Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

OTAVIO MARINO DOS SANTOS NETO

**Avaliação genômica dos microrganismos detectados em implantes com diferentes
superfícies associados a pilares de zircônia ou titânio: estudo *in vitro***

Ribeirão Preto

2019

OTAVIO MARINO DOS SANTOS NETO

Avaliação genômica dos microrganismos detectados em implantes com diferentes superfícies associados a pilares de zircônia ou titânio: estudo *in vitro*

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

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

dos Santos Neto, Otavio Marino

Avaliação genômica dos microrganismos detectados em implantes com diferentes superfícies associados a pilares de zircônia ou titânio: estudo *in vitro*, 2019.

127 p. : il. ; 30 cm

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na unidade que aloja o Programa.

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

Orientador: Issa, João Paulo Mardegan.

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

OTAVIO MARINO DOS SANTOS NETO

Avaliação genômica dos microrganismos detectados em implantes com diferentes superfícies associados a pilares de zircônia ou titânio: estudo in vitro

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

Aprovado em ____/____/2019

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Dedicatória

À Deus, o responsável pela natureza e inteligência do ser humano...

Oh Deus, nosso criador, que nos guia para a vida eterna, que nos dá força, amparo e segurança. Que mesmo nos momentos de fé abalada nos mostra o melhor caminho a ser seguido através da oração. Te glorifico Senhor, por todas as graças alcançadas e por permitir que mais essa etapa da minha vida seja vencida.

Aos meus pais

Luiz Carlos dos Santos e Iraci Vergínia Boiago dos Santos, não há palavras para descrever o quão grato sou a vocês, aqueles que me geraram, me educaram e me prepararam para o mundo. Desde a minha infância enxergaram em mim uma pessoa diferente, cheia de sonhos, desejos, e vontade de crescer na vida. Muitas vezes questionaram as minhas escolhas, mas me apoiaram, desdobrando-se, passando por dificuldades para que eu concluísse os estudos. Vocês trabalharam árduo mesmo com a idade avançada, permitindo que eu tivesse um destino diferente em minha vida. Sei que a distância e a saudade se fizeram presente em muitos momentos, não foi uma jornada fácil.... As dificuldades nos tornaram mais fortes, e uniram ainda mais a nossa família. **O amor de vocês é combustível essencial para minha caminhada e para tolerar a dor da saudade.**

Aos meus irmãos

Lilian Carla dos Santos, genuína virginiana, minha irmã que tanto me ajuda nos momentos mais difíceis, e que está sempre presente acompanhando e cuidando dos meus pais. Sinta-se responsável por mais essa etapa concluída. E ao meu irmão **André Luiz dos Santos**, por compreender minhas escolhas e ter colocado em minha vida meus dois sobrinhos, **Breno e Inaile**, que me mostraram a alegria de ser tio.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

Professor e mestre, amigo e conselheiro, orientador e mentor.... Agradeço por me receber e me orientar durante todo o mestrado, e principalmente por acreditar e confiar em mim. Trabalhando com você pude participar de atividades de ensino, pesquisa e extensão, fundamentais para a formação docente. Sua perseverança fez com que eu não desistisse dos meus sonhos e sua competência permitiu com que muitos deles se concretizasse. Além de me orientar academicamente, levarei comigo os conselhos que sempre me deu, preparando-me para os desafios da vida, fazendo-me crescer como profissional e pessoa. Obrigado por me fazer amadurecer cientificamente, ajudando-me a ponderar meu senso crítico e estimulando-me sempre a alcançar novos caminhos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro

Sem dúvida nenhuma etapa desse trabalho seria exequível sem a sua colaboração. Você soube me ouvir, me direcionar, mostrando-me que tudo é possível. Obrigado pela confiança e disposição em me ajudar. Admiro sua postura profissional e sabedoria. Nunca vou me esquecer da sua compreensão e da sua presença, fundamental para todos nós. Meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Cássio do Nascimento

Me sinto privilegiado pelo trabalho que realizamos juntos. Obrigado por abrir as portas do Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular LabDOM, compartilhando todo o conhecimento necessário para que eu pudesse entender a metodologia envolvida no trabalho, fundamental para que pudéssemos colher bons resultados. A sua seriedade aliada à sua competência, com certeza contribuíram com a minha formação profissional.

A Profa. Dra. Carla Andreotti Damante (FOB-USP)

Agradeço pela disposição em me ajudar com a elaboração deste trabalho e por me abrir as suas portas. Não tenho palavras para descrever o quanto me sinto feliz por ter você como colaboradora neste trabalho. Conhecendo-te, pude ter a certeza que podemos sim seguir a vida acadêmica com leveza, e isso com certeza tem me servido de inspiração. Obrigado por toda a ajuda e atenção!

Ao colega Thalisson Saymo de Oliveira Silva

Sua participação neste trabalho foi fundamental, você se dedicou e me apresentou toda a metodologia de estudo envolvida neste trabalho. Nos momentos em que trabalhamos juntos pude perceber o quão dedicado você é, não hesitando nunca em me ajudar a resolver os problemas que apareciam. Agradeço pela amizade e disposição em contribuir com este trabalho. Saiba que pessoas como você me inspiram. Meu mais sincero muito obrigado.

À Profa. Dra. Adriana Cristina Zavanelli (FOA-Unesp)

Você não poderia deixar de estar entre as pessoas em que eu presto o meu mais profundo agradecimento. Sem você, com certeza nada seria possível. Foi graças a oportunidade que me foi dada durante a minha primeira monitoria na disciplina de Prótese Parcial Fixa, que de imediato pude me encantar pelo seu trabalho, e o mais lindo de tudo, me encantei pela prótese dentária. A partir daí os dois últimos anos de graduação foram muito mais leves, repletos de conversas maduras, conselhos de mãe, oportunidades clínicas e científicas. Nossa história vai além dos muros da FOA, pois mesmo com a minha ida para outra instituição, tive a felicidade de poder contar com a sua amizade, conhecendo mais o seu trabalho e seu espírito humano como professora e dentista. Se hoje estou concluindo mais essa etapa da minha vida acadêmica, sinta-se como responsável. Obrigado pela disposição em me ajudar sempre, por me enxugar minhas lágrimas quando elas vinham nos mais adversos momentos da vida. Espero que o futuro nos presenteie com a oportunidade um dia trabalharmos juntos.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)**, dirigida pela **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**. Sou muito grato por todas oportunidades que me foram oferecidas nessa instituição que contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Reabilitação Oral)**, representado pelo coordenador **Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro** e pela vice-coordenadora, **Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida**, pela qualidade do curso e infraestrutura, capaz de promover a formação de recursos humanos de excelência para o mercado de trabalho.

À **Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida**, por ter me recebido inicialmente no programa, me ajudando em todos os momentos, sendo sempre uma pessoa tão especial comigo. Você confiou no meu trabalho, me deu oportunidades, e permitiu que eu não me afastasse do ambiente clínico. Juntos podemos produzir, e espero que tenhamos mais oportunidades em um futuro próximo. Saiba que a sua amizade foi fundamental para que a pós-graduação se tornasse mais leve. Obrigado também por todo o conhecimento clínico compartilhado, que se somou em muito na minha formação docente.

Aos professores doutores **Takami Hirono Hotta** e **Wilson Matsumoto**, que me deram a grande oportunidade de desenvolver trabalhos na disciplina de **Prótese Parcial Fixa**. Com vocês eu aprendi muito clinicamente, mas também cresci como ser humano e profissional. Obrigado por toda a disposição em me ajudar e pelo conhecimento compartilhado.

A **NEODENT do Brasil**, representada pelo **Dr. Sérgio Rocha Bernardes**, por ceder os implantes, blocos de zircônia e fresas de CAD-CAM, imprescindíveis para esse trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ** – pela bolsa de estudos disponibilizada durante todo o mestrado.

Ao **Laboratório de Prótese Dentária – Digital Center** (Batatais – SP), sob a responsabilidade do **Dr. Fernando Lopes**, pela realização da do desenho digital e fresagem dos pilares em zircônia.

A técnica do **Laboratório de Estudos Biomecânicos em Prótese e Implantes**, **Dra Adriana Cláudia Lapria Faria Queiroz**, pela fundamental ajuda neste trabalho, no tocante a finalização e cimentação dos pilares em zircônia.

Ao **Instituto de Pesquisas em Energia Nuclear – Centro de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN** – representado pela senhora **Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari**, por toda a atenção e disponibilidade em realizar a esterilização dos pilares em zircônia.

Ao **Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe (Prof. Sênior – ICB/USP)**. Não sei quantificar o quanto me sinto honrado em conhecer um dos maiores mestres em Microscopia Eletrônica de Varredura do Brasil. Sua simplicidade, disposição e extrema competência mostraram-me o quanto vale a pena seguir a vida acadêmica. Agradeço por ter me recebido em São Paulo, e por tornar possível a realização das imagens MEV deste trabalho.

À Sra. **Sônia Regina Yokomizo**, do **Laboratório Multiusuário de Microscopia – Departamento de Anatomia – ICB – USP**, por toda ajuda e disposição em ajudar com o preparo das amostras a serem analisadas no MEV.

À Sra. **Rose Eli Grassi Rici**, do **Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura – FMVZ – USP**, por toda a ajuda e disposição na captura das imagens MEV deste trabalho. Os momentos em sua companhia foram muito agradáveis e produtivos.

À Sra. **Ana Paula Macedo**, do **Laboratório de Metrologia – FORP – USP**, agradeço por toda a disposição e ajuda com a análise dos dados desse trabalho.

À **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza**, pelo carinho com que sempre me atendeu, me direcionando e aconselhando cientificamente. Nossa amizade com certeza proverá bons frutos no futuro. Você é um exemplo de perseverança, honestidade e competência. Obrigado por tudo professora!

À **Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia (FOA-Unesp)**, agradeço pela amizade e carinho. Sua alma é generosa, e será sempre um prazer reencontrá-la quando eu estiver em Araçatuba. Obrigado pelas oportunidades que me foram dadas durante a graduação e pelos seus valorosos conselhos.

À **Profa. Dra. Valéria de Oliveira Pagnano de Souza**, agradeço pela oportunidade de me supervisionar nos estágios acadêmicos que foram fundamentais para o meu aprimoramento clínico e para a minha formação docente. Agradeço pela confiança e receptividade.

Aos professores doutores: **Alma Blásida Concepción Elizaur Benitez Catirse, Andréa Cândido dos Reis, Cláudia Helena Lovato da Silva, Christie Ramos Andrade Leite Panissi, Helena de Freitas Oliveira Paranhos, Maria da Glória Chiarello Mattos (*in memoriam*), Osvaldo Luiz Bezzon, Renata Cristina Silveira Rodrigues Ferracioli, Valdir Antonio Muglia**, agradeço pela convivência e por todos os conhecimentos e comentários pertinentes durante a minha participação nas disciplinas do programa.

À **Professora Dra. Leticia Helena Theodoro (FOA-Unesp)**, por ter acreditado em mim e ter me dado a primeira oportunidade de realizar um estágio de iniciação científica, tão importante para o meu direcionamento científico na pós-graduação.

À secretária do Programa, **Fernanda Talita de Freitas**, por toda atenção e disposição em me ajudar em todos os trâmites burocráticos durante o mestrado. Agradeço também as secretárias do departamento, **Denise Martins Fontes Gonçalves e Regiane de Cássia Tirado Damasceno**, pela convivência e ajuda com estágios de docência, monitoria, e outras atividades. Agradeço também a secretária do Serviço de Pós-graduação **Mary Possani Carmessano**, pelas informações e ajudas disponibilizadas.

Aos colegas de Pós-graduação, **Anselmo Agostinho Simionato, Beatriz Roque Kubata, Carla Maria de Almeida Prado Magdalena, Carolina Noronha Ferraz de Arruda, Ebele Adaobi Silva, Frank Lucarini Bueno, Gabriela Ayres de Souza, Glenda Lara Lopes Vasconcelos, Júlio Neto Souto Batista, Lais Ranieri Makrakis, Letícia de Sá Evelin, Millena Rocha Mangueira, Patrícia Almeida Curylofo, Rafael Hayaxibara Sturaro**, pela companhia nas atividades da pós-graduação, e a relação harmoniosa e produtiva que tive com vocês. Muito obrigado.

Um agradecimento especial a minhas queridas colegas e amigas, **Ingrid Carneiro Cavalcante Souto, Isabela Mirales Pires e Beatriz Torriani de Almeida**, por ouvirem meus desabafos, meus choros, por serem pessoas tão iluminadas e divertidas. Com vocês a pós-graduação se tornou mais alegre!

Aos amigos que Ribeirão me proporcionou, **Helds Massashi Ishi, Edward Zanoello Jr, Bruno Benesatto, Guilherme Moretti, Gabriel Souza, Júlio Pascoaloti**: não sei dizer o que seria da minha adaptação à Ribeirão sem vocês, obrigado pela companhia e por tornarem essa etapa mais leve.

Aos amigos de graduação, **Rodolfo Breseghelo e Yara Matsu**, por estarem na medida do possível presentes na minha vida, sempre dispostos a me ajudar com palavras sinceras. Vocês entendem os meus sonhos, me aconselham, e me fortificam. Tenho orgulho da amizade de vocês. Espero poder encontrá-los em breve.

Ao **William Bertani**, meu querido amigo, que me recebeu em São Paulo durante as etapas do trabalho lá realizadas. Obrigado por tudo e conte sempre comigo.

Aos amigos da FOA: **Allan Silva, Marisa Alves, Vitor Guerra, Victor Tosta**, obrigado pela amizade mesmo à distância, pelas visitas à Ribeirão e por todos os momentos de amizade que vocês me proporcionaram. Meu muito obrigado!

A todos os pacientes que colaboraram na coleta de saliva deste trabalho.

A todos os alunos de graduação com os quais eu tive oportunidade de conviver e trabalhar.

Resumo

RESUMO

Santos Neto, OM. [Dissertação]. **Avaliação genômica do biofilme formado em implantes com diferentes superfícies associados a pilares de zircônia ou titânio: estudo *in vitro***. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2019.

Frequentemente estão sendo lançados no mercado novos implantes dentários com diferentes topografias e tratamentos de superfície, visando melhorar a osseointegração e promover tratamentos com uma maior previsibilidade. O aperfeiçoamento estético tem sido uma realidade clínica e a utilização da zircônia para a implantodontia se tornou uma prática frequente no atual cenário da reabilitação oral, entretanto a terapia com implantes pode ser comprometida pela peri-implantite. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo analisar a microbiota associada ao biofilme formado sobre dois tipos de superfícies de implantes (com ou sem hidrofilia) associados a pilares de titânio ou zircônia. Os grupos envolvidos no estudo foram: (1) Grupo NTi (Implantes com superfície hidrofóbica - NeoPoros[®] + pilar de titânio); (2) Grupo ATi (Implantes com superfície hidrofílica Acqua[®] + pilar de titânio); (3) NZn (Implantes com superfície hidrofóbica NeoPoros[®] + pilar de zircônia); (4) Grupo AZn (Implantes com superfície hidrofílica Acqua[®] + pilar de zircônia), sendo que cada grupo possuía 10 amostras (n=10). Após a conexão dos respectivos pilares aos implantes, estes foram contaminados durante 7 dias com saliva e biofilme humanos. Ao final do período de incubação, amostras do biofilme formado sobre a superfície dos implantes e pilares foram coletadas de 7 amostras para a realização da avaliação genômica através do método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Três implantes de cada grupo foram destinados para avaliação da superfície através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O teste de normalidade (Shapiro-Wilk) reportou distribuição não normal dos dados, foi realizado então a análise em Modelo Linear Generalizado. As múltiplas comparações foram realizadas com ajuste de Bonferroni. Para o *S. salivarius* dois grupos não apresentaram contagem de microrganismos e assim foi aplicado teste U de Mann-Whitney. Foi considerado nível de significância de 5%. Quarenta e uma espécies de microbianas foram identificadas e quantificadas pela técnica DNA *Checkerboard*. Ao analisar a contaminação global, ou seja, o total de microrganismos detectados em cada grupo, foi possível encontrar que AZn>NTi>ATi>NZn. No geral os valores entre AZn e NTi; e ATi e NZn são semelhantes. No entanto, o perfil microbiano mostrou-se como variável entre os diferentes grupos. O AZn apresentou as maiores taxas de contaminação entre os grupos estudados. Pelos resultados encontrados, foi possível determinar que as superfícies Acqua e pilares cerâmicos foram responsáveis por uma maior detecção de

microrganismos. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram a adesão de microrganismos em ambas as superfícies de implante e pilar. Através desse estudo foi possível concluir que diferentes superfícies dos implantes e pilares protéticos mostraram diferenças quanto aos microrganismos avaliados, sendo que o grupo AZn detectou maior quantidade de microrganismos pela técnica do DNA *Checkerboard*.

Palavras-chave: Implante dentário; Biofilmes; Conectores protéticos; Zircônia; Titânio; Microbiologia.

