie *S. sanguinis*, vista com maiores escores no sistema de encaixe Loc na superfície do componente macho (sítio “a”), é parte da flora oral normal como uma das pioneiras no processo de adesão inicial. Em estudo in vitro, foi identificada uma elevada capacidade de adesão desse micro-organismo na superfície do titânio, com cerca de um terço entre células mortas (HAUSER-GERSPACH et al. 2007). Como o método DNA Checkerboard utilizado neste estudo não é capaz de distinguir a vitalidade celular, elevados escores podem estar apontando concentrações bacterianas entre células vivas e mortas. Contudo, não foi possível entender os motivos que levaram às diferenças entre os encaixes, já que ambos são confeccionados em titânio. As diferenças podem estar relacionadas à composição da liga metálica ou mesmo à morfologia dos sistemas.

Neste estudo, maiores escores microbianos foram vistos no sítio “a”, seguidos dos sítios “g”, “d”, “f”, “e”, “c” e “b”. Mackie et al. (2011) relataram que pela avaliação clínica dos componentes, era possível observar que especificamente para o sistema de encaixe Loc havia o acúmulo regular de restos alimentares e de biofilme internamente à concavidade presente no componente macho. Certas características na morfologia e na composição dos sistemas podem ser as responsáveis pelas elevadas quantidades microbianas encontradas nestes sítios, já que a dificuldade de higienização contribui para a retenção de biofilme, além de que materiais que apresentam rugosidade e porosidade superficial, são capazes de proporcionar um aumento na adesão e proliferação microbiana (DIKBAS; KOKSAL; CALIKKOCAOGLU, 2006; TEUGHEL et al., 2006; SACHDEO; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2008; PERACINI et al., 2010; ABDUL-KAREEM, 2012; MIRANZI et al., 2015; KÜRKÇÜOĞLU et al., 2016). Entretanto, o resultado obtido não foi o esperado: onde os componentes fêmea, tanto do encaixe Loc, pelo dispositivo de retenção em *nylon*, quanto no encaixe RA devido às entranhas das garras flexíveis em ouro, fossem capazes de reter uma quantidade microbiana maior, ainda mais pela adjacência e possível interferência da base da sobredentadura confeccionada em resina acrílica (CORNELIUS et al., 2002; LI et al., 2012; KÜRKÇÜOĞLU et al., 2016). Foi observado no presente estudo que a superfície dos componentes macho apresentaram a maior retenção microbiana, superior às concentrações encontradas nos componentes fêmea. Para o sistema RA, a diferença na composição dos componentes macho e fêmea, em liga titânio e de ouro, respectivamente, não parecem interferir na adesão de biofilme (ISMAIL et al., 2016). Já quando investigadas as

características de superfície, ainda que o desgaste encontrado nas fêmeas é cerca de 4 vezes mais extenso do que o desgaste observado nos componentes macho (FROMENTIN et al., 2011), as mudanças nestes não são consideradas desprezíveis, até porque as ranhuras criadas no equador protético da esfera do macho durante os movimentos de inserção e remoção, são mais significativas quando as garras flexíveis da fêmea ainda não perderam retenção, como vista aos 12 meses em função (FROMENTIN et al., 2012). Assim, o uso clínico, leva a perda de partículas metálicas da fêmea e do macho, bem como o deslocamento de material por deformação plástica de ambas as superfícies que deslizam entre si, sob pressão (FROMENTIN et al., 2011). Diante disto, a rugosidade superficial criada no macho pode ser um fator responsável pela maior concentração bacteriana encontrada nesta superfície, pois favorece a adesão bacteriana (BOLLEN et al. 1996; YODA et al., 2014). Já no sistema de encaixe Loc, onde os componentes responsáveis pela retenção são confeccionados por diferentes classes de materiais: um polimérico (*nylon*) na fêmea e outro metálico (liga de titânio) no macho, a distinta quantificação bacteriana encontrada, maior no macho que na fêmea, pode ter sua explicação relacionada às características de superfície destes materiais, como a energia superficial e a rugosidade influenciando a adesão e colonização bacteriana nestes biomateriais (HALLAB et al., 2001; CORNELIUS et al., 2002). Os metais exibem uma força de aderência bacteriana quase cinco vezes maior do que os materiais poliméricos, devido à energia superficial ser proporcional à força de adesão e proliferação celular (HALLAB et al., 2001). Assim, a energia superficial pode ser um determinante ainda mais importante que a rugosidade superficial para direcionar a adesão e a colonização celular em materiais utilizados no ambiente oral (HALLAB et al., 2001; PONSONNET et al., 2003). Os componentes macho avaliados, Loc e RA, são ambos confeccionados em liga de titânio, metal biocompatível com características conhecidas relacionadas à facilidade de osseointegração, porém, em contrapartida, apresentam também facilidade na adesão bacteriana (YOSHINARI et al., 2000; NEOH et al., 2012), sendo este um fator importante na compreensão dos elevados escores encontrados na superfície deste material.

Os micro-organismos anaeróbicos facultativos que se destacaram por apresentar os maiores escores microbianos no sítio “a”, são prevalentes na flora bacteriana oral normal, porém podendo estar associados à patologia peri-implantar caso haja desequilíbrio entre as espécies e prevalência individual (LEE et al., 1999; SOCRANSKY; HAFFAJE, 2005; TABANELLA; NOWZARI; SLOTS, 2009; MOMBELLI; DE´CAILLET, 2011). Entretanto, espécies anaeróbicas estritas, que possuem grande relação aos sítios periodontais doentes, apresentaram escores microbianos semelhantes aos anaeróbicos facultativos no mesmo sítio,