Abstract

ABSTRACT

Santos Neto, OM. [Dissertation]. **Genomic evaluation of biofilm formed in implants with different surfaces associated with zirconia or titanium abutments: in vitro study.** Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto; 2019.

Frequently new dental implants with different topographies and surface treatments are being marketed in order to improve osseointegration and promote treatments with greater predictability. Aesthetic improvement has been a clinical reality and the use of zirconia for implant dentistry has become a frequent practice in the current oral rehabilitation scenario, however implant therapy could be compromised by peri-implantitis. Thus, this study aimed to evaluate the microbiota associated with the biofilm formed on two types of implant surfaces (with or without hydrophilicity) associated with abutments of titanium or zirconia. The groups involved in the study were: (1) NTi (Implants with hydrophobic surface NeoPoros® + titanium abutment); (2) ATi (Implants with hydrophilic surface - Acqua® + titanium abutment); (3) NZn (Implants with hydrophobic surface NeoPoros® + zirconia abutment); (4) AZn (Implants with hydrophilic surface Acqua® + zirconia abutment), each group having 10 samples (n = 10). After the abutments were connected to the implants, they were contaminated for 7 days with human saliva and biofilm. At the end of the incubation period, samples of the biofilm formed on the surface of the implants and columns were collected from 7 samples to perform the genomic evaluation using the DNA-DNA Checkerboard hybridization method. Three implants from each group were used for surface evaluation through the Scanning Electron Microscopy (SEM) technique. The normality test (Shapiro-Wilk) reported a non-normal distribution of data, and the analysis was performed in Generalized Linear Model. The multiple comparisons were performed with Bonferroni adjustment. For *S. salivarius*, two groups did not present microorganism counts and Mann-Whitney U test was applied. A significance level of 5% was considered. Forty-one microbial species were identified and quantified by the DNA Checkerboard technique. When analyzing the global contamination, that is, the total number of microorganisms detected in each group, it was possible to find that AZn > NTi > ATi > NZn. In general, the values between AZn and NTi; and ATi 1 and P 2n are similar. However, the microbial profile showed to be a variable among the different groups. AZn presented the highest contamination rates among the studied groups. From the results found, it was possible to determine that the Acqua surfaces and ceramic abutments were responsible for a highest detection of microorganisms. The images obtained by scanning electron microscopy showed the adhesion of microorganisms on both the implant and abutment surfaces. Through this study,

it was possible to conclude that the surfaces of implants and prosthetic abutments evaluated had different microorganisms and the AZn group showed a highest detection of microorganisms by the Checkerboard DNA technique.

Keywords: Dental implant; Biofilms; Prosthetic connectors; Zirconia; Titanium; Microbiology.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Confecção dos pilares cerâmicos em Zn pelo CAD/CAM. A: Escâner para CAD/CAM; B: Escaneamento do pilar modelo; C: Ajustes e redimensionamento dos pilares no software DWOS®; D: Bloco de zircônia posicionado na fresadora; E: Fresagem do pilar cerâmico concluída.....	70
Figura 2-	Cimentação dos pilares cerâmicos: A: Carga vertical do delineador sendo executada no pilar após a aplicação do cimento resinoso; B: Remoção dos excessos de cimento prévia a fotopolimerização com auxílio de <i>microbrush</i> ; C: Fotopolimerização do cimento.....	71
Figura 3-	Incubação dos conjuntos implante-pilar: A: Implante associado a pilar cerâmico; B: Implante associado a pilar metálico.....	73
Figura 4-	Coleta do biofilme formado sobre a superfícies dos implantes associados a pilares protéticos: A: Implante associado a pilar cerâmico; B: Implante associado a pilar metálico.....	74
Figura 5-	Aplicação das amostras de DNA sobre a membrana. A: Aparelho <i>Minislot</i> 30 fechado; B: Aparelho aberto e membrana posicionada; C: Aplicação das amostras de DNA.....	78
Figura 6-	Pré-hibridização da membrana em 63,5°C no forno de hibridização.....	79
Figura 7-	Aplicação das sondas de DNA genômico. A: Aparelho <i>Miniblotter</i> 45 fechado; B: Aparelho com membrana posicionada; C: Aplicação das sondas DNA; D: Reação de hibridização no forno de hibridização.....	80
Figura 8-	Filme radiográfico denotando a presença sinais de hibridização.....	82
Figura 9-	Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme formado nos diferentes grupos de estudo. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) de cada uma das 41 espécies-alvo do estudo.....	90
Figura 10-	Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme dos diferentes grupos estudados.....	91
Figura 11-	Microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos implantes estudados após a contaminação: em A (Acqua); B (NeoPoros). Barra=10µm (A e B).....	92
Figura 12-	Microscopia eletrônica de varredura da superfície Acqua: observar os microrganismos encontrados nos poros. Barra=10µm (A e B).....	93
Figura 13-	Microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos pilares (altura de transmucoso) após a contaminação: em A (Ti); B (Zn). Barra=10µm (A e B).....	93

- Figura 14-** Microscopia eletrônica de varredura da superfície metálica do *Tibase* associado a pilar cerâmico. Observar excesso de cimento e bactérias associadas. Barra=10µm..... **94**
- Figura 15-** Microscopia eletrônica de varredura (x10.000) das superfícies dos pilares (área de cimentação) após a contaminação: em A (Ti); B (Zn). Barra=10µm (A e B).. **94**

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Grupos experimentais do estudo.....	72
Quadro 2-	Espécies-alvo da detecção pela técnica de hibridização com sondas de DNA genômico DNA-DNA <i>Checkerboard</i>	76

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das espécies pertencentes aos complexos bacterianos de Socransky et al. (1994) detectadas no biofilme.....	86
Tabela 2-	Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das demais espécies detectadas no biofilme.....	87
Tabela 3-	Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das espécies de fungos detectadas no biofilme.....	88

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATi	Grupo experimental implante de superfície Acqua® (hidrofílica), associado a pilar de titânio
AZn	Grupo experimental implante de superfície Acqua® (hidrofílica), associado a pilar de zircônia
CAD/CAM	Desenho Assistido por Computador/ Manufatura Assistida por Computador
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
modSLA	Superfície jateada por partículas de grosso calibre modificada para ser hidrofílica
NaCl	Cloreto de sódio
NTi	Grupo experimental implante de superfície NeoPoros® (hidrofóbica), associado a pilar de titânio
NZn	Grupo experimental implante de superfície NeoPoros® (hidrofóbica), associado a pilar de zircônia
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SLA	Superfície jateada por partículas de grosso calibre
Ti	Titânio
TiZr	Liga de titânio e zircônia
UFC	Unidade Formadora de Colônias
Zn	Zircônia

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	51
2. PROPOSIÇÃO	65
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3.1. Implantes e componentes utilizados.....	69
3.2. Obtenção dos pilares em zircônia	69
3.3. Grupos de estudo.....	71
3.4. Contaminação dos implantes.....	72
3.5. Avaliação Microbiológica através da técnica de hibridização DNA-DNA <i>Checkerboard</i>	74
3.5.1. Coleta das amostras do biofilme formado sobre os implantes/pilares	74
3.5.2. Processamento microbiológico pela técnica de hibridização DNA-DNA <i>Checkerboard</i>	75
3.5.3. Obtenção das espécies-alvo de detecção	75
3.5.4. Processamento das amostras de pela técnica de hibridização DNA-DNA <i>Checkerboard</i>	77
3.6. Microscopia eletrônica de varredura dos implantes/pilares	82
4. RESULTADOS.....	86
4.1. Resultado das análises microbiológicas	86
4.2. Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	92
5. DISCUSSÃO.....	98
6. CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXO	129

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O uso de implantes dentários tornou-se um procedimento para substituir um ou mais dentes ausentes, constituindo um dos mais importantes avanços terapêuticos para a odontologia moderna (KWON et al., 2014; WANG et al., 2015; TENENBAUM et al., 2016; WILSON et al., 2016). Diversos estudos relatam taxas de sobrevivência acima dos 90%, incluindo reposições unitárias ou múltiplas (BLANES et al., 2007; HEYDECKE et al., 2012; PJETURSSON et al., 2012; KWON et al. 2014, BECKER et al., 2016; KIM et al., 2018).

O sucesso da terapia com implantes pode ser atribuído a diversos aspectos clínicos, como a quantidade de osso no leito receptor, um criterioso planejamento cirúrgico e protético, oclusão ideal e higiene oral satisfatória (GOIATO et al., 2014; PJETURSSON et al., 2014). No entanto estão sendo realizados constantes esforços para a melhoria das propriedades físicas e mecânicas dos implantes e seus componentes, como modificações no desenho dos implantes e seus componentes e tratamentos de superfície (GOIATO et al., 2014; PJETURSSON et al., 2014; SETZER; KIM, 2014; JIMBO; ALBREKTSSON, 2015; THOMA et al., 2018).

Mesmo com o sucesso da terapia com implantes, denotada pela alta taxa de sobrevivência em estudos clínicos, falhas associadas a terapia têm sido frequentemente relatadas (LANG et al., 2000; LAINE et al 2005., SHIBLI et al., 2008; YAMANE et al., 2013; BELIBASAKIS et al., 2015). Fatores relacionados ao paciente, ao sistema de implantes e à equipe de profissionais são definidos como fundamentais para a obtenção e manutenção da osseointegração. O sistema de implante pode determinar a ocorrência de falhas através das respostas biológicas frente aos diferentes desenhos, forma e superfícies dos implantes, que irão interagir com os tecidos bucais. Fatores relacionados ao paciente, tais como tabagismo, história de periodontite, qualidade e quantidade óssea reduzidas, higiene bucal, diabetes, abuso de drogas e medicação, têm sido sugeridos como associados a falhas precoces nos implantes. Já a equipe de profissionais pode interferir nos resultados do tratamento, através de planejamento prévio, domínio da técnica cirúrgica e de reabilitação protética, condições de transmissão de cargas mastigatórias, curva de aprendizado. Além disso, as falhas nos estágios iniciais do processo de cicatrização ou após a inserção da prótese podem piorar o prognóstico do tratamento, sendo importante reduzir as taxas de falha dos implantes ao mínimo nesse estágio. (ASHLEY et al., 2003; ALSAADI et al., 2007; ALSAADI et al., 2008; CHRCANOVIC et al., 2014; MALM; JEMT; STENPORT, 2018).

Apesar dos implantes serem projetados estimando-se uma taxa de sobrevivência de 20 a 25 anos, evidências apontam para a presença de inflamação crônica, no intervalo de 8,6% - 9,7% em tecidos moles e duros ao redor dos implantes, observado geralmente após dez anos da instalação (PJETURSSON et al., 2004; ROOS-JANSÅKER et al., 2006; JUNG et al., 2008; KARL; ALBREKTSSON, 2017; MALM; JEMT; STENPORT, 2018; TRIPATHY et al., 2018). Estas condições patológicas denominadas mucosite e peri-implante, respectivamente, são consideradas as principais complicações na implantodontia e suas manifestações clínicas, como sangramento gengival, inchaço e perda óssea se assemelham a periodontite (JUNG et al., 2008; LINDHE et al., 2008; LANG et al., 2011; MOMBELLI et al., 2012). No entanto, periodontite e peri-implantite não são a mesma doença. Pelo contrário, Becker et al. (2014) mostraram que a periodontite e a peri-implantite têm um padrão de expressão gênica significativamente diferente e, portanto, provavelmente envolvem um conjunto separado e distinto de vias moleculares.

Microrganismos na cavidade oral são frequentemente associados com biofilmes, que são comunidades microbianas complexas incorporados numa matriz extracelular composta por polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, e a água (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; WOOD et al., 2000; DONLAN; COSTERTON, 2002; REESE; GUGGENHEIM, 2007). A formação dos biofilmes orais é um processo dinâmico que forma ao final verdadeiras comunidades, onde espécies diferentes de bactérias podem conviver sinergicamente (VAN WINKELHOF et al., 2000; SPRATT; PRATTEN, 2003). A etapa inicial, relaciona-se com a formação da película adquirida, estruturada a partir da adsorção de moléculas orgânicas (constituída por glicoproteínas, fosfoproteínas e lipídios) e inorgânicas da saliva (MARSH et al., 2011; LARSEN; FIEHN, 2017). A partir da formação da película adquirida, tem início a adesão bacteriana, passo essencial na formação dos biofilmes, denominado de colonização primária (ABRAHAMSSON; BERGLUNDH; LINDHE, 1998). Os receptores da película salivar oferecem superfícies para que as bactérias iniciem a sua adesão e posteriormente unam-se formando microcolônias, favorecendo a adesão de outros microrganismos. Com o passar do tempo, as células bacterianas proliferam e crescem formando um biofilme maduro e misto, incluindo espécies periodontopatogênicas (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014; TERANAKA; TOMIYAMA; OHASHI, 2017)).

Os microrganismos que compõe o biofilme são conglomerados de complexos microbianos, descritos como amarelo (*Streptococcus* spp.), azul (*Actinomyces* spp.), verde (*Eikenella* e *Capnocytophaga* spp.), roxo (*Veillonella* spp. e *Actinomyces odontolyticus*), laranja

(*Eubacterium nodatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* e *Campylobacter spp.*) e vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythenis* e *Treponema denticola*) (SOCRANSKY et al., 1998; HAFFAJEE et al., 2008). A formação e estrutura de biofilmes orais é composta por várias fases, o que dá origem a uma mudança na microbiota de saúde a doença e o estabelecimento de uma microflora anaeróbia Gram-negativa em locais com bolsas peri-implantares (SOCRANSKY et al., 2002; KOHLENBRANDER et al., 2006).

É reportado na literatura que a condição periodontal da dentição restante é capaz de determinar a composição microbiana na região peri-implantar e que os microrganismos que se aderem as superfícies dos implantes seguem o mesmo padrão que em dentes naturais (QUIRYNEN et al., 2006; FURST et al., 2007; DE FREITAS AR et al., 2018; RAFFAINI et al., 2018). Mesmo possuindo características em comum com a periodontite, o perfil microbiano da peri-implantite mostra-se complexo e variável, devido a capacidade da superfície do implante em gerar um microambiente distinto (MOMBELLI et al., 1987; RAKIC; GRUSOVIM; CANULLO, 2016). São relatadas na peri-implantite a presença dos microrganismos, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium spp.*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, além de espécies não associadas normalmente com a periodontite, estudos tem reportado a detecção dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter rectus*, e *Candida spp.*; em lesões peri-implantares. (ALCOFORADO et al., 1991; LEONHARDT et al., 1993; LEONHARDT et al., 1999; KRONSTROM et al., 2001; RENVERT et al., 2007; LAFABRIE et al., 2017; GAO et al., 2018).

Os primeiros implantes usados por Branemark eram usinados e não apresentavam tratamentos e modificações na sua superfície, e possuíam rugosidade mínima (VAN STEENBERGHE et al., 1990; WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2000). No intuito de melhorar as propriedades relacionadas com a consolidação da osseointegração, modificações têm sido realizadas na superfície dos implantes (BUSER et al., 2004; SHIBLI et al., 2007; FAEDA et al., 2012; MOURA et al., 2013; WENNERBERG et al., 2014). Sabe-se que as propriedades da superfície do material do implante estão intimamente relacionadas com interações químicas e biológicas, visando a estabilidade do coágulo sanguíneo, colaborando com o processo de osseointegração (SHIBLI et al., 2007; FAEDA et al., 2012; BOSSHARDT; CHAPPUIS; BUSER, 2017). As modificações relacionadas a superfície dos implantes de titânio são realizadas a partir da aplicação de partículas abrasivas, tais como os óxidos de Al_2O_3 ,

SiO₂ e TiO₂; condicionamento de superfície com HF e HNO₃, entre outros ácidos; associação e técnicas, tais como jateamento seguida de deposição; anodização; deposição de feixe de íons; e, o uso de componentes bioativos tais como fatores de crescimento, proteínas ou íons de cálcio e de fósforo (DAVIES 2003; WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009; XIAO et al., 2011; CANABARRO et al., 2012) .

Os implantes encontrados no mercado, além de possuírem alterações quanto a topografia da superfície, podem apresentar alterações da molhabilidade (WENNERBERG et al., 2014). O desenvolvimento de uma superfície com maior molhabilidade é uma inovação relativamente recente (BOSSHARDT; CHAPPUIS; BUSER, 2017). A alteração da molhabilidade gera maior energia de superfície e conseqüentemente torna a superfície mais hidrofílica (BAIER 1972; BAIER et al., 1984, KASEMO et al., 1988; KASEMO et al., 1994; MUDDUGANGADHAR et al., 2011). Entre as modificações na superfície dos implantes de titânio, várias foram desenvolvidas para aumentar a hidrofília da superfície. Um exemplo de superfície clinicamente relevante são as superfícies tratadas com jateamento seguidas de condicionamento ácido (*sandblasted, large-grit, acid-etched* – SLA). As superfícies SLA superaram fortemente as superfícies relativamente lisas (SYKARAS et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2008; WENNERBERG et al., 2009). A principal diferença durante o processamento da superfície hidrofóbica de SLA e sua versão modificada, hidrofílica (modSLA) é que a neutralização da superfície após condicionamento ácido ocorre em um ambiente isento de contaminantes e o implante é armazenado em solução salina neutra ao invés de ar. Revisões destacam estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos com foco nas superfícies hidrofílicas (SCHWARZ et al., 2009; WENNERBERG et al., 2011).

Estudos reportaram que as superfícies hidrofílicas aumentam a expressão osteogênica e são capazes de formar uma forte interface com o osso (BUSER et al., 2004; RAUSCH-FAN et al., 2008; MAMALIS et al., 2009; SCHWARZ et al., 2009; VLACIC-ZISCHKE et al., 2011). O raciocínio foi que uma superfície hidrofílica (aproximadamente $\leq 90^\circ$ de ângulo de contato) com uma alta energia superficial poderia aumentar a interação com células e proteínas durante a cicatrização precoce da ferida, promovendo ainda mais a osteogênese (RUPP et al., 2006; WALL et al., 2009; KHAN et al., 2012). Sendo assim, superfícies hidrofílicas são atraentes por reduzirem o tempo necessário para a osseointegração, conseqüentemente trazendo maior conforto para os pacientes (ALMAGUER-FLORES et al., 2012; GITTENS et al., 2014). Entretanto, os artigos de revisão anteriores sugeriram que uma superfície hidrofílica não é

aparentemente superior a uma superfície hidrofóbica do ponto de vista clínico, sugerindo que mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos nas variáveis topografia e molhabilidade da superfície (WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009; XIAO et al., 2011).

Embora estudos recentes tenham sugerido que a molhabilidade e a rugosidade modulada por tratamentos de superfície poderiam melhorar o processo de osseointegração inicial, estes fatores também podem influenciar na aderência microbiana e na formação de biofilmes sobre a superfícies de implantes (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995; AN; FRIEDMAN, 1998). A compreensão da relação entre a adesão bacteriana e as características da superfície do Ti é, portanto, importante para melhorar as taxas de sucesso de implantes (JEPSEN et al., 2015).

Os resultados de diferentes estudos que se relacionam com a energia livre de superfície, hidrofobia e a adesão de microrganismos são discrepantes, no entanto, tornou-se evidente que os materiais hidrófobos são preferencialmente colonizados por bactérias hidrofóbicas e vice-versa (WEERKAMP et al., 1985; WEERKAMP et al., 1988; VERRAN et al., 1996; GRIVET et al., DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; 2000; MABBOUX et al., 2004). Por conseguinte, as propriedades de adesão são afetadas pela hidrofobia da superfície das células bacterianas (MINAGI et al., 1985; MABBOUX et al., 2004; TEUGHELIS et al., 2008).

Schwarz et al. (2007), realizaram um estudo com o objetivo de investigar os efeitos da hidrofília e microtopografia de superfícies de implantes de titânico na formação de biofilme e placa supragengival. Os autores utilizaram amostras fabricadas a partir de titânio comercialmente puro grau 2, de acordo com os seguintes tratamentos: polido (P), tratamento ácido (A), modificado quimicamente (mod) A (modA), jateamento de grosso calibre e A (SLA) e modSLA. Dispositivos intraorais foram utilizadas para a coleta do biofilme supragengival *in vivo* em cada grupo em 12, 24 e 48h. O biofilme em placa (BP) (%) foi corado e áreas em porcentagem foram avaliadas morfometricamente. Todos os grupos exibiram aumentos significativos das áreas médias de BP ao longo do tempo ($p < 0,001$, respectivamente). A análise morfométrica revelou as seguintes áreas médias de PB: 12h: SLA = modSLA > P > A = modA ($p < 0,001$; respectivamente); 24h: SLA > modSLA = P > A = modA ($p < 0,001$; respectivamente); 48h: SLA = modSLA = P > A = modA ($p < 0,001$; respectivamente). Os autores concluíram que dentro dos limites de um estudo piloto, pode-se concluir que a hidrofília não teve efeito aparente, enquanto a microtopografia teve uma influência altamente desigual e imprevisível sobre a formação do biofilme gengival.

Almaguer-Flores et al. (2012) analisaram a influência da microtopografia e hidrofília de substratos de titânio (Ti) na formação inicial de biofilme oral. Nove espécies bacterianas

pertencentes à microbiota bucal normal, incluindo: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces israelii*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguinis* foram testadas em superfícies de Ti: pré-tratamento (PT [R (a) <0,2 µm]), ácido-gravada (A [R (a) <0,8 µm]), modificada para ser hidrofílica (modA), jateada e condicionada por ácido (SLA [R (a) = 4 µm]) e SLA hidrofílico (modSLA). Os discos foram incubados por 24 h em condições anaeróbicas usando meio de cultura normal (CN) ou saliva humana (SH). As contagens totais de bactérias e a proporção de cada espécie bacteriana foram analisadas por hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Maiores contagens de bactérias foram observadas em todas as superfícies incubadas com CN em comparação com as amostras incubadas com SH. PT, SLA e modSLA exibiram maior número de bactérias anexadas em CN, enquanto SLA e modSLA tiveram um aumento significativo na adesão bacteriana em SH. A proporção de espécies nos biofilmes iniciais também foi influenciada pelas propriedades de superfície e pelos meios utilizados: SLA e modSLA aumentaram a proporção de espécies como *A. actinomycetemcomitans* e *S. sanguinis* em ambos os meios, enquanto a adesão de *A. israelii* e *P. gingivalis* nas mesmas superfícies foi afetada na presença de saliva. A formação e composição inicial do biofilme foram afetadas pela microtopografia e hidrofília da superfície e pelos meios utilizados.

Schmidlin et al. (2013), investigaram a aderência microbiana e a colonização de um biofilme de poliespécies em 7 superfícies de titânio processadas de maneira diferente. Biofilmes de seis espécies foram formados anaerobicamente em discos de titânio esterilizados com 5 mm de diâmetro e pré-condicionados à saliva. A superfície dos materiais foram usinadas, coradas, gravadas com ácido ou jateadas com ácido (SLA). Amostras dos dois últimos materiais também foram quimicamente modificadas, aumentando a molhabilidade. A rugosidade da superfície e os ângulos de contato de todos os materiais foram determinados. Os discos foram então incubados anaerobicamente durante até 16,5 h. A aderência microbiana inicial foi avaliada após 20 min de incubação e posteriormente a colonização após 2, 4, 8 e 16,5 h, utilizando técnicas de cultura não seletiva e seletiva. As diferenças médias de microrganismos colonizando após os primeiros 20 min foram pequenas (4,5 a 4,8 log UFC). Em até 16,5 h, a superfície de SLA modificada exibiu os maiores valores de colonização ($6,9 \pm 0,2$ log UFC, $p < 0,05$), mas crescimento crescente foi observado em todas as superfícies de teste ao longo do tempo. As discrepâncias entre as cepas bacterianas nas superfícies de titânio diferentemente trabalhadas foram muito similares àsquelas descritas para as UFC totais. Os autores concluíram que a rugosidade superficial influenciou moderadamente a formação do biofilme, enquanto a

molhabilidade não pareceu influenciar a formação do biofilme nas condições experimentais descritas. A superfície SLA modificada apresentou a maior tendência de colonização bacteriana.

Já no estudo de Zaugg et al. (2016), foi analisada a formação de biofilme em quatro diferentes superfícies à base de titânio (liga de titânio e zircônia (TiZr)), M; liga TiZr usinada com ácido, modMA; liga de vanádio de alumínio micro-ranhurado de titânio, TAV MG) em um modelo experimental humano. Os discos feitos sob medida, foram montados em dispositivos intraorais e usados por 16 voluntários durante 24 horas. O ensaio de coloração com safranina, microcalorimetria isotérmica (IMC) e MEV. As superfícies hidrofílicas modMA e modSLA com maior micro-rugosidade superficial exibiram significativamente mais biofilme do que as superfícies hidrofóbicas TAV, MG e M. Variações inter e intraindividuais na formação de biofilme nos discos de titânio foram evidentes ao longo do estudo. Os autores concluíram que a hidrofília e a rugosidade superficial aumentaram a formação de biofilme *in vivo*.

Além de estudos referentes as diferentes superfícies de implantes, estudos com relação aos pilares (*abutments*) estão sendo conduzidos, pois novos materiais têm sido utilizados para a sua confecção. O titânio é considerado o padrão ouro para a reabilitação em implantodontia devido às suas boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade (SAILER et al., 2009). Entretanto, este material apresenta algumas limitações clínicas, sendo que sua principal desvantagem é o aspecto acinzentado produzido pela cor do metal em pacientes com biotipos gengivais finos, criando um halo escuro devido à cor do implante ou do pilar metálico (HISBERGUES; VENDEVILLE; VENDEVILLE, 2008; KAN et al., 2011; DE MEDEIROS et al., 2013). A possibilidade de reações alérgicas e as consequências antiestéticas do uso de implantes e pilares de titânio têm despertado o interesse de pesquisadores a explorar o desenvolvimento de um material que fosse mais estético e biocompatível (VOLZ; BATSCHE, 2004; HISBERQUES; VENDEVILLE; VENDEVILLE, 2008; ADREIOTELLI; WENZ; KOHAL, 2009).

Dentro desses novos conceitos e recursos protéticos, a utilização da zircônia para a implantodontia tem sido realidade no atual cenário da reabilitação oral, tanto para implantes como para pilares (ANDREIOTELLI; WENZ; KOHAL, 2009). Estudos demonstraram a menor toxicidade da zircônia em relação ao titânio, não causando alterações em fibroblastos ou células sanguíneas (VAGKOPOULOU et al., 2009; ALI et al., 2014). Além disso, as propriedades microestruturais, biocompatibilidade e a perfeita interação com tecidos moles, têm chamado a atenção dos clínicos para a sua utilização na implantodontia, principalmente em regiões

anteriores que exigem uma maior estética (KIM et al., 2000; DUNN 2008; ANDREIOTELLI; WENZ; KOHAL, 2009). Com relação aos aspectos estéticos, a zircônia é considerada um material propício para a confecção de implantes e pilares, por apresentar maior translucidez permitindo a transmissão de luz de maneira semelhante aos dentes naturais, diferentemente do metal que a bloqueia (MCLAREN; WHITE, 2000; ODMAN; ANDERSSON, 2001; PARK et al., 2006; EBECK et al., 2008; ADATIA et al., 2009).

Componentes protéticos, tais como os pilares de implantes, têm um efeito importante na adesão microbiana, e o tipo de material pode ajudar a aumentar ou reduzir a fixação bacteriana e a formação de biofilme (SCARANO et al., 2004; DE AVILA et al., 2013; de AVILA et al., 2014). A vantagem potencial da zircônia comparada com pilares de titânio têm sido relacionada com a condutividade elétrica da zircônia e a sua energia livre de superfície que desfavorece a adesão bacteriana. Estudos relataram menor acúmulo de biofilme e inflamação menos pronunciada em torno de pilares de zircônia (RIMONDINI et al., 2002; SCARANO et al 2004).

O desenho auxiliado por computador e o manufaturamento assistido por computador (CAD / CAM) foram introduzidos para aprimorar a qualidade dos componentes protéticos (PRIEST 2005; KAPOS et al., 2009). O uso da tecnologia CAD / CAM na produção de estruturas cerâmicas e pilares de implantes, especialmente na zona estética, vem se expandindo rapidamente devido aos benefícios estéticos, biológicos e mecânicos dos materiais cerâmicos resultantes. Essa tecnologia permite a fabricação de pilares a partir de um bloco sólido de material que possui composição homogênea e altas propriedades mecânicas (KAPOS et al., 2009). Várias etapas do laboratório são eliminadas, resultando na produção de suporte e / ou prótese com alta qualidade e precisão. Além disso, um perfil de emergência adequado pode ser facilmente projetado e alcançado (PRIEST 2005; KAPOS et al., 2009).

Os pilares em zircônia podem conectados aos implantes, ou podem ser cimentados sobre bases de titânio. A linha de cimentação deve ser delgada e sem excessos, eliminado assim a criação de superfícies para a colonização bacteriana (WITTNEBEN et al., 2014). Wei-Shao et al. (2014), descreveram uma técnica de personalização e cimentação de estruturas anatômicas em dissilicato de lítio sobre pilares pré-fabricados em titânio. Este tipo de pilar (*TiBase* – ou base em titânio) possibilita a cimentação extraoral da restauração sobre a base pré-fabricada em titânio, resultando em um perfil de emergência personalizado. Ainda, permite diversas combinações diferentes de materiais restauradores, maximizando os potenciais resultados estéticos.

Diversos estudos *in vitro* e estudos clínicos são reportados na literatura quanto a colonização bacteriana de pilares de zircônia frente aos pilares metálicos tradicionais. Esfahanizadeh et al. (2018), realizaram um estudo *in vitro* onde discos estéreis de titânio e zircônia, foram colocados em placas estéreis de 48 poços. A formação de biofilme foi induzida pela adição de saliva e suspensões humanas esterilizadas e não estimuladas de *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Prevotella intermedia* (Pi) aos poços. Bactérias viáveis no biofilme foram quantificadas através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR *real time*). O material do disco, o tipo de bactéria e suas interações tiveram efeitos significativos nas contagens bacterianas. Em todas as superfícies, a contagem de Pg foi significativamente maior do que as contagens de Pi e Aa ($P = 0,0001$). A maior e a menor contagem foram encontradas nas superfícies de zircônia e titânio, respectivamente.

Já de Avila et al. (2017), avaliaram o efeito de dois materiais disponíveis comercialmente na fase de adesão e formação de biofilme. Discos (8 mm de diâmetro, 2 mm de espessura) de titânio puro usinado (Ti) e de zircônia estabilizada por ítrio (ZrO_2) foram usados para reproduzir os pilares dos implantes. As propriedades físico-químicas da superfície foram investigadas usando diferentes abordagens. Bactérias colonizadoras iniciais e de formação de biofilme foram avaliadas após 16 e 48 horas. Os discos foram incubados em saliva oral. Ti apresentou menores valores de hidrofobia e energia livre de superfície que o ZrO_2 e 6,1 vezes menos bactérias estavam aderidas ao Ti. Após 48 horas, análises quantitativas detalhadas mostraram que a biomassa do biofilme e a densidade do biofilme foram menores nos discos de Ti do que no ZrO_2 . A quantidade de filotipos nas superfícies de Ti e ZrO_2 foi relativamente similar durante os períodos de fixação e início do biofilme. Embora nenhuma diferença no perfil de bactérias tenha sido observada entre os dois materiais independente do período de tempo de avaliação, o nível mais alto de colonização foi em ZrO_2 .

Já estudos clínicos como o de Freitas et al. (2018), caracterizaram em 6 meses de seguimento o perfil microbiano de implantes restaurados com pilares de titânio ou zircônia. Vinte indivíduos saudáveis foram investigados. Metade dos participantes tinham implantes restaurados com titânio e metade com pilares de zircônia. O biofilme foi coletado dos locais relacionados ao implante após 1, 3 e 6 meses de carregamento. Os genes 16S rDNA foram amplificados e sequenciados com a plataforma Roche / 454. Os autores encontraram em seus resultados que superfícies relacionadas a titânio e zircônia são prontamente colonizadas por uma comunidade bacteriana similar àquelas encontradas nos dentes adjacentes restantes, sugerindo também uma adesão seletiva de diferentes genótipos bacterianos para superfícies de

titânio ou zircônia. O estudo de Raffaini et al. (2018), teve como objetivo identificar e quantificar até 42 espécies no biofilme inicial de implantes dentários restaurados com pilares de titânio ou zircônia. Um total de 720 amostras de 20 indivíduos saudáveis foram investigadas. As amostras foram coletadas dos sulcos peri-implantar, parte interna dos implantes, superfícies dos pilares e das coroas protéticas durante um período de funcionamento de 30 dias. A técnica hibridação DNA-DNA *Checkerboard* foi usada para detecção e quantificação microbiana. Características clínicas (profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, nível clínico de inserção e perda óssea marginal) também foram investigadas durante o período de monitoramento. As contagens do genoma foram baixas no ponto de tempo de carregamento do implante para ambos os materiais do pilar e aumentaram com o tempo. Tanto o titânio quanto a zircônia grupos apresentaram contagem microbiana e diversidade semelhantes ao longo do tempo, e a microbiota foi muito semelhante à colonização dos dentes remanescentes. Os achados clínicos foram consistentes com uma condição saudável, sem diferença significativa em relação à perda óssea marginal entre os dois materiais.