indicando que o biofilme formado no componente macho abrigava uma maior concentração bacteriana, tanto de espécies colonizadoras iniciais, quanto de espécies de colonização tardia e metabolismo ausente de oxigênio, com maiores quantidades microbianas vistas no período de 12 meses, período este compatível com um maior grau de deformidade e ranhuras criadas nos componentes (BOLLEN et al. 1996; FROMENTIN et al., 2011; YODA et al., 2014). Esses patógenos periodontais, podem ser identificados a partir de amostras em indivíduos saudáveis, entretanto tipicamente como um componente menor do biofilme (LEE et al. 1999; PASTER et al., 2001; TABANELLA; NOWZARI; SLOTS, 2009; JERVØE-STORM et al., 2015). Foi relatado que os implantes que falham abrigam números significativamente elevados de *P. intermedia* e *Fusobacterium spp.* (MOMBELLI et al., 1987; JERVØE-STORM et al., 2015). Ainda, foi observada a frequência da espécie *P. intermedia*, com maiores escores vistos aos 12 meses, sugerindo uma associação sinérgica entre essa e o *S. constellatus* o que favorece seu crescimento, conforme propõe o trabalho de Shinzato e Saito (1994). Tal associação pode estar relacionada à supressão da atividade de neutrófilos e ao desenvolvimento de processos infecciosos. Entretanto, a ausência de infecções bucais no presente estudo sugere que a quantidade presente dessas duas espécies talvez não tenha sido suficientemente alta para dar início à doença. Os escores medianos de 1,5 para o *S. constellatus* e de 2 para a *P. Intermedia* suportam essa hipótese.

O sítio “g” foi apontado neste estudo como o segundo em maior retenção e colonização microbiana. Apesar da grande frequência entre as espécies avaliadas, as identificadas com os escores mais elevados foram aquelas descritas como comumente presentes no ambiente oral (LEE et al., 1999; SOCRANSKY; HAFFAJE, 2005; TABANELLA; NOWZARI; SLOTS, 2009; MOMBELLI; DE’CAILLET, 2011). A retenção microbiana na base acrílica da sobredentadura, apresentou resultado previsível e compatível com a literatura, já que por se encontrar em íntimo contato com a mucosa do rebordo residual, e devido às suas características de rugosidade e porosidade superficial, são capazes de abrigar elevadas concentrações microbianas (KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; TEUGHELIS et al., 2006; LI et al., 2012; ELSYAD; ERRABTI; MUSTAFA, 2015).

Considerando os sítios investigados, a plataforma dos implantes (sítio “d”) foi vista como o terceiro sítio em contaminação bacteriana. Sua explicação pode ser dada pela presença de um inevitável *microgap* formado na interface implante/ encaixe, que favorece o acúmulo microbiano (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; ALOISE et al., 2010). Devido à sua proximidade aos tecidos peri-implantares, a colonização bacteriana nesta região é

preocupante, já que a microinfiltração permite o intercâmbio de ácidos, enzimas, bactérias e seus produtos metabólicos que podem afetar diretamente o tecido periodontal subjacente, e acarretar em sangramento, inchaço e odor (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; DO NASCIMENTO et al., 2008; DO NASCIMENTO et al., 2009; HARDER et al., 2010; COSYN et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2012; PASSOS et al. 2013; JERVØESTORM et al., 2015; NASSAR; ABDALLA, 2015; DO NASCIMENTO et al., 2015; TALLARICO et al., 2017). Já no sítio “c”, correspondente à superfície interna ao implante e tida como de difícil acesso, também foi detectada a colonização bacteriana. O implante utilizado no estudo foi de conexão cônica interna (Straumann standard, Ø4,1 mm; Straumann®, Suíça), onde o encaixe é adaptado por justaposição das paredes axiais e retido por fixação mecânica por um parafuso. A câmara interna do implante fica então protegida pela justaposição do encaixe, entretanto, lacunas nesta interface são inevitáveis mesmo para este tipo de conexão, que é conhecida por propiciar melhor vedamento (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; ALOISE et al., 2010). Desta forma, o espaçamento, que pode chegar a 5 µm, representa porta de entrada para os micro-organismos que são potencialmente permeáveis, já que uma grande variedade de espécies da flora bacteriana oral possui pequenas dimensões, variando de 0,1 - 10 µm de diâmetro (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; COSYN et al., 2009; PASSOS et al. 2013). O sítio “e”, rosca do componente macho, apresentou contaminação semelhante à do sítio “c”, resultado esperado já que ambos os sítios se encontravam justapostos durante o uso clínico. Os maiores escores bacterianos observados no sítio “e”, provavelmente ocorreram em virtude da facilidade de coleta das amostras pela manipulação externa à cavidade oral do sistema macho do encaixe.

O padrão de crescimento mais acentuado e escores mais elevados associados à espécie *V. parvula* nos três períodos experimentais avaliados, quando comparados aos das outras espécies investigadas, sugere que o tempo decorrido no estudo parece ter sido suficiente para promover a coagregação e proliferação deste micro-organismo, já que ele depende de espécies colonizadoras iniciais por não apresentar capacidade de adesão direta às superfícies duras. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a espécie anaeróbica estrita *Veillonella parvula*, a partir de amostras de biofilme subgengival, apresentou forte coagregação com espécies de *Actinomyces*, *S. sanguinis* e outras bactérias comumente presentes no biofilme (HUGHES et al., 1988; KOLENBRANDER; LONDON, 1993). O crescimento da *Veillonella spp.* ocorre sob influência de espécies cariogênicas, com a utilização do ácido láctico produzido por essas espécies como fonte de energia. Assim, quando o biofilme dental possui grande quantidade de bactérias acidogênicas, como *S.*

mutans, maior substrato é formado para as *veillonellas* e estas passam a proliferar. Além disso, uma placa com maior espessura reduz a exposição dos microrganismos do seu interior ao oxigênio, o que favorece as *Veillonella spp.* Elas possuem capacidade de coagregação aos estreptococos, estabelecendo um relacionamento mutualista (HUGHES et al., 1988; KOLENBRANDER; LONDON, 1993; LUPPENS et al., 2008). A espécie é descrita como não patogênica, embora quando presente em uma comunidade bacteriana, o comportamento das espécies pode sofrer alteração na expressão genética e no potencial de virulência (LUPPENS et al., 2008). Como no estudo de Mashima et al. (2015), onde a *V. parvula* foi a *Veillonella* mais frequente e predominante isolada de sítios com doença periodontal, tendo sido associada ao estado de periodontite crônica. Em nosso estudo, o crescimento da *V. parvula* foi acompanhado pelo da espécie *S. mutans*, onde esta, inicialmente, mostrou escores médios maiores no *baseline*, provavelmente por se tratar de um micro-organismo colonizador inicial, e semelhante colonização à espécie *V. parvula* nos períodos 3 e 12 meses, provavelmente pela característica mutualista que exercem, chegando ambas as espécies a apresentar os escores mais elevados do estudo (escore 3; Tabela 3). O sítio “a” (componente macho do encaixe) apresentou o maior padrão de crescimento da espécie *V. parvula*, seguido do sítio “g” (base da sobredentadura em torno do encaixe), o que está de acordo com os resultados de Theilade, Budtz-Jorgensen e Theilade (1983), que encontraram a *V. parvula* como a espécie gram-negativa mais frequente, além de uma predominância de micro-organismos gram-positivos, associados às bases acrílicas de dentaduras suportadas por mucosas saudáveis.