Diversos estudos utilizaram técnicas moleculares para a detecção de microrganismos sobre as superfícies de implantes e pilares. O *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization* é um método molecular de alto rendimento que permite a identificação e quantificação de uma ampla gama de espécies bacterianas em múltiplas amostras simultaneamente (SOCRANSKY et al., 1994; SOCRANSKY et al., 2004; SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005). Esta técnica é usada para determinar a similaridade de sequência entre DNAs de diferentes origens e a quantidade de repetição de sequência dentro de um DNA. É uma ferramenta útil para a enumeração de espécies bacterianas em grandes amostras de sistemas microbiologicamente complexos (SOCRANSKY et al., 2004). Esta técnica tem sido empregada em vários estudos para avaliação da microbiota na saliva (SACHDEO et al., 2008), placa supra gengival (HAFFAJEE et al., 2008; TELES et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2015), placa subgengival (SOCRANSKY et al., 1998; TELES et al., 2008; DO NASCIMENTO et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2015), em tecidos moles orais (MAGER et al., 2003), em dentaduras (SACHDEO et al., 2008), de implantes dentários (GERBER et al., 2006; BARBOSA et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2012; PITA et al., 2017) e em amostras de canais radiculares (BRITO et al., 2007; TAVARES et al., 2011; DE MIRANDA; COLOMBO, 2017; TRICHES et al., 2018). O uso de saliva humana como meio contaminante em conjunção com a metodologia de hibridação DNA-DNA

Checkerboard tem permitido a avaliação de um largo espectro de espécies microbianas que colonizam as amostras após a incubação (DO NASCIMENTO et al., 2017).

Dada a existências de inúmeros esforços para que se melhore a previsibilidade da terapia com implantes, como estratégias para o tratamento da peri-implantite, são necessários estudos que avaliem o comportamento de novos materiais, seja no aspecto da osseointegração, quanto à contaminação bacteriana. Os estudos mostram discordância quanto a diversidade dos microrganismos encontrados em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, assim como os estudos referentes ao perfil microbiano de superfícies de pilares em titânio e zircônia ainda não são conclusivos. Devido ao não consenso do genoma microbiano resultante das diferentes associações entre implantes com superfícies hidrofílica e hidrofóbica e pilares em titânio e zircônia, este estudo *in vitro* propôs a simulação de diferentes associações entre implantes e pilares. Foi utilizado o método de diagnóstico odontológico molecular DNA-DNA *Checkerboard* para fornecer informações sobre o perfil microbiano associado as diferentes associações implante-pilar.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar o perfil microbiano do biofilme formado sobre implantes com diferentes tratamentos de superfície associados a diferentes pilares.

Objetivos específicos

- ✓ Identificar e quantificar, por meio da técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*, as espécies microbianas associadas a implantes com superfície hidrofílica e hidrofóbica quando associados a em titânio ou em zircônia.
- ✓ Analisar descritivamente a formação do biofilme sobre os implantes e pilares através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Hipótese nula

A hipótese nula testada foi que os diferentes tipos de superfícies de implantes e pilares não influenciam a colonização microbiana.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Implantes e componentes utilizados

Foram utilizados 40 implantes odontológicos de titânio com 11,5 mm de altura, todos com conexão do tipo cone morse ($\varnothing$ 4,5 mm), sendo 20 implantes com superfície tratada por jateamento de areia, ataque ácido, modificada quimicamente para ser hidrofílica (Helix Grand Morse Acqua – Neodent[®] - Curitiba – PR – Brasil – Lote 800320427) e 20 pelos implantes com superfície tratada por jateamento de areia e ataque ácido, hidrofóbico (Helix Grand Morse– Neodent[®] - Curitiba – PR – Brasil – Lote 800313177).

Além disso, foram utilizados 20 pilares protéticos ($\varnothing$ 4,5 mm), com 4 mm de altura cimentável e 2,5 mm de altura de transmucoso, fabricados em liga de titânio (Munhão Universal Click GM Exact - Neodent[®] - Curitiba – PR – Brasil – Lote 800300949) e 20 pilares protéticos em zircônia, sendo os últimos obtidos através da fresagem de blocos de zircônia pela técnica CAD/CAM.

Nos grupos que receberam pilares de zircônia, sobre cada implante foi instalado um *TiBase* ($\varnothing$ 4,5 mm) 4 mm de altura cimentável e 2,5 mm de altura de transmucoso (Base de titânio GM Exact - Neodent[®] - Curitiba – PR – Brasil-Lote 800307804), responsável por fazer a conexão entre o pilar de zircônia e a conexão interna do implante. Esta base de titânio assegura conexão precisa e estável entre pilar e implante e ainda facilita o processo de cimentação do pilar, uma vez que sua área cimentável apresenta guias de orientação que funcionam como índice para o correto assentamento do componente em zircônia obtido via CAD/CAM.

Sobre os *TiBases* foram projetados pilares em zircônia, réplicas do pilar metálico (munhão universal) do outro grupo. Os pilares foram obtidos via processamento CAD/CAM a partir do *software* Dental Wings Open System – DWOS[®] (Dental Wings, Montreal, Canadá).

3.2. Obtenção dos pilares em zircônia

A biblioteca virtual do *software* DWOS[®] permite a seleção do *TiBase* pré-determinado. Realizou-se o escaneamento do pilar metálico utilizando um escâner para CAD/CAM CERAMILL MAP 400 (Amann Girrbach Curitiba, Brasil) (Figura 1A e 1B). Ao *software* foram dadas informações das dimensões do pilar que foi preparado. O arquivo .stl gerado com a imagem do pilar foi enviada à central de usinagem (Figura 1C). A fresagem das peças foi

executada na fresadora Ceramill Motion II (Amann Girrbach, Curitiba, Brasil) a partir de blocos de zircônia pré-sinterizada Ceramill Zi (Amann Girrbach, Curitiba, Brasil) (Figura 1D e1E).

Figura 1 – Confeção dos pilares cerâmicos em Zn pelo CAD/CAM. A: Escâner para CAD/CAM; B: Escaneamento do pilar modelo; C: Ajustes e redimensionamento dos pilares no software DWOS®; D: Bloco de zircônia posicionado na fresadora; E: Fresagem do pilar cerâmico concluída.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

Os pilares foram separados do bloco pela secção dos *sprues*, receberam acabamento com borrachas específicas para trabalho em zircônia pré-sinterizada (Ceramil Polish Lab Kit, Amanngirrbach, Curitiba, Brasil) e foram, então, sinterizados no forno inFire HTC Speed (Sirona Dental, Long Island City, Estados Unidos), segundo as recomendações do fabricante da zircônia.

Cada pilar de zircônia após sinterização recebeu polimento com borrachas específicas, sendo que apenas a área da altura do trasmucoso foi polida, mantendo-se intacta a região cimentável (Ceramil Polish Lab Kit, Amanngirrbach, Curitiba, Brasil). Após o polimento foi analisado microscopicamente quanto à adaptação do pilar ao respectivo *TiBase* e eventuais falhas. Pilares com defeitos visíveis foram descartados e repetidos.

Após finalizados os procedimentos de acabamento, foi realizada a cimentação dos pilares de Zn aos *TiBases*. Foi utilizado cimento resinoso dual autoadesivo Relyx U200 (3M ESPE, Sumaré, SP, Brazil), este foi manipulado pelo mesmo comprimento das pastas base e catalisadora, segundo as recomendações do fabricante. O cimento manipulado foi depositado sobre a região cimentável do *Tibase* e, sobre esta, acoplado o pilar em zircônia. Sobre o conjunto foi aplicada carga vertical pela haste do delineador e os excessos de cimento imediatamente removidos com escovas tipo *microbrush* e instrumentos específicos (Figura 2A e 2B). Após 5 minutos foi realizada a fotopolimerização do cimento pelo tempo de 20 segundos por cada face do pilar (mesial, distal, vestibular, palatina e incisal) (Figura 2C).

Figura 2 - Cimentação dos pilares cerâmicos: A: Carga vertical do delineador sendo executada no pilar após a aplicação do cimento resinoso; B: Remoção dos excessos de cimento prévia a fotopolimerização com auxílio de *microbrush*; C: Fotopolimerização do cimento.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

Os *TiBases* com os pilares cimentados, foram enviados para a esterilização através de raio gama. A dose de radiação foi de 25 kGy, sendo utilizado o irradiador com fontes de cobalto-60 do tipo Gammacell 220 série nº 142, procedimento este realizado no Centro de Tecnologia das Radiações –CTR –IPEN.

3.3. Grupos de estudo

Este estudo foi constituído por 4 grupos, sendo 10 conjuntos implantes/pilares associados para cada situação experimental (Quadro 1). Dos 10 conjuntos, 7 foram destinados para a análise pela técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* e 3 foram destinados para análise através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a execução desse estudo e determinação do “n” amostral foram utilizadas as referências de trabalhos que utilizaram

implantes associados a pilares contaminados (DO NASCIMENTO et al., 2012; PITA et al., 2017).

Quadro 1 – Grupos experimentais do estudo.

Grupo	Descrição
NTi	Implante de superfície NeoPoros® (hidrofóbica), associado a pilar de titânio
ATi	Implante de superfície Acqua® (hidrofílica), associado a pilar de titânio
NZn	Implante de superfície NeoPoros® (hidrofóbica), associado a pilar de zircônia
AZn	Implante de superfície Acqua® (hidrofílica), associado a pilar de zircônia

Fonte: Acervo pessoal (2019).

3.4. Contaminação dos implantes

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (CAAE 79008917.1.0000.5419; anexo A). Para a contaminação dos implantes foi coletada saliva e o biofilme supragengival de 20 pacientes, que foram selecionados dentre os pacientes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Aos voluntários foi facultado o direito de decidir sobre sua participação ou não na fase experimental deste estudo. Todas as orientações com relação à pesquisa foram explicadas aos pacientes, sendo que ao final, se de acordo, estes assinaram o Termo de Comprometimento Livre Esclarecido (TCLE). Na fase de recrutamento foram incluídos indivíduos saudáveis, de ambos os gêneros, na faixa de 25 a 60 anos de idade (início e maximização da doença periodontal, que geralmente leva à perda dentária e necessidade de empregar implantes dentários). Foram excluídos os voluntários com distúrbios sistêmicos (imunodeficiências, diabetes entre outras); em antibioticoterapia, gestantes ou fumantes; indivíduos com gengivite ou periodontite. As coletas foram realizadas em momentos semelhantes e em pacientes com idades próximas, a fim de obter uma maior uniformidade da amostra de saliva e biofilme, reduzindo a variabilidade. Para a coleta foi solicitado que o paciente depositasse 5 mL de saliva não estimulada em um tubo um plástico tipo Falcon. Com relação à coleta do biofilme, este foi realizado o auxílio de aplicadores descartáveis do tipo *microbrush* removendo-o delicadamente da porção palatina/lingual e vestibulares de um ou mais dentes e posteriormente condicionando-o em tubo plástico estéril. Após a coleta da saliva e do biofilme, ambos os tubos foram acondicionados em uma caixa térmica com gelo, a fim de manter a viabilidade dos microrganismos. Todos os

procedimentos realizados para coleta e processamento das amostras foram realizados com jalecos, luvas, máscaras e gorros estéreis.

As etapas microbiológicas do estudo foram realizadas em ambiente asséptico, livre de contaminação externa em fluxo laminar. Todas as vidrarias e instrumentais foram esterilizados. A amostra de saliva dos 20 pacientes foi transferida para um tubo único e misturadas a amostras de biofilme supragengival, sendo homogeneizados durante 3 minutos e posteriormente armazenados em uma estufa bacteriológica a 37°C até o início do teste de contaminação dos implantes.

Posteriormente a coleta, realizou-se a contaminação dos implantes/pilares. Os implantes foram removidos das embalagens, e posteriormente um a um foram conectados ao seu respectivo pilar protético. Para conexão final dos pilares cerâmicos ou metálicos aos implantes foi utilizado o torque recomendado pelo fabricante (20N.cm). Todos os pilares protéticos tiveram o orifício do parafuso vedado com fita teflon e guta-percha.

Após a conexão, os implantes associados aos pilares foram então colocados em microtubos contendo 2 mL de saliva, verificado anteriormente como suficiente para recobrir os implantes e pilares (Figura 3A e 3B). O conjunto de tubos e suas respectivas estantes foi envolto em filme de PVC e foram incubados por 7 dias, em estufa a 36,5°. Os procedimentos de coleta da saliva e incubação seguiram o que foi descrito por Pita et al. (2017).

Figura 3 - Incubação dos conjuntos implante-pilar: A: Implante associado a pilar cerâmico; B: Implante associado a pilar metálico.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

3.5. Avaliação Microbiológica através da técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*

3.5.1. Coleta das amostras do biofilme formado sobre os implantes/pilares

Após passados os 7 dias de incubação dos implantes e pilares associados, foi realizada a coleta das amostras do biofilme formado sobre os implantes/pilares. Os microtubos foram abertos, o conjunto implante/pilar retirado e colocado em microtubo contendo 800 µl de TE, posteriormente realizou-se a desintegração do biofilme no agitador de tubos (AP 56, Phoenix Luferco, Araraquara, Brasil) por 1 minuto, por fim retirou-se o conjunto implante/pilar e com o auxílio de uma escova tipo *microbrush* foi realizada a coleta do biofilme formado sobre os implantes/pilares, com movimentos de varredura por toda a superfície (Figura 4A e 4B). As amostras coletadas foram transferidas para microtubos individuais identificados e contendo 150µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6), aos quais foram adicionados 150µL de NaOH 0,5M o que permitiu a lise e a suspensão do DNA na solução. Ao todo, entre amostras dos implantes e dentes contralaterais, foram coletadas 28 amostras de biofilme. Todos os microtubos foram armazenados em temperatura de -20°C até o processamento pela técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*.

Figura 4 - Coleta do biofilme formado sobre a superfícies dos implantes associados a pilares protéticos: A: Implante associado a pilar cerâmico; B: Implante associado a pilar metálico.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

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

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

3.5.3. Obtenção das espécies-alvo de detecção

Para este estudo foram selecionadas quarenta e uma espécies de microrganismos, sendo que destes três eram de espécies de *Candida*, que são frequentemente encontradas na microbiota oral de indivíduos saudáveis e que estão associados à doença periodontal e peri-implantar. Para melhor entendimento desse estudo, as espécies microbianas foram organizadas de acordo com Socransky et al. (1998), sendo que as demais espécies foram enquadradas como “outras espécies”. O grupo “fungos” incluiu as três espécies de *Candida* investigadas. No quadro 2, estão listadas as 38 espécies bacterianas e as 3 espécies de fungos usadas como alvo de detecção pela técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*

Para a detecção dos microrganismos foram adquiridos o DNA genômico de 28 espécies de microrganismos (American Type Culture Collection - ATCC®, EUA). Treze espécies (*E. corrodens*, *E. Coli*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. nigrencens*, *S. gordonii*, *S. moreei*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pasteurii*, *S. sobrinus*, *C. albicans*, *C. dublinienses*) foram cultivadas no Laboratório de Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Utilizou-se meio de cultura líquido específico para cada microrganismo, por 24 horas, a 37°C. Em seguida, foi extraído o DNA genômico das 13 espécies de microrganismos, utilizando o protocolo de extração CTAB (Doyle, 1990, modificado).

Quadro 2 – Espécies-alvo da detecção pela técnica de hibridização com sondas de DNA genômico DNA-DNA Checkerboard.

Espécies	N.º ATCC	Espécies	N.º ATCC
Complexo Vermelho		Outras Espécies	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	<i>Bacteroides fragilis</i>	25285
<i>Tannerella forsythia</i>	43037	<i>Escherichia coli</i>	25927
<i>Treponema denticola</i>	35405	<i>Enterococcus faecalis</i>	700802
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BAA-1705
Complexo Laranja		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4357
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Lactobacillus casei</i>	334
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25586	<i>Mycoplasma Orale</i>	23714
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	<i>Mycoplasma Salivarium</i>	23064
<i>Parvimonas micra</i>	33270	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	49031
<i>Prevotella nigrescens</i>	25261	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442
		<i>Pseudomonas putida</i>	700007
Complexo Amarelo	49456	<i>Solobacterium moreei</i>	CCUG39336
<i>Streptococcus mitis</i>	35037	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Streptococcus oralis</i>	10556	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	51129
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10558	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	9809
<i>Streptococcus gordonii</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	700610
		<i>Streptococcus salivarius</i>	9759
Complexo Verde	700685	<i>Streptococcus sobrinus</i>	27607
<i>Aggregatibacter</i>	33624	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	BAA-334
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	23834	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	903
<i>Eikenella corrodens</i>			
		Fungos	
Complexo Roxo	10790	<i>Candida albicans</i>	9028
<i>Veillonella parvula</i>		<i>Candida dubliniensis</i>	7984
		<i>Candida tropicalis</i>	66029

Fonte: Acervo pessoal (2019).