A identificação e quantificação dos estreptococos estiveram em consonância com a evidência relatada na literatura, onde a espécie *Streptococcus mutans* foi a que apresentou a maior frequência bacteriana vista no estudo. Os *Streptococcus spp.* são predominantemente identificados em sítios peri-implantares saudáveis (LEE et al. 1999; PASTER et al., 2001; LI et al., 2004; FURST et al., 2007; TABANELLA; NOWZARI; SLOTS, 2009). Junto aos *Actinomyces*, contituem cerca de 90% dos tipos de células viáveis no biofilme inicial (KOLENBRANDER; LONDON, 1993). Outra espécie com semelhante frequência no estudo foi o *Staphylococcus pasteurii*. A presença dos estafilococos na cavidade oral foi demonstrada, em sítios saudáveis e doentes, estando associada às superfícies acrílicas dos aparelhos protéticos, entretanto ainda são escassas as informações a respeito da atuação destes na comunidade bacteriana do biofilme. Maior atenção geralmente é dada à espécie *Staphylococcus aureus*, devido ao seu maior potencial patogênico e sua afinidade ao titânio

(SMITH; JACKSON; BAGG, 2001; HARRIS; RICHARDS, 2004; STOODLEY et al., 2005), onde no presente estudo mostrou discreto aparecimento.

O *Fusobacterium nucleatum* esteve frequente, apresentando escores mais elevados aos 3 meses, de forma semelhante em todos os sítios avaliados, atingindo escores medianos 2. Foi possível observar coerência no mecanismo relatado entre coagregação e a presença de certas bactérias no biofilme, já que o micro-organismo é destacado por fornecer um sistema de suporte para a colonização e sobrevivência de outras bactérias, como realizando a ligação entre os colonizadores iniciais e tardios (KOLENBRANDER; LONDON, 1993). Como os colonizadores tardios não aderem à hidroxiapatita coberta por saliva ou aderem de uma forma não específica, eles coagregam com outros micro-organismos, principalmente com fusobactérias, que formam uma ponte com colonizadores iniciais. Este resultado pode sugerir que 3 meses foi o tempo em que os colonizadores iniciais apresentaram um nível de organização suficiente para possibilitar a coagregação de uma considerável quantidade da espécie. Nesta ordem, o *Fusobacterium nucleatum*, pela exposição de adesinas, permitiram aos colonizadores tardios se ligar à comunidade bacteriana, sendo aos 12 meses observado a redução do *F. nucleatum* e maior incidência de espécies periodontopatogênicas: *S. constellatus*, *P. intermedia* e *T. denticola*, no sítio “a”.

É importante notar que, incluindo aqueles com maior potencial patogênico, todos os micro-organismos estiveram identificados nos sítios investigados para ambos os tipos de encaixe, alguns em menores quantidades, outros com colonização mais consistente. Com a rotina de higienização oral mantida pelos participantes, quantidades microbianas foram encontradas para cada espécie obedecendo a sequência cronológica, onde o período inicial – *baseline* - apresentou uma menor quantidade bacteriana, com aumento progressivo e maiores quantidades observadas no último período estudado, aos 12 meses. A microbiota parece ter sido capaz de se organizar a partir do mecanismo inicial de adesão e formar um biofilme mais espesso contendo com maior número de espécies patogênicas com o tempo (KOLENBRANDER; LONDON, 1993; LI et al., 2004; SOCRANSKY; HAFFAJE, 2005). Um aumento gradativo nos escores microbianos nas superfícies metálicas recém introduzidas na cavidade oral parece ter ocorrido de forma semelhante ao reportado por Lee et al. (1999), inclusive em relação à colonização de patógenos periodontais, ainda que observada a grande variação individual (ZAMBON et al., 1994; TANNER et al. 1997; MOMBELLI, 1998; DE ARAÚJO NOBRE et al., 2015).

Foi perceptível também a ocorrência do fenômeno de maturação do biofilme, onde além dos dois tipos de sistemas de encaixes seguirem com o aumento da concentração

bacteriana ao passar do tempo, as espécies de maior potencial patogênico, agrupadas nos complexos laranja e vermelho, demonstraram uma presença mais elevada no último período avaliado, assim como apontaram os trabalhos de Lee et al. (1999) e Jervøe-Storm et al. (2015). Esta característica observada se apoia ao conceito de Marsh e Bradshaw (1999), em que as bactérias não existem como entidades independentes, mas sim como uma comunidade microbiana integrada, com funcionamento coordenado e organização espacial e metabólica. Diante da criação de um ambiente com alteração dos gradientes de pH e oxigênio, resultante do metabolismo de espécies aeróbicas com função colonizadora inicial, como as pertencentes aos complexos verde, amarelo e roxo, mecanismos de coagregação permitem a formação de um habitat com variedade microbiológica mais ampla, onde se obtém um ambiente mais propício à colonização de espécies facultativamente anaeróbicas ou estritas, composto também pelas espécies pertencentes aos complexos laranja e vermelho (MARSH, 2004; SOCRANSKY; HAFFAJE, 2005). Embora este evento faça parte do mecanismo de organização do biofilme, uma condição de doença nos tecidos peri-implantares pode ser estabelecida caso a carga microbiana das espécies patogênicas se torne prevalente (ZAMBON et al. 1994; BOLLEN et al. 1996; TANNER et al. 1997; SALVI et al. 2008; JERVØE-STORM et al., 2015). Quanto maior o tempo neste processo de auto-organização, mais eficazes as associações se tornam, tendendo a mostrar um maior grau de interação entre os micro-organismos anaeróbicos, com organização, proliferação por adaptação biológica, diversificação e complexidade, ganhando características com perfil patogênico (CALDWELL et al. 1997; SHAPIRO, 1998; MARSH; BOWDEN, 2000; SOCRANSKY; HAFFAJE, 2005). Este constitui um risco aos usuários de sobredentaduras, independentemente do tipo de sistema de encaixe utilizado, ressaltando a responsabilidade do profissional protesista no encargo de avaliar atentamente o paciente portador de próteses retidas por implantes, de forma periódica e constante, sempre reforçando os cuidados relativos ao controle da microbiota, conforme proposto por Ambard et al. (2002) e Krennmair et al. (2012) tornando o usuário consciente e motivado no hábito da higienização oral. Entretanto, apesar do perceptível fenômeno de maturação dos biofilmes analisados, não foram diagnosticadas doenças peri-implantares ou da mucosa oral ao longo do estudo (dados não publicados), o que indica que apenas a presença de espécies patogênicas não é suficiente para dar origem à doença e/ou que as concentrações dessas espécies precisam atingir um limite mínimo para que a doença se desenvolva. Outros fatores, tais como resistência do hospedeiro, fatores inerentes ao envelhecimento, sexo, tipo racial, fatores hormonais, condições locais, etc, têm também