3.5.4. Processamento das amostras de pela técnica de hibridização DNA-DNA

Checkerboard

3.5.4.1. Confeção das Sondas de DNA genômico

De acordo com o protocolo proposto pelo fabricante do marcador genômico (Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detect System, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), realizou-se a confecção das sondas genômicas das 41 espécies alvo de detecção deste estudo. Nesse protocolo 100 ng do DNA genômico do microrganismo alvo são marcadas, com uma concentração final 1 ng/ μ L de sonda na solução de hibridização. Foram diluídos os DNAs dentro de microtubos, em volume de 10 μ L com concentração de 10 ng/ μ L. Finalizada a diluição, os DNAs sofreram desnaturação em água fervente durante 5 minutos, sendo posteriormente resfriados em gelo por 5 minutos, mantendo as cadeias de nucleotídeos abertas. Com os microtubos resfriados, adicionou-se os componentes do kit de marcação: 10 μ L de *Reaction buffer*, 2 μ L de *Labelling reagent* e 10 μ L de *Cross-linker solution* (1:4) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Posteriormente realizou-se a agitação por pipetagem de cada microtubo, e foram incubados em 37° durante 30 minutos em banho-maria. Ao final foi adicionado glicerol (50% v/v) dentro de cada microtubo com a sonda do DNA marcada, e estes foram estocados em -20°C até etapa de processamento das amostras de biofilme.

3.5.4.2. Verificação da sensibilidade das sondas genômicas

Foi realizado o ajuste da sensibilidade da técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*, para que se pudesse observar as reações de hibridização positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células microbianas, de acordo com o que foi estabelecido por Socransky et al. (1994). Realizou-se a diluição do DNA genômico das 41 espécies até que se atingisse as concentrações de 10^5 e 10^6 células microbianas, e foram hibridizadas contra as sondas marcadas. As diluições são utilizadas como padrões de referências após as reações de hibridização para quantificar os microrganismos.

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

Inicialmente, descongelou-se em temperatura ambiente os microtubos contendo as amostras de biofilme dos implantes incubados em saliva. As amostras foram então homogeneizadas por 4 minutos utilizando um agitador de tubos para que fosse desagregado todo o conteúdo do microtubo, posteriormente estes foram fervidos a 95°C por 5 minutos para que ocorresse a desnaturação das fitas de DNA, ao final os microtubos foram imediatamente resfriados por 5 minutos em contato com gelo.

Sobre uma membrana de nylon de 15 cm² carregada positivamente (Hybond N+, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) foram aplicadas as amostras de DNA. Para isso foi utilizado o aparelho denominado *Minislot* 30 (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) – Figura 5. Nele, 28 amostras de DNA e os padrões 10⁵ e 10⁶ células de cada espécie-alvo, podem ser depositados em canaletas individuais. As amostras e padrões de comparação foram aplicadas no interior das canaletas com auxílio de pipetas automáticas de precisão. Passados 5 minutos, tempo necessário para o estabelecimento de ligações entre o DNA e a membrana de nylon, o que restou de solução dentro do aparelho foi removido com auxílio de uma bomba a vácuo. Posteriormente, a membrana foi retirada do aparelho e transferida para um invólucro de papel *kraft*, sendo mantida em estufa a 120°C SX 1.2 DTME, Sterilifer Ind. e Com. Ltda., Diadema, SP, Brasil), por 20 minutos, para a fixação do DNA à membrana.

Figura 5: Aplicação das amostras de DNA sobre a membrana. A: Aparelho *Minislot* 30 fechado; B: Aparelho aberto e membrana posicionada; C: Aplicação das amostras de DNA.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

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

Realizada a fixação dos DNAs das amostras de biofilme e dos padrões de comparação, foi preparada uma solução contendo NaCl 1M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e *Blocking reagent* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) diluídos em 30 mL de *Hybridization Buffer* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), que foi aplicada sobre a membrana, que foi embalada em invólucro plástico e pré-hibridizada em 63,5°C, durante 6 horas - Figura 6.

Figura 6 – Pré-hibridização da membrana em 63,5°C no forno de hibridização.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

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

Finalizada a etapa de pré-hibridização, utilizando um dispositivo de acrílico denominado *Miniblotter* 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) a membrana foi posicionada para a aplicação das sondas genômicas dos 41 microrganismos analisados. A disposição das amostras de DNA, previamente fixadas a membrana formam ângulo de 90° com as canaletas do *Miniblotter* 45, o que se assemelha a um tabuleiro xadrez (*Checkerboard*) – 45 sondas genômicas x 28 amostras de DNA e os controles 10^5 e 10^6 . Diante do exposto, foram então aplicadas 160 µL de sonda genômica das 41 espécies-alvo em cada canaleta de modo que ocorresse reações de hibridização independentes. Finalizada a aplicação das sondas, o aparelho *Miniblotter* 45 foi envolvido em filme de PVC e embalado em saco plástico de modo a evitar o ressecamento da membrana. O conjunto foi então levado para a reação de hibridização no forno de hibridização em temperatura de 63,5°C, sob agitação suave durante 16 horas (Figura 7).

Figura 7 - Aplicação das sondas de DNA genômico. A: Aparelho *Miniblotter* 45 fechado; B: Aparelho com membrana posicionada; C: Aplicação das sondas DNA; D: Reação de hibridização no forno de hibridização.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

3.5.4.6. Lavagem das membranas para remoção das sondas não hibridizadas

Concluída a reação de hibridização, as membranas foram lavadas para a remoção das sondas que não hibridizaram por completo (ligações inespecíficas entre os DNAs). Realizou-se duas lavagens de 30 minutos cada, em 67,5°C, com 500 mL de solução de Urea 2 M (Sigma Chemical Co.), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1% (Sigma Chemical Co.), NaH₂PO₄ 50 mM (pH=7; Sigma Chemical Co.), NaCl 150 mM (Sigma Chemical Co.), MgCl₂ 1mM (Sigma Chemical Co.) e *Blocking Reagent* (GE Healthcare). Mais duas lavagens de 15 minutos cada foram realizadas em temperatura ambiente, com 500 mL de solução contendo Tris 1 M (Sigma Chemical Co.), NaCl 2 M (Sigma Chemical Co.) e MgCl₂ 1M (Sigma Chemical Co.). As lavagens foram realizadas sob agitação vigorosa, em forno de hibridização.

3.5.4.7. Detecção dos sinais de hibridização

Os sinais de hibridização provenientes do cruzamento dos DNAs das amostras de biofilme coletadas com os DNAs das sondas genômicas marcadas de cada uma das 41 espécies-alvo foi detectado por meio de reação de quimiluminescência. Terminado o procedimento de lavagem, 3 mL de reagente de detecção CDP-Star® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) foram aplicados sobre a membrana, este ficou em contato com a membrana por 30 minutos, sob proteção da luminosidade. Ao final, o excesso de reagente de detecção foi removido e a membrana embalada com filme plástico de Policloreto de Vinila (PVC) para que se realizasse a exposição em cassete de autorradiografia.

3.5.4.8. Exposição da membrana e Revelação

A membrana então foi posicionada dentro de um cassete de autoradiografia (Hypercassete, Buckinghamshire, Reino Unido), em câmara escura, permanecendo em contato com um filme para autorradiografia (HyperFilm, GE Healthcare), durante 1 hora. Terminado esse período, os filmes expostos foram revelados e fixados em soluções de processamento radiográfico convencional (Kodak, Rochester, NY, EUA). Terminada essa etapa obteve-se um filme autorradiográfico que permite a observação de sinais positivos de hibridização nas regiões de intersecção entre as amostras e sondas cruzadas, onde ocorreu o pareamento das cadeias de DNA, confirmando assim a presença de determinada espécie-alvo investigada.

3.5.5. Interpretação dos sinais de hibridização

Obtido o filme radiográfico com os sinais de hibridização (Figura 8), este foi fotografado e a imagem obtida foi analisada no software CLIQS 1D® (Totallab, Newcastle, Inglaterra), que permitiu a identificação da quantidade aproximada de células microbianas presentes em cada amostra de biofilme avaliada, a partir da comparação da intensidade dos sinais de hibridização obtidos pela intersecção das amostras contra as sondas marcadas em relação à intensidade dos padrões contendo 10^5 e 10^6 células de cada uma das 41 espécies-alvo.

Figura 8 – Filme radiográfico denotando a presença sinais de hibridização.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

3.6. Microscopia eletrônica de varredura dos implantes/pilares

Através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foram analisados os perfis de colonização bacteriana dos implantes associados aos pilares de titânio ou zircônia. Após a remoção da saliva, 3 implantes de cada grupo foram imersos para fixação em solução de glutaraldeído a 3,0% em tampão de cacodilato de sódio a 0,1M e pH 7,4 por 12 horas, a 5°C. Posteriormente as amostras foram lavadas em solução tampão pura em um intervalo de 15 minutos, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% a 50°C por 4 horas, desidratadas em série de álcool a 15, 30, 50, 75, 95 e 100% durante 15 minutos para cada concentração. Na sequência procedeu-se a metalização e a montagem dos corpos de prova em suporte para análise MEV.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Resultado das análises microbiológicas

Foi realizado teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) e uma vez que alguns grupos apresentaram distribuição não normal foi realizada a análise em Modelo Linear Generalizado. As múltiplas comparações foram realizadas com ajuste de Bonferroni. Para o *S. salivarius* dois grupos não apresentaram contagem de microrganismos e assim foi aplicado teste U de Mann-Whitney. Foi considerado nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa IBM SPSS *Statistics* 20 (IBM Corporation, Amonk, NY, EUA).

A presença de microrganismos sobre a superfície dos implantes/pilares foi detectada pela técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Após 7 dias de incubação dos implantes/pilares em saliva humana, os conjuntos do grupo formado por implante de superfície NeoPoros (hidrofóbica) associado a pilar de titânio (NTi), implante de superfície Acqua (hidrofílica) associado a pilar de titânio (ATi), implante de superfície NeoPoros (hidrofóbica) associado a pilar de zircônia (NZn) e implante de superfície Acqua (hidrofílica) associado a pilar de titânio (AZn), apresentaram sinais de colonização microbiana nas superfícies dos implantes e pilares.

As Tabelas 1 a 3 representam a mediana (Q2) e intervalo interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das espécies pertencentes aos complexos de patogenicidade ou não, detectadas no biofilme.

Tabela 1 - Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das espécies pertencentes aos complexos bacterianos de Socransky et al. (1994) detectadas no biofilme.

Microrganismo	NTi	ATi	NZn	AZn	p*	p**	p***
<i>P. gingivalis</i>	0 (-0,25; 0,74)	0 (- ; -) [∞]	0 (- ; -) [∞]	0 (-0,17; 0,41)	0,583	0,583	0,099
<i>T. forsythia</i>	0,79 (0,23; 2,40) ^a	0 (-0,06; 0,38) ^b	0 (-0,17; 0,75) ^b	1,14 (0,28; 1,33) ^{ab}	0,194	0,446	0,001
<i>T. denticola</i>	1,74 (1,08; 2,6) ^a	0 (-0,62; 1,81) ^b	0 (- ; -) [∞]	0 (-0,05; 0,17) ^b	0,029 ⁻	0,001 [±]	0,016
<i>C. rectus</i>	3,92 (3,36; 5,51) ^a	2,98 (2,57; 3,60) ^b	1,08 (0,84; 1,34) ^c	2,08 (1,70; 2,06) ^b	0,612	<0,001 [±]	<0,001
<i>C. gracilis</i>	4,01 (2,55; 4,65)	1,89 (1,19; 3,29)	1,52 (0,94; 3,54)	2,85 (2,38; 4,22)	0,718	0,718	0,003 [#]
<i>F. nucleatum</i>	2,58 (8,74; 3,80) ^a	2,32 (1,69; 3,11) ^a	0,91 (0,36; 1,41) ^b	2,26 (1,69; 3,08) ^a	0,024 [±]	0,036 [±]	0,040
<i>P. intermedia</i>	0,06 (-0,09; 1,50) ^a	0 (- ; -) [∞]	0 (- ; -) [∞]	0 (-0,03; 0,07) ^b	0,023 ⁻	0,023 [±]	0,016
<i>P. micra</i>	0,94 (0,05; 1,91)	1,73 (1,13; 2,22)	2,58 (0,91; 3,96)	4,89 (3,68; 5,69)	<0,001 [±]	<0,001 [±]	0,053
<i>P. nigrescens</i>	1,11 (0,40; 2,39) ^a	1,6 (1,12; 2,43) ^a	2,15 (0,94; 2,92) ^a	4,35 (2,79; 5,83) ^b	0,001 [±]	<0,001 [±]	0,015
<i>S. oralis</i>	1,55 (0,84; 2,51) ^a	2,53 (1,00; 3,12) ^a	2,89 (2,54; 3,61) ^a	4,95 (4,10; 5,68) ^b	<0,001 [±]	<0,001 [±]	0,022
<i>S. sanguinis</i>	0,49 (0,14; 0,90) ^a	0,34 (0,16; 0,60) ^a	0,52 (0,10; 0,76) ^a	1,78 (1,13; 2,21) ^b	<0,001 [±]	<0,001 [±]	<0,001
<i>S. gordonii</i>	5,14 (4,18; 5,90) ^a	4,29 (2,34; 5,43) ^a	1,8 (1,17; 2,21) ^b	4,19 (3,37; 5,58) ^a	0,044 [±]	0,001 [±]	<0,001
<i>Aa. a</i>	8,93 (8,86; 9,15)	9,22 (9,10; 9,31)	9,26 (9,02; 9,41)	9,49 (9,36; 9,49)	<0,001 [±]	<0,001 [±]	0,830
<i>C. gingivalis</i>	4,61 (4,00; 5,55)	3,65 (3,41; 4,13)	1,87 (1,46; 2,94)	1,95 (1,69; 2,45)	0,012 ⁻	<0,001 [±]	0,053
<i>E. corrodens</i>	4,65 (2,86; 6,05)	3,14 (2,47; 4,35)	1,08 (0,59; 1,90)	1,61 (0,82; 2,52)	0,445	<0,001 [±]	0,070
<i>V. parvula</i>	1,04 (-6,12; 1,28) ^a	0 (-0,06; 0,15) ^b	0 (-0,01; 0,02) ^b	0 (-0,06; 0,29) ^b	<0,001 ⁻	<0,001 [±]	<0,001

* Implante, [±]Acqua> NeoPoros e ⁻Acqua<NeoPoros; ** Pilar protético, [±]Zircônia> Titânio e [±]Zircônia<Titânio; *** Interação Implante vs Pilar protético: para p<0,05 as ^{ab} letras minúscula iguais indicam semelhança estatística entre os grupos, detectadas por múltiplas comparações com ajuste de Bonferroni. [∞] Não houve contagem de microrganismo para esta situação; [#] após o ajuste de Bonferroni (pós teste), não foram identificadas diferenças significantes.

Tabela 2 - Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma (x 10⁵ células) das demais espécies detectadas no biofilme.