participação fundamental no estabelecimento do estado de saúde/doença do indivíduo (ZAMBON et al., 1994; MOMBELLI, 1998; DE ARAÚJO NOBRE et al., 2015).

Por meio da metodologia DNA Checkerboard utilizada neste estudo fomos capazes de identificar e quantificar 32 espécies microbianas de amostras em diversos sítios. Esta técnica molecular de diagnóstico permite a identificação de até 45 micro-organismos e análise de maior número de amostras de forma rápida em um único processamento. É reportado como sendo um método mais sensível que o método convencional de cultura bacteriana apresentando vantagens na identificação e quantificação de bactérias associadas a componentes de implantes e tecidos peri-implantares. Entretanto, enquanto o método de cultura convencional permite apenas a quantificação de células bacterianas viáveis, a hibridização de DNA detecta células viáveis e não viáveis, podendo aumentar a ocorrência de resultado falso-positivo (BARBOSA et al. 2009). Além do escore 0, ausência de sinal, o mínimo identificado neste estudo foi o escore 1, valor este relativo a menos de 10^5 células bacterianas, sendo esta uma outra limitação do método, pois não indica com precisão a quantidade de células microbianas. Ainda, a ausência de sinais não indica ausência de células bacterianas, pois o método não é capaz de identificar concentração bacteriana entre 1 e 10^4 .

Os resultados obtidos neste trabalho têm como relevância clínica a identificação de uma gama de espécies colonizando as superfícies de ambos os sistemas de encaixe, incluindo a superfície interna dos implantes, o que pode estar indicando falha na capacidade de vedamento, principalmente para o sistema de encaixe RA. Ainda, que o padrão de maturação do biofilme observado ao longo do tempo de estudo, inclusive com o aumento na concentração de espécies com maior potencial patogênico no sítio “a”, mesmo com escores não tão elevados, pode ser indicativo de um fator de risco. Devido à proximidade dos sítios investigados e a mucosa oral e região peri-implantar de pacientes reabilitados com sobredentaduras, maior atenção deve ser atribuída pelo profissional já que alguns autores previamente relataram que reações de tecidos moles podem ocorrer em um ambiente microbiologicamente contaminado (THEILADE; BUDTZ-JORGENSEN; THEILADE, 1983; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; CAMPOS et al., 2008; SACHDEO; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2008).

Finalmente, os resultados deste estudo indicam a necessidade de novas investigações que possam ajudar a esclarecer melhor os fenômenos envolvidos nas interações entre as espécies microbianas que colonizam as superfícies de implantes dentários, próteses e componentes protéticos, e as condições determinantes para o estado de saúde ou doença.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que na comparação da contaminação microbiana de dois sistemas de encaixe para sobredentaduras mandibulares retidas por implantes:

- De modo geral, a quantidade de micro-organismos no biofilme presente nas superfícies dos sistemas de encaixe RA e Loc, e o perfil da microbiota observada ao longo de 12 meses, foram semelhantes.
- Os sistemas de encaixe para sobredentaduras avaliados neste estudo exercem influência seletiva sobre o padrão de colonização das espécies bacterianas *S. constellatus*, *P. micra* e *S. sanguinis*.
- No sistema de encaixe Loc, a espécie *S. sanguinis* apresentou maior colonização na superfície externa do componente macho.
- No sistema de encaixe RA, a região interna dos implantes apresentou contaminação bacteriana anaeróbica, indicando que os componentes macho falham em promover o vedamento da interface implante/ encaixe.
- A superfície dos componentes macho dos sistemas de encaixe retêm maior quantidade de micro-organismos que a superfície dos componentes fêmea para os sistemas RA e Loc.
- Todas as espécies microbianas selecionadas para o estudo foram identificadas nos sítios investigados, para ambos os tipos de encaixe, aumentando em concentração durante o período experimental de 12 meses.

Referências

REFERÊNCIAS

ABELSON, D.C. Denture plaque and denture cleansers. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 45, n. 4, p. 376-379, 1981.

ABDUL-KAREEM, S.A.L. Changes in oral flora of newly edentulous patients, before and after complete dentures insertion. **Journal Baghdad College of Dentistry**, v. 24, n.1, p. 65-69, 2012.

ALOISE, J.P.; CURCIO, R.; LAPORTA, M.Z.; ROSSI, L.; DA SILVA, A.M; RAPOPORT, A. Microbial leakage through the implant-abutment interface of morse taper implants in vitro. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 328–335, 2010.

AMBARD, A.J.; FANCHIANG, J.C.; MUENINGHOFF L.; DASANAYAKE, A.P. Cleansability of and patients' satisfaction with implant-retained overdentures: A retrospective comparison of two attachment methods. **Journal of American Dental Association**, v. 133, p. 1237–1242. 2002.

BARAN, I.; NALÇACI, R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 49, p. 237–241, 2009.

BARÃO, V.A.R.; DELBEN, J.A.; LIMA, J.; CABRAL, T.; ASSUNÇÃO, W.G. Comparison of different designs of implant-retained overdentures and fixed full-arch implant-supported prosthesis on stress distribution in edentulous mandible – A computed tomography-based three-dimensional finite element analysis. **Journal of Biomechanics**, v. 46, p. 1312–1320, 2013.

BARBOSA, R.E.S.; DO NASCIMENTO, C.; ISSA, J.P.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE JR, R.F. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. **Journal of Prosthodontics**, v. 18, n. 376–381, 2009.

BERGLUNDH, T.; PERSSON, L.; KLINGE, B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 3, p. 197–212, 2002.

BILHAN, H.; GECKILI, O.; SULUN, T.; BILGIN, T. A quality-of-life comparison between self-aligning and ball attachment systems for two-implant-retained mandibular overdentures. **Journal of Oral Implantology**, v. 37, p. 167–173, 2011.

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

BRUNNER, E.; LANGER, F. Non-parametric Analysis of Longitudinal Data (In German). Munich: **Oldenburgverlag**. 1999.

BUSER, D.; JANNER, S.F.; WITTNEBEN, J.G.; BRÄGGER, U.; RAMSEIER, C.A.; SALVI, G.E. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 14, n. 6, p. 839-51, 2012.

CALDWELL, D.E.; WOLFAARDT, G.M.; KORBER, D.R.; LAWRENCE, JR. Do bacterial communities transcend Darwinism? **Plenum Press**, v. 15, p. 105–191, 1997.

CAMPOS, M.S.; MARCHINI, L.; BERNARDES, L.A.S.; PAULINO, L.C.; NÓBREGA, F.G. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 419-424, 2008.

CARLSSON, G.E.; LINDQUIST, L.W.; JEMT, T. Long-term marginal periimplant bone loss in edentulous patients. **Internacional Journal of Prosthodontics**, v. 13, p. 295–302, 2000.

CEPA, S.; KOLLER, B.; SPIES, B.C.; STAMPF, S.; KOHAL, R.J. Implant retained prostheses: ball vs. conus attachments – A randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 10, p. 1–9, 2016.

CORDARO, L.; DI TORRESANTO, M.V.; PETRICEVIC, N.; ROIG JORNET, P.; TORSELLO, F. Single unit attachments improve peri-implant soft tissues conditions in mandibular overdentures supported by four implants. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, p. 536–542, 2012.

CORNELIUS, R.M.; MCCLUNG, W.G.; BARRE, P.; ESGUERRA, F.; BRASH, J.L. Effects of reuse and bleach/formaldehyde reprocessing on polysulfone and polyamide hemodialyzers. **ASAIO Journal**, v. 48, p. 300-11, 2002.

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. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 13, p. 286–295, 2009.

CUNE, M.S.; DE PUTTER, C. A comparative evaluation of some outcome measures of implant systems and suprastructures types in mandibular implant overdenture treatment. **Journal of oral & maxillofacial implants**, v. 9, p. 548-555, 1994.

DANSER, M.M.; VAN WINKELHOFF, A.J.; DE GRAAFF; VAN DER VCLDEN, U. Putative periodontal pathogens colonizing oral mucous membranes in denture-wearing subjects with a past history of periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 22, p. 854-859, 1995.

DE ARAÚJO NOBRE, M.; MANO, A.A.; ROCHA, E.; MALÓ, P. Risk factors of peri-implant pathology. **European Journal of Oral Sciences**, v. 123, p. 131–139, 2015.

DEMLING, A.; DEMLIN, C.; SCHWESTKA-POLLY, R.; STIESCH, M.; HEUER, W. Influence of lingual orthodontic therapy on microbial parameters and periodontal status in adults. **European Journal of Orthodontics**, v. 31, p. 638– 642, 2009.

DE ROSSI, S.S.; SLAUGHTER, Y.A. Oral changes in older patients: A clinician's guide. **Quintessence Internacional**, v. 38, p. 773– 780, 2007.

DIKBAS, I.; KOKSAL, T.; CALIKKOCAOGLU, S. Investigation into the cleanliness of denture in a university hospital. **Internacional Journal of Prosthodontics**, v. 19, p. 294–298, 2006.

DRINNAN, A. J.; GOGAN, C. Bacteremia and dental treatment. **Journal of the American Dental Association**, p. 120:378, 1990.

DO NASCIMENTO, C.; BARBOSA, R.E.S.; ISSA, J P.M.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE JR, R.F. Bacterial leakage along the implant–abutment interface of premachined or cast components. **Internacional Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 37, p. 177–180, 2008.

DO NASCIMENTO, C.; BARBOSA, R.E.S.; ISSA, J.P.M.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE JR., R.F. Use of checkerboard DNA–DNA hybridization to evaluate the internal contamination of dental implants and comparison of bacterial leakage with cast or pre-machined abutments. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, p. 571- 577, 2009.

DO NASCIMENTO, C.; MIANI, P.K.; PEDRAZZI, V.; MULLER, K.; ALBUQUERQUE JR., R.F. Bacterial leakage along the implant– abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, p. 1168–1172, 2012.

DO NASCIMENTO, C.D.; 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. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 6, n. 114, p. 831-838, 2015.

EDWARDSSON, S.; BING, M.; AXTELIUS, B.; LINDBERG, B.; SÖDERFELDT, B.; ATTSTRÖM, R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, p. 143–152, 1999.

ELLEN, R.P. Microbial colonization of the peri-implant environment and its relevance to long-term success of osseointegrated implants. Review. **Internacional Journal of Prosthodontics**, v. 11, p. 433-441, 1998.

ELSYAD, M.A.; ERRABTI, H.M.; MUSTAFA, A.Z. denture base deformation with locator and ball attachments. **Journal of Prosthodontics**. 2015.