Microrganismo	NTi	ATi	NZn	AZn	p*	p**	p***
<i>B. fragilis</i>	5,36 (4,86; 5,98) ^a	4,8 (4,2; 4,8) ^b	3,89 (3,45; 4,43) ^b	4,42 (4,01; 5,17) ^b	0,740	<0,001 [±]	<0,001
<i>E. coli</i>	2,07 (7,07; 2,83) ^a	0,91 (0,25; 1,98) ^{ab}	0 (-0,07; 0,34) ^b	1,21 (0,42; 2,18) ^a	0,406	0,019 [∞]	0,003
<i>E. faecalis</i>	3,32 (2,26; 4,06) ^a	1,96 (1,42; 2,52) ^b	1,12 (0,46; 1,51) ^c	1,62 (1,44; 2,12) ^{bc}	0,397	<0,001 [±]	<0,001
<i>K. pneumoniae</i>	1,79 (1,11; 3,81) ^a	0,57 (0,29; 0,94) ^b	1,93 (1,19; 2,41) ^b	0,02 (0,08; 0,68) ^b	0,005 ⁻	<0,001 [±]	<0,001
<i>L. acidophilus</i>	1,29 (0,64; 1,73)	1,63 (0,89; 2,68)	2,63 (1,87; 3,48)	4,43 (3,74; 4,96)	0,001 [⊥]	<0,001 [∞]	0,051
<i>L. casei</i>	1,79 (1,11; 3,81) ^a	0,57 (0,29; 0,94) ^{ab}	1,93 (1,19; 2,41) ^b	0,02 (0,08; 0,68) ^b	0,328	0,132	<0,001
<i>M. orale</i>	2,66 (1,77; 3,76) ^{ab}	0,27 (0,46; 2,02) ^c	1,14 (0,35; 2,60) ^{bc}	4,06 (3,07; 5,08) ^a	0,147	0,039 [∞]	<0,001
<i>M. salivarium</i>	2,25 (1,81; 3,86)	3,05 (2,57; 3,41)	3,32 (2,91; 3,58)	4,74 (3,41; 5,21)	0,028 [⊥]	0,002 [∞]	0,102
<i>P. anaerobius</i>	1,11 (0,56; 2,44) ^a	0,02 (0,01; 1,13) ^b	0,02 (0,00; 0,06) ^b	0,89 (0,5; 1,42) ^a	0,194	0,161	<0,001
<i>P. aureginosa</i>	2,09 (1,17; 3,15) ^{ab}	0,89 (0,66; 1,11) ^c	1,35 (0,97; 1,87) ^{bc}	2,74 (1,92; 3,39) ^a	0,930	0,042 [∞]	<0,001
<i>P. endodontalis</i>	2,35 (1,85; 3,46) ^a	2,4 (1,66; 2,74) ^{ab}	1,74 (1,56; 1,97) ^b	2,98 (2,22; 3,24) ^a	0,234	0,394	0,001
<i>P. melaninogenica</i>	1,16 (0,56; 3,70) ^a	0 (- ; -) [∞]	0 (-0,05; 0,27) ^b	1,01 (0,76; 1,42) ^{ab}	0,061	0,128	<0,001
<i>P. putida</i>	1,45 (0,38; 2,93) ^a	0 (-0,16; 0,40) ^b	0 (- ; -) [∞]	0 (-0,07; 0,32) ^b	0,005 ⁻	0,001 [±]	0,001
<i>S. aerus</i>	0,57 (0,23; 1,52) ^{ab}	0 (-0,08; 0,21) ^c	0,01 (-0,08; 0,53) ^{bc}	1,42 (0,62; 1,92) ^a	0,531	0,131	<0,001
<i>S. gallolyticus</i>	2,57 (1,14; 3,27) ^{ab}	1,27 (2,47; 1,82) ^a	1,31 (0,29; 0,28) ^a	3,24 (2,37; 4,02) ^b	0,553	0,046 [∞]	<0,001
<i>S. moreei</i>	1,93 (0,86; 2,84)	2,78 (1,95; 4,18)	2,53 (1,0; 3,12)	4,32 (3,09; 5,55)	<0,001 [⊥]	0,031 [∞]	0,360
<i>S. mutans</i>	0,41 (-0,04; 1,27) ^a	0 (-0,03; 0,08) ^a	0 (-0,25; 0,61) ^a	2,28 (1,35; 2,63) ^b	0,002 [⊥]	<0,001 [∞]	<0,001
<i>S. parasanguini</i>	2,55 (0,97; 3,43) ^{ab}	2,66 (2,16; 2,97) ^{ab}	0,98 (0,39; 2,84) ^a	3,49 (3,11; 3,81) ^b	0,001 [⊥]	0,651	0,032
<i>S. pasteurii</i>	3,69 (2,86; 5,08)	6,34 (5,61; 7,11)	3,69 (2,86; 5,08)	4,03 (1,74; 5,13)	<0,001 [⊥]	0,010 [∞]	0,181
<i>S. pneumoniae</i>	0,75 (0,30; 1,77) ^a	0,42 (0,02; 1,01) ^a	1,19 (0,63; 1,52) ^a	2,36 (1,66; 3,91) ^b	0,036 [⊥]	<0,001 [∞]	<0,001
<i>S. salivarius</i>	0 (-0,03; 0,33) ^a	0 (- ; -) [∞]	0 (- ; -) [∞]	0,17 (0,05; 0,70) ^b	-	-	0,209 [†]
<i>S. sobrinus</i>	4,42 (2,82; 5,24)	5,69 (5,29; 6,42)	4,42 (3,59; 5,58)	6,62 (5,67; 7,52)	<0,001 [⊥]	0,072	0,798

* Implante, [⊥]Acqua> NeoPoros e ⁻Acqua<NeoPoros; ** Pilar protético, [∞]Zircônia> Titânio e [±]Zircônias<Titânio; *** Interação Implante vs Pilar protético: para p< 0,05 as ^{ab} letras minúscula iguais indicam semelhança estatística entre os grupos, detectadas por múltiplas comparações com ajuste de Bonferroni. [∞] Não houve contagem de microrganismo para esta situação; [†] após o ajuste de Bonferroni (pós teste), não foram identificadas diferenças significantes.

Tabela 3 - Mediana (Q2) e Intervalo Interquartil (IIQ) da quantificação do genoma ($\times 10^5$ células) das espécies de fungos detectadas no biofilme.

Microrganismo	NTi	ATi	NZn	AZn	p*	p**	p***
<i>C. albicans</i>	3,58 (1,93; 4,43)	6,48 (3,96; 7,47)	6,01 (4,42; 6,78)	6,6 (4,40; 7,81)	0,007 [±]	0,013 [±]	0,073
<i>C. dubliensis</i>	5,67 (5,21; 6,80)	6,66 (5,41; 7,33)	6,34 (5,49; 7,07)	7,42 (6,05; 8,07)	0,091	0,156	0,544
<i>C. Tropicalis</i>	2,16 (1,40; 2,78) ^a	0 (-0,22; 1,33) ^b	0 (-0,28; 0,69) ^b	3,9 (0,18; 4,92) ^b	0,001 ⁻	<0,001 [±]	<0,001

* Implante, [±]Acqua> NeoPoros e ⁻Acqua<NeoPoros; ** Pilar protético, [±]Zircônia> Titânio e [±]Zircônias<Titânio; *** Interação Implante vs Pilar protético: para p<0,05 as ^{ab} letras minúscula iguais indicam semelhança estatística entre os grupos, detectadas por múltiplas comparações com ajuste de Bonferroni.

Alguns microrganismos mostraram diferenças estatisticamente significantes, quando foram comparados por tipo de superfície. A detecção dos seguintes microrganismos foi maior para os grupos com superfície hidrofóbica (NeoPoros): *T. denticola*; *P. intermedia*; *C. gingivalis*; *V. parvula*; *K. pneumoniae*; *P. putida* e *C. tropicalis*. Já os microrganismos: *F. nucleatum*; *P. micra*; *P. nigrescens*; *S. oralis*; *S. sanguinis*; *S. gordonii*; *Aa. a*; *L. acidophilus*; *M. salivarium*; *S. morei*; *S. mutans*; *S. parasanguinis*; *S. pasteurii*; *S. pneumoniae*; *S. sobrinus*; *C. albicans*; foram detectados em maior expressão para os grupo com superfície hidrofílica (Acqua). Pelo exposto, foram detectados microrganismos em maior expressão sobre os conjuntos formados com implantes de superfície hidrofílica (Acqua).

Com relação aos pilares protéticos, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, quando estes foram comparados. Os grupos com pilares protéticos em metal (Titânio) apresentaram maior detecção para os seguintes microrganismos: *T. dentícola*; *C. rectus*; *F. nucleatum*; *P. intermedia*; *S. gordonii*; *C. gingivalis*; *E. corrodens*; *V. parvula*; *B. fragilis*; *E. faecalis*; *K. pneumoniae*; *P. putida*; *C tropicalis*. Já os grupos com pilares protéticos em cerâmica (Zircônia) apresentaram maior detecção para os microrganismos a seguir: *P. micra*; *P. nigrescens*; *S. oralis*; *S. sanguinis*; *Aa. a*; *E. coli*; *L. acidophilus*; *M. orale*; *M. salivarium*; *P. aureginosa*; *S. aerus*; *S. gallolyticus*; *S. morei*; *S. mutans*; *S. pasteurii*; *S. pneumoniae*; *C. albicans*. De acordo com os dados apresentados os grupos com associação de pilares em cerâmica (Zircônia) apresentaram maiores sinais de detecção de microrganismos.

As bactérias mais prevalentes nos biofilmes aos diferentes grupos foram: NeoPoros/Titânio: *Aa. a* ($8,93 \times 10^5$); *B. fragilis* ($5,36 \times 10^5$); *E. corrodens* ($4,65 \times 10^5$); *C. gingivalis* ($4,61 \times 10^5$); *E. faecalis* ($3,32 \times 10^5$); Acqua/Titânio: *Aa. a* ($9,22 \times 10^5$); *S. pasteurii* ($6,34 \times 10^5$); *S. sobrinus* ($5,69 \times 10^5$); *C. gingivalis* ($3,65 \times 10^5$); *E. corrodens* ($3,14 \times 10^5$); NeoPoros/Zircônia: *Aa. a* ($9,26 \times 10^5$); *S. sobrinus* ($4,42 \times 10^5$); *B. fragilis* ($3,89 \times 10^5$); *M. salivarium* ($3,32 \times 10^5$); *S. pasteurii* ($3,69 \times 10^5$); Acqua/Zircônia: *Aa. a* ($9,49 \times 10^5$); *S. sobrinus* ($6,62 \times 10^5$); *S. oralis* ($4,95 \times 10^5$); *P. micra* ($4,89 \times 10^5$); *M. salivarium* ($4,74 \times 10^5$). A figura 9 representa o perfil microbiano dos grupos estudados.

As espécies patogênicas relacionadas à etiologia da peri-implantite foram avaliadas de acordo com cinco complexos microbianos (vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo) com base na descrição de Socransky et al. (1998). Microrganismos colonizadores iniciais e menos frequentemente associados a doença periodontal foram reunidos no grupo “outras espécies” e três espécies de *Candida* foram reunidas no grupo “fungos”. A figura 10 ilustra a porcentagem (%) do genoma dos grupos microbianos nas amostras de biofilme de acordo com os grupos estudados. De acordo com os achados, o grupo NTi denotou maiores sinais de detecção genômica para os microrganismos do complexo vermelho (3,30%) em comparação com os outros grupos,

Figura 9 - Gráfico de área ilustrando o perfil microbiano do biofilme formado nos diferentes grupos de estudo. Os valores no eixo X representam a quantificação do genoma (x 10⁵ células) de cada uma das 41 espécies-alvo do estudo.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

Figura 10 – Gráfico de setores ilustrando a porcentagem (%) de quantificação do genoma dos grupos microbianos identificados nas amostras de biofilme dos diferentes grupos estudados.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

4.2. Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A obtenção das imagens foi realizada no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem – CADI, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP, utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Leo - 435 VPZeiss. Foram obtidas imagens das superfícies Acqua e NeoPoros após o período de 7 dias de incubação dos implantes (Figura 11A e 11B). De acordo com as imagens é possível observar que ambos os implantes apresentam superfícies rugosas, no entanto a superfície NeoPoros mostra-se com rugosidade controlada em toda sua superfície, já a superfície Acqua apresentou maior número distribuição irregular dos poros. Entretanto, pelo aumento observado não foi possível identificar microrganismos em quantidade relevante, e sua identificação mostrou-se difícil principalmente sobre a superfície Acqua. Em maior aumento foi possível observar microrganismos dispersos sobre os poros da superfície Acqua (Figura 12).

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos implantes estudados após a contaminação: em A (Acqua); B (NeoPoros). Barra=10µm (A e B).

Fonte: Acervo pessoal (2019).

Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície Acqua: observar os microrganismos encontrados nos poros. Barra=10 μ m (A e B).

Fonte: Acervo pessoal (2019).

A formação de microrganismos também foi observada na região intermediária dos pilares protéticos cerâmicos (Zn) e metálicos (Ti). Nos pilares metálicos (Ti) foi avaliada a região intermediária do pilar. Nos pilares cerâmicos a região avaliada foi a do Tibase metálico. Através da análise das imagens foi possível observar a organização de microrganismos sobre ambas as superfícies avaliadas (Figura 13A e 13 B). No entanto, excessos de cimento resinoso encontrados sobre a superfície do *Tibase* nos pilares cerâmicos apresentaram microrganismos aderidos (Figura 14).

Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos pilares (altura de transmucoso) após a contaminação: em A (Ti); B (Zn). Barra=10 μ m (A e B).

Fonte: Acervo pessoal (2019).

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície metálica do *Tibase* associado a pilar cerâmico. Observar excesso de cimento e bactérias associadas. Barra=10µm.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

Também foi avaliada a região superior do pilar protético, correspondente a área de cimentação de coroas protéticas. Foi observada a presença de microrganismos em ambas as superfícies (Figura 15).

Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura (x10.000) das superfícies dos pilares (área de cimentação) após a contaminação: em A (Ti); B (Zn). Barra=10µm (A e B).

Fonte: Acervo pessoal (2019).

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* determinou a composição de amostras de biofilme formado sobre implantes com dois tipos de superfícies; Acqua (superfície tratada por jateamento de areia, ataque ácido, modificada quimicamente para ser hidrofílica) e a superfície NeoPoros (superfície tratada por jateamento de areia e ataque ácido), associados a pilares de Ti (Titânio) e Zn (Zircônia). A análise microbiológica pela técnica DNA *Checkerboard*, foi realizada para identificar e quantificar até 41 espécies de microrganismos associadas ao biofilme formado sobre a superfície de implantes conectados aos seus pilares protéticos, incluindo espécies patogênicas, não-patogênicas e espécies oportunistas frequentemente encontradas no biofilme oral. Testou-se a hipótese nula de que os diferentes tipos de superfícies de implantes e pilares não influenciariam a colonização microbiana. Em nossos resultados foi possível encontrar que os fatores superfície do implante e pilar protético foram responsáveis por detecções de microrganismos distintas, o que causou a rejeição da hipótese nula. Além disso todas as espécies-alvo do estudo (41) foram encontradas em pelo menos um dos quatro grupos estudados. Ao analisar a contaminação global, ou seja, o total de microrganismos detectados em cada grupo, foi possível encontrar que $AZn > NTi > ATi > NZn$. No geral os valores entre AZn e NTi ; e ATi e NZn são semelhantes. No entanto, o perfil microbiano mostrou-se como variável entre os diferentes grupos.

Socransky et al. (1998), na tentativa de compreender a relação entre espécies bacterianas presentes no biofilme oral e seu impacto na saúde dos tecidos de suporte, agruparam os microrganismos em 05 diferentes complexos (vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo) microbianos associados com os parâmetros clínicos da doença periodontal. No presente estudo, as espécies patogênicas relacionadas à etiologia da peri-implantite foram agrupadas com base nesta descrição de Socransky et al (1998). Adicionalmente, microrganismos colonizadores iniciais e pouco associados à doença periodontal foram reunidos no grupo “outras espécies”, e três espécies de *Candida* foram reunidas no grupo “fungos”. Na comparação entre os grupos avaliados, o grupo NTi teve expressão relativamente maior de bactérias do complexo vermelho (3,30%) e roxo (0,92%), quando comparado com os outros grupos, o grupo ATi encontrou maior número de bactérias do complexo verde (19,23%), o grupo NZn apresentou maior quantidade de fungos (16,87%) e o grupo AZn denotou maior expressividade para as bactérias do complexo laranja (14,63%) e demais bactérias avaliadas (52,19%).

Segundo reportado na literatura, a colonização bacteriana atua como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da peri-implantite, ocorrendo desde os 30 minutos após a inserção do implante e continuando durante toda sua vida útil, tornando-se constante desafio na sobrevida a longo prazo dos implantes dentários (MOMBELLI; MULLER; CIONCA, 2012). A microbiota associada a implantes dentários é influenciada pela topografia e propriedades químicas da superfície (GROSSNER-SCHEREIBER et al., 2001; FURST et al., 2007; WU et al., 2011; HICKOK; SHAPIRO, 2012). As primeiras camadas de biofilme determinam a força, arranjo e diversidade de espécies que posteriormente colonizarão a biofilme (BUSSCHER; BOS; VAN DER MEI, 1995; KOLENBRANDER et al., 1999; MARSH; DEVINE, 2011; RIMONDINI et al., 1997). Os estreptococos (*S. oralis*, *S. mitis*; *S. sanguinis*; *S. oralis*. *S. gordonii*, *S. sobrinus*) são os primeiros colonizadores do biofilme e iniciam a sua adesão já nas primeiras quatro horas de formação da película, esses microrganismos representam 60 a 80% de todos os colonizadores primários, que também incluem 5-30% de espécies de *Actinomyces naseledii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ochraceae* (MEREDITH; FAZELI; SCHWARTZ, 1993; ROSAN; LAMONT, 2000; SUBRAMANI et al., 2009). Os microrganismos associados a peri-implantite são similares aos da doença periodontal, sendo constituído por três espécies do complexo vermelho, nomeadas *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* (BOTERO et al., 2005; SHIBLI et al., 2008). No entanto métodos analíticos demonstraram que a microbiota associada à doença peri-implantar mostra-se como mista e um tanto variável, constituída por microrganismos que podem não ser comum na periodontite, como por exemplo, *C. rectus*, *E. coli*, *H. pylori*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *Pseudomonas spp*; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Candida spp* (HEIMDAHL et al., 1983; RAMS 1984; LEONHARDT et al., 1999; KRONSTROM et al., 2001; LEONHARDT; BERGSTROM; LEKHOLM, 2003; HARRIS; RICHARDS, 2006; RENVERT et al., 2007; MOMBELLI; DECAILLET, 2011; PERSSON; RENVERT, 2013; ZHUANG et al., 2014; ALBERTINI et al., 2015;).

Com a notória importância dada as características da superfície dos implantes, modificações são frequentemente implementadas para que a interação da superfície com as células ósseas promova uma maior osseointegração, no entanto o papel dessas modificações sobre a adesão de microrganismos ainda tem sido investigado (HASAN et al., 2013; TSIMBOURI et al., 2016; HASAN; JAIN; CHATTERJEE, 2017; CAO et al., 2018). Nesse estudo foram utilizados dois tipos de superfícies, caracterizadas como hidrofílica e hidrofóbica. Foram utilizados para os grupos NTi e AZn o implante Helix® Grand Morse NeoPoros (NEODENT – Curitiba, Brasil) o qual passa por processo de jateamento com partículas

abrasivas de óxido de zircônio, com controle automatizado de pressão, direção, velocidade e tamanho das partículas lançadas contra o implante, formando crateras na superfície. Finalizado o jateamento, as partículas aderidas são removidas por ultrassom e passam por ataque ácido que possa remover possíveis incrustações de partículas de óxido, até que se uniformize a rugosidade criada pelo processo de jateamento, criando uma superfície hidrofóbica com poros na superfície com tamanho variando entre 2,5 e 5,0µm. Já para os grupos ATi e AZn foi utilizado o implante Helix® Grand Morse Acqua (NEODENT – Curitiba, Brasil), que apresenta superfície hidrofílica, obtida através de um processo de ativação físico-químico, onde se altera a polaridade da camada de óxido de titânio, por exemplo, gerando uma superfície positiva, ou seja, mais hidrofílica (RUPP et al., 2006; GITTENS et al., 2012). Quando comparadas as superfícies dos implantes, foi possível notar diferenças entre os microrganismos detectados nos grupos com superfície Acqua e NeoPoros. A superfície Acqua expressou maior número de microrganismos detectados, entre eles *F. nucleatum*; *P. micra*; *P. nigrescens*; *S. oralis*; *S. sanguinis*; *S. gordonii*; *Aa. a*; *L. acidophilus*; *M. salivarium*; *S. moreeii*; *S. mutans*; *S. parasanguinis*; *S. pasteurii*; *S. pneumoniae*; *S. sobrinus*; *C. albicans*. A superfície NeoPoros detectou os microrganismos *T. denticola*; *P. intermedia*; *C. gingivalis*; *V. parvula*; *K. pneumoniae*; *P. putida* e *C. tropicalis* em maior expressão. Nossos resultados expressaram que nas superfícies hidrofílicas foram encontradas maiores detecções de microrganismos, indo de acordo com os resultados encontrados em outro estudo (ALMAGUER-FLORES et al., 2012). No entanto a análise de estudos prévios mostra como controversa a influência de superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas sobre a adesão de microrganismos, pois os estudos envolvem diferentes desenhos experimentais e metodologias de análise (DRAKE; PAUL; KELLER, 1999; HARRIS; RICHARDS, 2004; SCHMIDLIN et al., 2013; WASSMANN et al., 2017).

Um dos fatores que ajudam a entender a variabilidade entre os resultados encontrados é a interação dos microrganismos com as superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas de implantes. As superfícies hidrofílicas têm um efeito de absorção nos fluidos dos tecidos, incluindo o sangue, levando à adsorção de proteínas de ligação celular, como a fibronectina. Enquanto muitas células envolvidas na regeneração de tecidos usam essas proteínas para aderir ao implante, as mesmas proteínas também podem possuir sítios de ligação para bactérias (Quirynen et al. 2002; Plummer & Douglas 2006). No entanto, o efeito dessas modificações superficiais na fixação e crescimento de microrganismos tem sido estudado. Wassmann et al. (2017) encontraram maior expressões *S. epidermidis* sobre superfícies hidrofílicas. Microrganismos como *S. mutans* são comumente associados a superfícies hidrofóbicas (GE; CATT; GREGORY, 2004;

ROSENTRITT et al., 2008). No entanto nossos resultados apontaram maior detecção de *S. mutans* no grupo AZn, o que pode ser justificado pelo fato de não termos isolado apenas a característica da superfície, pois todos os implantes estavam associados a um pilar cerâmico ou metálico.

No presente estudo, não foi possível comparar a detecção microrganismos pela técnica DNA *Checkerboard* e as imagens obtidas por MEV. Não foi possível determinar exatamente o número de bactérias aderidas as superfícies, principalmente devido aos poros e sulcos dos materiais avaliados, pois nestas superfícies, as bactérias ficam abrigadas nos poros, o que dificulta a análise do perfil bacteriano. Entretanto, a formação de microrganismos sobre a região intermediária do pilar protético (altura de transmucoso) e na porção cimentável foi visível.

Este estudo utilizou dois tipos de pilares, um pré-fabricado, disponibilizado pelo fabricante de acordo com a conexão do implante e outro personalizado, cerâmico. Este pilar cerâmico foi confeccionado por tecnologia CAD/CAM e permitiu que se reproduzisse as dimensões do pilar metálico. O pilar cerâmico foi cimentado sobre a superfície do *Tibase* pré-fabricado pela empresa. Em nossos resultados, ao analisar a detecção de biofilme sobre as os diferentes pilares, foram detectados em maior quantidade os microrganismos *T. dentícola*; *C. rectus*; *F. nucleatum*; *P. intermedia*; *S. gordonii*; *C. gingivalis*; *E. corrodens*; *B. fragilis*; *E. faecalis*; *K. pneumoniae*; *P. putida*; *S. moreei*; *C. tropicalis* para os grupos com pilar metálico (Ti) e *P. micra*; *P. nigrescens*; *S. oralis*; *S. sanguinis*; *Aa. a*; *E. coli*; *L. acidophilus*; *M. orale*; *M. salivarium*; *P. aurescens*; *S. aerus*; *S. gallolyticus*; *S. mutans*; *S. pasteurii*; *S. pneumoniae*; *C. albicans*, para os grupos com pilar cerâmico (Zn). De acordo com o exposto, os grupos com pilares cerâmicos apresentaram maior detecção de microrganismos do que os grupos metálicos, esse resultado parece estar associado a maior propensão dos pilares de zircônia a micro infiltração do que pilares de titânio, conforme evidenciado em revisão sistemática (MISHRA; CHOWDHARY; KUMARI, 2017). Estudos clínicos (ELTER et al., 2008; WELANDER et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2016) e *in situ* (GRÖSSNER-SCHEIRBER et al., 2009) denotam para uma menor adesão bacteriana sobre os pilares protéticos de zircônia. No entanto estudos *in vitro* (LEE et al., 2011) e *in situ* (DO NASCIMENTO et al., 2013) mostraram não haver diferenças na colonização entre discos de titânio ou zircônia mostrando discordância com os nossos resultados, no entanto é reportado que o aumento da energia livre de superfície que pode ser crítica na adesão microbiana (ZHAO et al., 2014). Os resultados microbiológicos sugerem que a colonização microbiana parece ser sítio-específica, e o titânio e a zircônia parecem apresentar prevalência seletiva para algumas espécies bacterianas (NASCIMENTO et al., 2016;

DE FREITAS et al., 2018). De acordo com os resultados encontrados, o grupo NTi apresentou maior detecção de microrganismos do complexo vermelho de Socransky, indicando assim uma possível relação entre esses microrganismos e estruturas manufaturadas em titânio.

O estudo *in vitro* de Ávila et al. (2017) utilizou discos de zircônia e titânio estudou a influência desses materiais sobre a adesão e proliferação de microrganismos sobre a superfície. O estudo apontou os espécimes de metal como sendo os de maior caráter hidrófobo, e embora os autores tenham encontrado resultados semelhantes quanto a colonização bacteriana entre ambas as superfícies, níveis mais altos foram encontrados para a zircônia. Os resultados do presente estudo mostraram maior detecção de microrganismos para o grupo AZn, que envolve uma superfície de implante hidrofílica, e consequentemente um pilar cerâmico, sugestivamente hidrofílico. A combinação de duas superfícies com a mesma propriedade pode ser sugestiva para os achados encontrados nessa investigação. Outro fato que parece ter implicação direta com esses achados foi a utilização de radiação gama para esterilização dos pilares de zircônia. A radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto-60 (Co-60) é letal para todas as formas de microrganismo e possui a vantagem de permitir a esterilização sem a presença de altas temperaturas e pressão, e produtos que podem ser nocivos como gases e produtos químicos (CARVALHO et al., 2009). Assim como relatado Han et al. (2018), foram percebidas modificações visíveis na coloração da zircônia utilizando uma dose de 25 kGy, mesma dose utilizada em nossa metodologia recomendada como dose padrão para produtos médicos na União Europeia (OHAN; DUNN, 2003; HUMENYUK; TEMPLE-BOYER; SARRABAYROUSE, 2008). Esse estudo reportou que a radiação gama foi capaz de alterar a hidrofília da zircônia e provocar maior adesão de microrganismos como *S. aureus* e *P. gingivalis*.

Neste estudo foram utilizados sistemas de implantes de duas peças (ATi, NTi) e três peças (AZn, NZn) que apresentam inevitavelmente espaços entre as peças (TEIXEIRA et al., 2011; PASSOS et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015). Um importante fator a ser analisado é a presença de uma linha de cimentação adequada, com espessura mínima, e sem a presença de excessos de cimento. A análise MEV descrita nesse estudo evidenciou a formação bacteriana ao redor dos excessos de cimento detectados sobre a superfície do *Tibase*. A remoção de excessos de cimento resinoso é supostamente difícil, porém pode ser reduzida, removendo os excessos de cimento previamente a fotopolimerização. A presença de resíduos de cimento pode atuar como “cálculo artificial” favorecendo o estabelecimento e a progressão da perimplantite (RENVERT; QUIRYNEN 2015).

Estudos *in vitro* (DO NASCIMENTO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2015) denotam que a infiltração microbiana através da interface implante/pilar protético aumenta a medida que o conjunto sofre a influência das cargas mecânicas da mastigação (PASSOS et al., 2013). Esse estudo utilizou um novo sistema de conexão do tipo Cone Morse (Gran Morse, Neodent, Curitiba, Brasil), essa conexão apresenta uma plataforma reduzida, e ainda não existem estudos que reportam sobre a contaminação interna desses implantes após a simulação de cargas mecânicas. Apesar ter sido realizado o selamento do orifício de acesso ao parafuso do implante, não foi objetivo desse estudo avaliar a contaminação interna, o que pode ser interessante em estudos futuros, pois esse novo modelo de implante possui uma plataforma reduzida, e seus efeitos sobre a colonização bacteriana precisam ser avaliados.

. O uso de saliva humana como meio contaminante em conjunção com a metodologia DNA-*Checkerboard* permitiu a avaliação de um amplo espectro de espécies microbianas que colonizaram os implantes/pilares após a incubação. A detecção dessa gama de espécies é importante, pois o biofilme oral consiste em uma microbiota complexa composta de espécies bacterianas e fúngicas, e sua composição pode indicar estados de patogenicidade. No entanto, a saliva é rica em algumas substâncias antimicrobianas, tais como lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase e IgA secretora, que aliadas a reduzida quantidade de nutrientes podem levar a morte celular microbiana e / ou a degradação do material genético comprometendo a detecção de microrganismos (TENYO 1998). Quando um microrganismo morre, enzimas proteolíticas e endonucleases são liberadas, gerando um ambiente desfavorável que pode levar a degradação do material genético de outros microrganismos, fazendo com que o ocorra a ausência de sinais de detecção de hibridação de DNA, relacionadas à faixa limitada de detecção nesta metodologia. O número mínimo de células microbianas que podem ser detectadas (10^4 células), o que significa que contagens no intervalo de 1 a 1000 que poderiam estar presentes nos conjuntos implante/pilar, não foram detectadas pelo método. Nesse caso, os microrganismos podem não estar presentes ou manifestarem-se em contagens extremamente reduzidas, esse fato representa uma das limitações da metodologia.

Apesar do exposto anteriormente o método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* supera algumas limitações das técnicas tradicionais de cultura microbiológica (PAPAPANOU et al., 1997), pois não depende da viabilidade celular e representa uma técnica vantajosa para avaliação de microrganismos anaeróbios, uma vez que, a morte celular pode ocorrer durante a coleta ou transporte das amostras de biofilme (SOCRANSKY et al., 2004; BARBOSA et al., 2009). A metodologia original detalhada por Socransky et al (1994) usa sondas de DNA

genômico das espécies-alvo marcadas com digoxigenina, hibridizadas com amostras de biofilme oral, seguidas por uma reação antígeno-anticorpo quimioluminescente. Estudos realizados em nosso laboratório, propuseram a utilização de protocolos alternativos, visando reduzir tempo de processamento e custo dos insumos (DO NASCIMENTO et al., 2008; DO NASCIMENTO et al., 2010). Nascimento et al. (2010) utilizaram a marcação direta e rápida das sondas com enzima fosfatase alcalina termoestável, seguido de detecção por quimioluminescência e obtiveram resultados comparáveis à técnica original, com boa sensibilidade, especificidade, reduzindo o tempo de processamento (DO NASCIMENTO et al., 2010).

Contudo esse estudo encontrou diferenças estatisticamente significantes para alguns microrganismos avaliados, quando da comparação entre as superfícies dos implantes e o tipo de pilar protético, sendo importante ressaltar que os valores gerais de detecção foram semelhantes entre os grupos. Quando comparada a influência das superfícies foi encontrada maior detecção para as superfícies Acqua, e os pilares em Zn mostraram maior detecção do que Ti, logo nesse estudo o grupo AZn mostrou os maiores sinais de detecção para os microrganismos avaliados.

Os resultados obtidos neste estudo trazem informações adicionais importantes que podem contribuir para um melhor entendimento do tema e orientar no desenvolvimento de pesquisas futuras. Estudos envolvendo a análise da contaminação interna dos implantes Cone Morse e seu desempenho clínico, bem como a avaliação clínica de pilares cerâmicos cimentados sobre bases de titânio, como os que foram envolvidos nesse estudo, são necessários pois fazem parte das perspectivas atuais em implantodontia.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Dentro das limitações desse estudo *in vitro* podemos concluir que:

1. As diferentes superfícies dos implantes e pilares protéticos mostraram diferenças quanto aos microrganismos avaliados. Na avaliação total de microrganismos por superfície a quantificação foi semelhante.
2. Superfícies do tipo Acqua (hidrofílica) e pilares cerâmicos (Zn) denotaram maior quantificação de microrganismos.
3. Os conjuntos implante-pilar do grupo AZn apresentaram a maior quantidade de microrganismos, quando comparados aos demais grupos.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog. **Clin Oral Implants Res.** 1998;9(1):73–9
2. Adatia ND, Bayne SC, Cooper LF, Thompson JY. Fracture Resistance of Yttria-Stabilized Zirconia Dental Implant Abutments. **J Prosthodont.** 2009;18(1):17-22.
3. Albertini M, López-Cerero L, O’Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos V, Herrero-Climent M1, Bullón P. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res.** 2015;26(8):937–941.
4. Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. **J Parodontol** 1991;10(1):11–8.
5. Ali SA, Karthigeyan S, Deivanai M, Mani R. Zirconia: Properties and Application - Review. **Pakistan Oral & Dental Journal.** 2014;34(1):178-83.
6. Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximenez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD. Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces *in vitro*. **Clin Oral Implants Res.** 2012;23(3):301–7.
7. Alsaadi G, Quirynen M, Komarek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. **J Clin Periodontol.** 2007;34:610-617 6.
8. Alsaadi G, Quirynen M, Michiles K, Teughels W, Komárek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of failures up to abutment connection with modified surface oral implants. **J Clin Periodontol** 2008;35(1):51-57
9. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. **J Biomed Mater Res.** 1998;43(1):338–48.
10. Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. **Clin Oral Impl Res.** 2009;20(1):32–47.
11. Ashley ET, Covington LL, Bishop BG, Breault LG. Ailing and failing endosseous dental implants: a literature review. **J Contemp Dent Pract.** 2003;4(2):35-50.
12. Baier RE, Meyer AE, Natiella JR, Natiella RR, Carter JM. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. **J Biomed Mater Res.** 1984;18(1):337–55.
13. Baier RE. The role of surface energy in thrombogenesis. **Bull N Y Acad Med.** 1972;48(1):257–72.

¹ UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP – Parte IV (Vancouver).** São Paulo: SIBi/USP, 2009. 100p.