FEINE, J.S.; CARLSSON, G.E.; AWAD, M.A.; CHEHADE, A.; DUNCAN, W.J.; GIZANI, S.; HEAD, T.; LUND, J.P.; MACENTEE, M.; MERICSKE-STERN, R.; MOJON, P.; MORAIS, J.; NAERT, I.; PAYNE, A.G.; PENROD, J.; STOKER JR., G.T.; TAWSE-SMITH, A.; TAYLOR, T.D.; THOMASON, J.M.; THOMSON, W.M.; WISMEIJER, D. The McGill consensus statement on overdentures. Montreal, Quebec, Canada. **Internacional Journal of Prosthodontics**, v. 15, p. 413-414, 2002.

FROMENTIN, O.; LASSAUZAY, C.; NADER, S.A.; FEINE, J.; DE ALBUQUERQUE, R.F.JR. **Clinical wear of overdenture ball attachments after 1, 3 and 8 years. Journal of Clinical Oral Implant Research**, v. 22, p. 1270–1274, 2011.

FROMENTIN, O.; LASSAUZAY, C.; NADER, S.A.; FEINE, J.; DE ALBUQUERQUE, R.F.JR. Wear of matrix overdenture attachments after one to eight years of clinical use **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 107, p. 191-198, 2012.

FURST, M.M.; SALVI, G.E.; LANG, N.P.; PERSSON, G.R. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, p. 501–508, 2007.

GOUVOUSSIS, J.; SINDHUSAKE, D.; YEUNG, S. Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. **Journal of oral & maxillofacial implants**, v. 2, p. 666-673, 1997.

HALLAB, N.J.; BUNDY, K.J.; O'CONNOR, K.; MOSES, R.L.; JACOBS, J.J. Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. **TISSUE ENGINEERING**, v. 7, n. 1, p. 55- 71, 2001.

HARDER, S.; DIMACZEK, B.; ACIL, Y.; TERHEYDEN, H.; FREITAG-WOLF, S.; KERN, M. Molecular leakage at implant-abutment connection - in vitro investigation of tightness of internal conical implant-abutment connections against endotoxin penetration. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, p. 427– 432, 2010.

HARRIS, L.G.; RICHARDS, R.G. Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 15, p. 311–314, 2004.

HAUSER-GERSPACH, I.; KULIK, E.M.; WEIGER, R.; DECKER, E.M.; VON OHLE, C.; MEYER, J. Adhesion of Streptococcus sanguinis to dental implant and restorative materials in vitro. **Dental Materials Journal**, v. 26, n. 3, 361-366, 2007.

HEYDECKE, G.; PENROD, J.R.; TAKANASHI, Y.; LUND, J.P.; FEINE, J.S.; THOMASON, J.M. Cost-effectiveness of mandibular two-implant overdentures and conventional dentures in the edentulous elderly. **Journal of Dental Research**, v.84, n. 9, p. 794-799, 2005.

HEUER, W.; KETTENRING, A.; DEMLING, A.; STUMPP, S.N.; GELLERMANN, E.; WINKEL, A.; STIESCH, M. Microbial diversity of peri-Implant biofilms on implant fixed bar and telescopic double crown attachments. **Journal of Oral Implantology**, v 39, n. 6, p. 648-654, 2013.

HUGHES, C.V.; KOLENBRANDER, P.E.; ANDERSEN, R.N; MOORE, L.V.H. Coaggregation properties of human oral Veillonella spp.: relationship to colonization site and oral ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1957-1963, 1988.

HUTNNER, E.A.; MACHADO, D.C.; OLIVEIRA, R.B.; ANTUNES, A.G.F.; HEBLING, E. Effects of human aging on periodontal tissues. **Special Care Dentistry**, v. 29, n. 4, p. 149-155, 2009.

ISMAIL, F.; EISENBURGER, M.; GRADE, S.; STIESCH, M. In Situ Biofilm Formation on Titanium, Gold Alloy and Zirconia Abutment Materials. **Dentistry**, v. 6, n. 11, 2016.

JANSEN, K.V.; CONRADTS, G.; RICHTER, E.J.; ING, D. microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. **Journal of oral & maxillofacial implants**, v. 12, n. 4, p. 527 - 540, 1997.

JERVØE-STORM, P.M.; JEPSEN, S.; JØHREN, P.; MERICSKE-STERN, R.; ENKLING, N. Internal bacterial colonization of implants: association with peri-implant bone loss. **Clinical Oral Implant Research**, v. 26, p. 957–963, 2015.

JOSHUPURA, K.J., WILLET, W.C.; DOUGLASS, C.W. The impact of edentulousness on food and nutrient intake. **Journal of the American Dental Association**, v. 127, p. 459-467, 1996.

KELTJENS, H.M.A.M.; SCHAEKEN, M.J.M.; VAN DER HOEVEN, J.S. Microbial aspects of preventive regimes in patients with overdentures. **Journal of Dental Research**, v. 66, n. 10, p. 1579-1582, 1987.

KINANE, D.F. Periodontal diseases' contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. **Annals of Periodontology**, v. 3, p. 142–150, 1998.

KLEIS, W.K.; KAMMERER, P.W.; HARTMANN, S.; AL-NAWAS, B.E.; WAGNER, W.A. Comparison of three different attachment systems for mandibular two-implant overdentures: one-year report. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 12, p. 209–218, 2010.

KOLENBRANDER, P.E.; J. LONDON. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 3247-3252, 1993.

KNOEMSCCHILD, K.L.; LEFEBVRE, C.A.; ALLEN, I.J.D. Overdentures and the periodontium. **Quintessence International**, v. 23, p. 405 – 409, 1992.

KRENNMAIR, G.; SEEMANN, R.; FAZEKAS, A.; EWERS, R.; PIEHSLINGER, E. Patient preference and satisfaction with implant-supported mandibular overdentures retained with ball or locator attachments: a crossover clinical trial. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 27, p. 1560–1568, 2012.

KRALL, E.; HAYES, C.; GARCIA, R. How dentition status and masticatory function affect nutrient intake. **Journal of the American Dental Association**, v. 129, p. 1261-1269, 1998.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, p. 300-304, 2002.

KÜRKÇÜOĞLU, I.; ÖZKIR, S.; KÖROĞLU, A.; SAHIN, O.; YILMAZ, B. Effect of denture cleansing solutions on different retentive attachments. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 115, p. 606-610, 2016.

LEE, K.H.; MAIDEN, M.F.J.; TANNER, A.C.R.; WEBER, H.P. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. **Journal of Periodontology**, v. 70, p. 131-138, 1999.

LI, J.; HELMERHORST, E.J.; LEONE, C.W.; TROXLER, R.F.; YASKELL, T.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; OPPENHEIM, F.G. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1311–1318, 2004.

LI, J.; HIROTA, K.; GOTO, T.; YUMOTO, H.; MIYAKE, Y.; ICHIKAWA, T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. **Journal of Dentistry**, v. 40, p. 686 – 692, 2012.

LI, X.; KOLLTVEIT, K.M.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Systemic diseases caused by oral infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 547-558, 2000.

LUPPENS, S.B.; KARA, D.; BANDOUNAS, L.; JONKER, M.J.; WITTINK, F.R.; BRUNING, O.; BREIT, T.M.; TEN CATE, J.M.; CRIELAARD, W. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. **Oral Microbial Immunology**, v. 3, n. 23, p. 183-189, 2008.

MACKIE, A.; LYONS, K.; THOMSON, W.M.; PAYNE, A.G.T. Mandibular two-implant overdentures: three-year prosthodontic maintenance using the locator attachment system. **The International Journal of Prosthodontics**, v. 24, p. 328–331, 2011.

MAKILA, E. Effects of complete dentures on dietary intake and serum levels of pantothenic acid, folic acid and iron in edentulous persons. **Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia**, v. 65, p. 299-311, 1969.

MARSH, P.D. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. **Caries Research**, v. 38, p. 204–211, 2004.

MARSH, P.D.; BRADSHAW, D.J. Microbial community aspects of dental plaque; in Newman HN, Wilson M (eds): Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. **BioLine**, p. 237–253, 1999.

MARSH, P.D.; BOWDEN, G.H.W. Microbial community interactions in biofilms; in Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M (eds): Community Structure and Co-Operation in Biofilms. Society for Microbiology Symposium 59. **Cambridge University Press**, p. 167–198, 2000.

MARCHINI, L.; TAMASHIRO, E.; NASCIMENTO, D.F.F.; CUNHA, V.P.P. Self-reported denture hygiene of a sample of edentulous attendees at a University dental clinic and the relationship to the condition of the oral tissue. **Gerodontology**, v. 21, p. 226–22, 2004.

MARSHALL, A.; WARREN, J.J.; HAND, J.S.; XIE, X.J.; STUMBO, P.J. Oral health, nutrient intake and dietary quality in the very old. **Journal of the American Dental Association**, v. 133, p. 1369-137, 2002.

MASHIMA, I.; FUJITA, M.; NAKATSUKA, Y.; KADO, T.; FURUICHI, Y.; HERASTUTI, S.; NAKAZAWA, F. The Distribution and Frequency of Oral *Veillonella* spp. Associated with Chronic Periodontitis. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 150-160, 2015.

MERGRAN, D.W.; CHOW, A.W. Bacterial aspiration and anaerobic pleuropulmonary infections, In M. A. Sande, L. D. Hudson, and R. K. Root (ed.), Respiratory infections. **Churchill Livingstone**, p. 269–292, 1986.

MERSEL, A.; BABAYOF, I.; ROSIN, A. Oral health needs of elderly short-term patients in a geriatric department of general hospital. **Special Care in Dentistry**, v. 20, p. 72– 74, 2000.

- MIRANZI, M.A.S.; AMUI, M.M.; IWAMOTO, H.H.; TAVARES, D.M.S.; PINHEIRO, A.S.; COIMBRA, M.A. The use of dental prosthesis among elderly: a social problem. **Revista Família, Ciclos de Vida e Saúde no Contexto Social**, v. 3, n. 1, p. 04-11, 2015.
- MOMBELLI A. Aging and the periodontal and peri-implant microbiota. **Periodontology** 2000, v. 16, p. 44-52, 1998.
- MOMBELLI, A.; DE 'CAILLET, F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 11, p. 203–213, 2011.
- MOMBELLI, A.; LANG, N.P. Microbial aspects of implant dentistry. **Periodontology** 2000, v. 4, p. 74-80, 1994.
- MOMBELLI, A.; MERICSKE-STERN, R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. **Journal of Clinical Oral Implant Research**, v. 1, p. 1-7, 1990.
- MOMBELLI, A.; VAN OOSTEN, M. A. C.; SCHÜRCH JR. E.; LANG, N. P. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 4, p. 145-151, 1987.
- MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H. The bacteria of periodontal disease. **Periodontology** 2000, v. 5, p. 66–77, 1994.
- MOYNIHAN, P.J.; BUTLER, T.J.; THOMASON, J.M.; JEPSON, N.J. Nutrient intake in partially dentate patients: the effect of prosthetic rehabilitation. **Journal of Dentistry**, v. 28, p. 557-563, 2000.
- MUMCU, E.; BILHAN, H.; GECKILI, O. The effect of attachment type and implant number on satisfaction and quality of life of mandibular implant-retained overdenture wearers. **Gerodontology**, v. 29, p. e618–e62, 2012.
- MURDOCH, D.A. Gram-Positive Anaerobic Cocci. **Clinical Microbiology Review**. v. 11, n. 1, 81–120, 1998.
- NASSAR, HI; ABDALLA, MF. Bacterial leakage of different internal implant/ abutment connection. **Future Dental Journal**, v. 1, p. 1-5, 2015.
- NAERT, I.; ALSAADI, G.; QUIRYNEN, M. Prosthetic aspects and patient satisfaction with two-implant-retained mandibular overdentures: a 10-year randomized clinical study. **International Journal of Prosthodontics**. V. 4, n. 17, p. 401-410, 2004.
- NAERT I, GIZANI S, VAN STEENBERGHE D. Rigidly splinted implants in the resorbed maxilla to retain a hinging overdenture: A series of clinical reports for up to 4 years. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 79, p. 156-164, 1998.
- NEOH, K.G.; HU, X.; ZHENG, D.; KANG, E.T. Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces. **Biomaterials**, v. 33, p. 2813-2822, 2012.
- OFFENBACHER, S.; BECK, J.D.; LIEFF, S.; SLADE, G. Role of periodontitis in systemic health: spontaneous preterm birth. **Journal of Dental Education**, v. 62, p. 852–858, 1998.

PAOLANTONIO, M.; PEDRAZZOLI, V.; DI MTIRRO, C.; DI PLACIDO, G.; PICCIANI, C.; CATAMO, G.; DE LUCA, M.; PICCOLOMINI, R. Clinical significance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young individuals during orthodontic treatment. A 3-year longitudinal study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, p. 610– 617, 1997.

PAPAS, A.S.; PALMER, C.A.; ROUNDS, M.C.; RUSSELL, R.M. The effects of denture status on nutrition. **Special Care in Dentistry**, v. 18, p. 17-25, 1998.

PASSOS, S.P.; GRESSLERMAY, L.; FARIA, R.; OZCAN, M.; BOTTINO, M.A. Implant–abutment gap versus microbial colonization: Clinical significance based on a literature review. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.101B, p. 1321–1328, 2013.

PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; ERICSON, R.E.; LAU, C.N.; LEVANOS, V.A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3770–3783, 2001.

PERACINI, A., ANDRADE, I.M., PARANHOS, H.F.O., SILVA, C.H.L., SOUZA, R.F. Habits of hygiene for complete dentures. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 3, p. 247-252, 2010.

PERSSON, LG; LEKHOLM, U; LEONHARDT, Å; DAHLÉN, G; LINDHE, J. Bacterial colonization on internal surfaces of Brånemark system® implant components. **Clinical Oral Implants Research**, v. 7, p. 90-95, 1996.

PETERSEN, P.E.; YAMAMOTO, T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 33, p. 81–92, 2005.

PETROPOULOS, V.C.; MANTE, F.K. Comparison of retention and strain energies of stud attachments for implant overdentures. **Journal of Prosthodontics**, v.20, n.4, p. 286-293, 2011.

PITCHER, D.G.; SANDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151–156, 1989.

PONSONNET, L.; REYBIER, K.; JAFFREZIC, N.; COMTE, V.; LAGNEAU, C.; LISSAC, M.; MARTELET, C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior. **Materials Science and Engineering**, v. 23, n. 4, p. 551-560, 2003.

ROSENBERG, E.S., JO, P.; TOROSIAN, J.; SLOTS, J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. **Clinical Oral Implants Research**, v. 2, n. 3, p. 135-144, 1991.

SACHDEO, A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. biofilms in the edentulous oral cavity. **Journal of Prosthodontics**, v. 17, p. 348–356, 2008.

SALVI, G.E., FURST, M.M., LANG, N.P., PERSSON, G.R. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. **Clinical Oral Implants Research**. v. 19, p. 242–248, 2008.

SHAPIRO, J.A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 81–104, 1998.

SHINZATO, T.; SAITO, A. A mechanism of pathogenicity of "Streptococcus milleri group" in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. **Journal of Medical Microbiology**, v. 4, p. 118-123, 1994.

SMITH, A.J.; JACKSON, M.S.; BAGG, J. The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 940–946, 2001.

SOCRANSKY, S.S.; SMITH C.; MARTIN, L.; PASTER B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **BioTechniques**, v. 17, p. 788–792, 1994.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR., R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, p. 134-144, 1998.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology** 2000, v. 38, p. 135-187, 2005.

STEINEBRUNNER, L.; WOLFART, S.; BÖBMANN, K.; KERN, M. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 6, p. 875-881, 2005.

STOODLEY, P., KATHJU, S., HU, F.Z., ERDOS, G., LEVENSON, J.E., MEHTA, N., DICE, B., JOHNSON, S., HALLSTOODLEY, L., NISTICO, L., SOTEREANOS, N., SEWECKE, J., POST, J.C. & EHRLICH, G.D. Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. **Clinical Orthopedic Related Research**, v. 437, p. 31–40, 2005.

TABANELLA G.; NOWZARI H.; SLOTS J. clinical and microbiological determinants of failing dental implants. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 11, n. 1, p. 24-36, 2009.

TALLARICO, M; CANULLO, L; CANEVA, M; ÖZCAN, M. Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on periimplantitis: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Prosthetic Research**, v.61, p. 233 – 241, 2017.

TANNER, A.; MAIDEN, M.F.J.; LEE, K.; SHULMAN, L.B.; WEBER, H.P. Dental implant infections. **Oxford University Press**, v. 25, n. 2, p. 213- 217, 1997.

TEUGHEL, W; ASSCHE, NV; SLIEPEN, I; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 2, p. 68–81, 2006.

THEILADE, E.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; THEILADE, J. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. **Archives of Oral Biology**, v. 28, n. 8, p. 675-680, 1983.

TRAKAS, T, MICHALAKIS, K, KANG, K; HIRAYAMA, H. Attachment systems for implant retained overdentures: a literature review. **Journal of Implant Dentistry**, v. 15, p. 24-34, 2006.

VERE, J.; HALL, D.; PATEL, R.; WRAGG, P. Prosthodontic maintenance requirements of implant retained overdentures using the Locator Attachment System. **The International Journal of Prosthodontics**, v. 25, p. 392–394, 2012.

WALLS, A.W.G.; STEELE, J.G.; SHEIHAM, A.; MARCENES, W.; MOYNIHAN, P.J. Oral health and nutrition in older people. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 60, p. 304 –7, 2000.

WHILEY, R. A.; HALL, L.M.C.; HARDIE, J.M.; BEIGHTON, D. A study of small-colony, /I-haemolytic, Lancefield group C streptococci within the anginosus group : description of *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* subsp. nov., associated with the human throat and pharyngitis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1443-1 449, 1999.

YODA, I.; KOSEKI, H.; TOMITA, M.; SHIDA, T.; HORIUCHI, H.; SAKODA, H.; OSAKI, M. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 234, 2014.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K.; HIRAYAMA, A. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 388-394, 2000.

ZAMBON, J.J.; GROSSI, S., DUNFORD, R.; HARASZTHY, VI.; PREUS, H.; GENCO, R.J. Epidemiology of subgingival bacterial pathogens in periodontal disease. In: Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S, ed. Molecular pathogenesis of periodontal disease. **American Microbiology Society**. p. 3-12, 1994.