14. Barbosa RE, do Nascimento C, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque RF Jr. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. **J Prosthodont.** 2009;18(5):376-81.
15. Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Graetz C, Dörfer CE, Wiltfang J, Häsler R. Peri-implantitis versus periodontitis: functional differences indicated by transcriptome profiling. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2014;16(3):401-11.
16. Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Rossmann CM, Behrens E, Jochens A, Wiltfang J. Long-term Survival of Straumann Dental Implants with TPS Surfaces: A Retrospective Study with a Follow-up of 12 to 23 Years. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2016;18(3):480-8.
17. Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. Peri-implant infections of oral biofilm etiology. **Adv Exp Med Biol.** 2015;830:69-84.
18. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques.** 1994;17(4):788-92.
19. Blanes RJ, Bernard JP, Blanes ZM, Belser UC. A 10-year prospective study of ITI dental implants placed in the ratio and different prosthetic treatment modalities on crestal bone loss. **Clin Oral Implants Res.** 2007;18(6):707-14.
20. Botero JE, Gonzalez AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. **J Periodontol.** 2005;76(9):1490–5.
21. Brito LC, Teles FR, Teles RP, Franca EC, Ribeiro-Sobrinho AP, Haffajee AD, Socransky SS. Use of multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections. **J Clin Microbiol.** 2007; 45(1):3039–49.
22. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **J Dent Res.** 2004;83(1): 529-533.
23. Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. **Periodontology 2000.** 2017;73(1), 22–40.
24. Busscher HJ1, Bos R, van der Mei HC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. **FEMS Microbiol Lett.** 1995;15;128(3):229-34.
25. Canabarro A, Paiva CG, Ferreira HT, Tholt-de-Vasconcellos B, De-Deus G, Prioli R, Linhares AB, Alves GG, Granjeiro JM. Short-term response of human osteoblast-like cells on titanium surfaces with micro- and nano-sized features. **Scanning.** 2012;34(6):378-86.
26. Cao Y, Su B, Chinnaraj S, Jana S, Bowen L, Charlton S, Duan P, Jakubovics NS, Chen J. Nanostructured titanium surfaces exhibit recalcitrance towards Staphylococcus epidermidis biofilm formation. **Sci Rep.** 2018;8(1):107.

27. Carvalho FG, Goncalves LS, Carlo HL, Soares CJ, Correr-Sobrinho L, Puppim-Rontani RM. Influence of sterilization method on the bond strength of caries-affected dentin. **Braz Oral Res** 2009;23(1):11–6.
28. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A: Reasons for failures of oral implants. **J Oral Rehabil**. 2014;41(1):443-76.
29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. 1999;21;284(5418):1318-22.
30. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dent Educ**. 2003;67(8):932-49.
31. de Avila ED, de Molon RS, Spolidorio DMP, Mollo FD. Implications of surface and bulk properties of abutment implants and their degradation in the health of periodontal tissue. **Materials**. 2013;6(1)5951-66.
32. de Avila ED, de Molon RS, Vergani CE, Mollo FD, Salih V. The relationship between biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. **Materials**. 2014;7(1)3651-62.
33. de Avila ED, Vergani CE, Mollo Junior FA, Junior MJ, Shi W, Lux R. Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. **J Prosthet Dent**. 2017;118(4):481-87.
34. de Freitas AR, Silva TSO, Ribeiro RF, Albuquerque Junior RF, Pedrazzi V, do Nascimento C. Oral bacterial colonization on dental implants restored with titanium or zirconia abutments: 6-month follow-up. **Clin Oral Investig**. 2018;22(6):2335-43.
35. de Medeiros RA, Vechiato-Filho AJ, Pellizzer EP, Mazaro JVQ, dos Santos DM, Goiato MC. Analysis of the peri-implant soft tissues in contact with zirconia abutments: an evidence-based literature review. **J Contemp Dent Pract**. 2013; 14(3):567-72.
36. de Miranda RG, Colombo APV. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. **Clin Oral Investig**. 2018;22(4):1751-61.
37. do Nascimento C, da Rocha Aguiar C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque RF Jr, Ribeiro RF. Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates. **Microsc Res Tech**. 2013;76(2):126-32.
38. do Nascimento C, de Albuquerque RF Jr, Monesi N, Candido-Silva JA. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. **J Clin Microbiol**. 2010;48(8):3039-40.
39. do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Gonçalves RB, Ribeiro RF, Faria AC, Macedo AP, de Albuquerque RF Jr. Leakage of saliva through the implant-abutment interface: *in vitro* evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2012;27(3):551-60.

40. do Nascimento C, Paulo DF, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF. Microbial diversity of the supra- and subgingival biofilm of healthy individuals after brushing with chlorhexidine- or silver-coated toothbrush bristles. **Can J Microbiol**. 2015;61(2):112-23.
41. do Nascimento C, Pita MS, Calefi PL, de Oliveira Silva TS, Dos Santos JB, Pedrazzi V. Different sealing materials preventing the microbial leakage into the screw-retained implant restorations: an *in vitro* analysis by DNA checkerboard hybridization. **Clin Oral Implants Res**. 2017;28(2):242-250.
42. do Nascimento C, Santos Barbosa RE, Mardegan Issa JP, Watanabe E, Yoko Ito I, Monesi N, Albuquerque Junior RF. The use of fluorescein for labeling genomic probes in the checkerboard DNA-DNA hybridization method. **Microbiol Res**. 2008;163(4):403-7.
43. do Nascimento C1, Ferreira de Albuquerque Junior R, Issa JP, Ito IY, Lovato da Silva CH, de Freitas Oliveira Paranhos H, de Souza RF. Use of the DNA Checkerboard hybridization method for detection and quantitation of *Candida* species in oral microbiota. **Can J Microbiol**. 2009;55(5):622-6.
44. do Nascimento C1, Monesi N, Ito IY, Issa JP, de Albuquerque Junior RF. Bacterial diversity of periodontal and implant-related sites detected by the DNA Checkerboard method. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2011;30(12):1607-13.
45. Doyle JJ. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 1990; 12:13-15.
46. Drake D R, Paul J, Keller J C. Primary bacterial colonization of implant surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1999;14(2):226-32.
47. Dunn DB. The use of a zirconia custom implant supported FPD prosthesis to treat implant failure in anterior maxilla: a clinical report. **J Prosthet Dent**. 2008;100:415-21.
48. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, Stiesch-Scholz M. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2008, 23(1):327-34.
49. Esfahanizadeh N, Mirmalek SP, Bahador A, Daneshparvar H, Akhoundi N, Pourhajibagher M. Formation of biofilm on various implant abutment materials. **Gen Dent**. 2018;66(5):39-44.
50. Faeda RS, Spin-Neto R, Marcantonio E, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Laser ablation in titanium implants followed by biomimetic hydroxyapatite coating: Histomorphometric study in rabbits. **Microsc Res Tech**. 2012 Jul;75(7):940-8.
51. Furst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. **Clin Oral Implants Res**. 2007; 18 (4):501-8.
52. Gao X, Zhou J, Sun X, Li X, Zhou Y. Diversity analysis of subgingival microbial bacteria in peri-implantitis in Uyghur population. **Medicine (Baltimore)**. 2018;97(5):e9774.

53. Ge J, Catt DM, Gregory RL. Streptococcus mutans surface alphaenolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen. **Infect Immun.** 2004;72(11):6748-52.
54. Gerber J, Wenaweser D, Heitz-Mayfield L, Lang NP, Persson GR. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. **Clin Oral Implants Res.** 2006; 17:1–7.
55. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces. **Biomaterials.** 2012;33(35):8986-94.
56. Goiato MC, dos Santos DM, Santiago JF Jr, Moreno A, Pellizzer EP. Longevity of dental implants in type IV bone: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2014;(9):1108-16.
57. Gristina AG. Implant failure and the immunoincompetent fibro-inflammatory zone Clin. **Clin Orthop Relat Res.** 1994;(298):106-18.
58. Grivet M, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. Effect of hydrophobicity on *in vitro* streptococcal adhesion to dental alloys. **J Mater Sci Mater Med.** 2000;11(1): 637–42.
59. Grössner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Müller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Göbel UB. Plaque formation on surface modified dental implants. An *in vitro* study. **Clin Oral Implants Res.** 2001;12(6):543-51.
60. Grössner-Schreiber B, Teichmann J, Hannig M, Dörfer C, Wenderoth DF, Ott SJ. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under *in vivo* condition. **Clin Oral Implants Res.** 2009;20(8):817-26.
61. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. **Oral Microbiol Immunol.** 2008;(3):196-205.
62. Haffajee AD, Teles RP, Patel MR, Song X, Yaskell T, Socransky SS. Factors affecting human supragingival biofilm composition. II. Tooth position. **J Periodontal Res.** 2009;44(4):520-8.
63. Han A, Tsoi JKH, Matinlinna JP, Zhang Y, Chen Z. Effects of different sterilization methods on surface characteristics and biofilm formation on zirconia *in vitro*. **Dent Mater.** 2018;34 (2):272-81.
64. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. **Injury.** 2006;37(suppl 2):3–14.
65. Harris LG, Richards RG. Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces. **J Mater Sci Mater Med.** 2004;15(4):311-4.
66. Hasan J, Jain S, Chatterjee K. Nanoscale topography on black titanium imparts multi-biofunctional properties for orthopedic applications. **Sci Rep.** 2017;7: 41118.

67. Hasan J, Webb HK, Truong VK, Pogodin S, Baulin VA, Watson GS, Watson JA, Crawford RJ, Ivanova EP. Selective bactericidal activity of nanopatterned superhydrophobic cicada *Psaltoda claripennis* wing surfaces. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2013;97(20): 9257–62.
68. Heimdahl A, Kondell PA, Nord CE, Nordenram A. Effect of insertion of osseo-integrated prosthesis on the oral microflora. **Swed Dent J.** 1983;7(5):199–204.
69. Heydecke G, Zwahlen M, Nicol A, Nisand D, Payer M, Renouard F, Grohmann P, Mühlemann S, Joda T. What is the optimal number of implants for fixed reconstructions: a systematic review. **Clin Oral Implants Res.** 2012;23 Suppl 6:217-28.
70. Hickok NJ, Shapiro IM. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. **Adv Drug Deliv Rev.** 2012;64(12):1165–1176.
71. Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: established facts and perspectives for a biomaterial in dental Implantology. **J Biomedic Mat Res.** 2008;519-29.
72. Humenyuk I, Temple-Boyer P, Sarabayrouse G. The effect of gamma-sterilization on the pH-ChemFET behaviour. **Sens Actuators A Phys.** 2008;147(1):165–8.
73. Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, Figuero E, Giovannoli JL, Goldstein M, Lambert F, Ortiz-Vigon A, Polyzois I, Salvi GE, Schwarz F, Serino G, Tomasi C, Zitzmann NU. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. **J Clin Periodontol.** 2015;42 Suppl 16:S152-7.
74. Jimbo R, Albrektsson T. Long-term clinical success of minimally and moderately rough oral implants: a review of 71 studies with 5 years or more of follow-up. **Implant Dent.** 2015;24(1):62-9.
75. Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zembic A, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. **Clin Oral Implants Res.** 2008;19:119-30.
76. Kan JY, Runcharangsang K, Lozada JL, Zimmerman G. Facial gingival tissue stability following immediate placement and provisionalization of maxillary anterior single implants: a 2 to 8 years follow-up. **Int J Oral Maxillofac Impl.** 2011;26(1):179–87.
77. Kapos T, Ashy LM, Gallucci GO, Weber HP, Wismeijer D. Computer-aided design and computer-assisted manufacturing in prosthetic implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2009;24 Suppl:110-7.
78. Karl M, Albrektsson T. Clinical performance of dental implants with a moderately rough (TiUnite) surface: A meta-analysis of prospective clinical studies. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2017;32:717-734.
79. Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1988;3(1):247–59.

80. Kasemo B, Lausmaa J. Material-tissue interfaces: the role of surface properties and processes. **Environ Health Perspect.** 1994;102(Suppl. 5):41–5.
81. Khan MR, Donos N, Salih V, Brett PM. The enhanced modulation of key bone matrix components by modified titanium implant surfaces. **Bone.** 2012;50:1-8.
82. Kim DJ, Lee MH, Lee DY, Han JS. Mechanical properties, phase stability, and biocompatibility of (Y, Nb)-TZP/Al₂O₃ composite abutments for dental implant. **J Biomed Mater Res.** 2000;53(4):438-43.
83. Kim S, Jung UW, Cho KS, Lee JS. Retrospective radiographic observational study of 1692 Straumann tissue-level dental implants over 10 years: I. Implant survival and loss pattern. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2018;20(5):860-866.
84. Kolbeck C, Behr M, Rosentritt M, Handel G. Fracture force of tooth–toothand implant tooth-supported all-ceramic fixed partial dentures using titanium vs. customised zirconia implant abutments. **Clin Oral Implants Res.** 2008;19(10):1049-53.
85. Kolenbrander P E, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol.** 1993;175(11):3247-52.
86. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontol** 2000. 2006;42:47-79.
87. Kolenbrander PE1, Andersen RN, Kazmerzak K, Wu R, Palmer RJ Jr. Spatial organization of oral bacteria in biofilms. **Methods Enzymol.** 1999;310:322-32.
88. Kronstrom M, Svenson B, Hellman M, Persson GR. Early implant failures in patients treated with Branemark System titanium dental implants: a retrospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2001; 16(2):201–7.
89. Kwon, T., Bain, P.A. & Levin, L. (2014) Systematic review of short- (5–10 years) and long-term (10 years or more) survival and success of fullarch fixed dental hybrid prostheses and supporting implants. **Journal of Dentistry.** 42: 1228–1241.
90. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincón MV, Gómez LA, Lesmes YA, Chambrone L. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. **J Periodontol.** 2017;88(10):1066-1089.
91. Laine P, Salo A, Kontio R, Ylijoki S, Lindqvist C, Suuronen R. Failed dental implants - clinical, radiological and bacteriological findings in 17 patients. **J Craniomaxillofac Surg.** 2005;33(3):212-7.
92. Lang NP, Berglundh T, Working Group 4 of Seventh European Workshop on P. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of clinical periodontology.** 2011;38 Suppl 11: 178 -81.
93. Lang NP, Wilson TG, Corbert EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. **Clin Oral Implants Res.** 2000;11 Suppl 1:146-55.

94. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections - an update. *APMIS*. 2017;125(4):376-384.
95. Lee BC, Jung GY, Kim DJ, Han JS. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia *in vitro*. **J Adv Prosthodont**. 2011;3(2):81-4.
96. Leonhardt A, Adolfsson B, Lekholm U, Wikstrom M, Dahlen G. A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. **Clin Oral Implants Res**. 1993; 4(3):113–20.
97. Leonhardt A, Bergstrom C, Lekholm U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. **Clin Implant Dent Relat Res**. 2003;5(4):226–32.
98. Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. **Clin Oral Implants Res**. 1999; 10(5): 339–45.
99. Lindhe J, Meyle J, Group DoEWoP. Peri -implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **Journal of clinical periodontology**. 2008;35: 282 -5.
100. Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier JJ, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials—an *in vitro* study. **Colloids Surf B Biointerfaces**. 2004;25(1):199–205.
101. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **J Clin Periodontol**. 2003; 30(7):644–54.
102. Malm MO, Jemt T, Stenport V. Early Implant Failures in Edentulous Patients: A Multivariable Regression Analysis of 4615 Consecutively Treated Jaws. A Retrospective Study. **J Prosthodont**. 2018;27(9):803-812.
103. Mamalis AA, Markopoulou C, Vrotsos I, Koutsilirieris M. Chemical modification of an implant surface increases osteogenesis and simultaneously reduces osteoclastogenesis: an *in vitro* study. **Clin Oral Implants Res**. 2011; 22(1): 619-626.
104. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? **J Clin Periodontol**. 2011;38 (Suppl 11):28-35.
105. McLaren EA, White SN. Survival of In-Ceram crowns in a private practice: a prospective clinical trial. **J Prosthet Dent**. 2000;83(2):216-22.
106. Meredith JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Mol Biol Cell**. 1993;4(1): 953-961.
107. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. **Infect Immun**. 1985;47(1):11-4.
108. Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the Different Implant Abutment Interface: A Systematic Review. **J Clin Diagn Res**. 2017;11(6):ZE10-ZE15.

109. Mombelli A, Decaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. **J Clin Periodontol.** 2011;38(Suppl. 11):203–13.
110. Mombelli A, Muller N, Cionca N. The epidemiology of peri -implantitis. **Clinical oral implants research.** 2012;23 Suppl 6: 67 -76.
111. Mombelli A, Van Oosten M, Schurch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiology and Immunology.** 1987;2:145-51.
112. Moura CC, Machado JR, Silva MV, Rodrigues DB, Zanetta-Barbosa D, Jimbo R, Tovar N, Coelho PG. Evaluation of human polymorphonuclear behavior on textured titanium and calcium-phosphate coated surfaces. **Biomed Mater.** 2013;8(3):035010.
113. Muddugangadhar BC, Amarnath GS, Tripathi S, Dikshit S, Divya MS. Biomaterials for dental implants: An overview. **Int J Oral Implantology Clin Res.** 2011;2(1):13-24.
114. Nascimento C, Pita MS, Santos Ede S, Monesi N, Pedrazzi V, Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. **Dent Mater.** 2016;1(1):93-101.
115. Nascimento Cd, Pita MS, Santos Ede S, Monesi N, Pedrazzi V, Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. **Dent Mater.** 2016;32(1):93-101.
116. Odman P, Andersson B. Procera AllCeram crowns followed for 5 to 10. 5 years: a prospective clinical study. **Int J Prosthodont.** 2001;14(6):504-9.
117. Ohan MP, Dunn MG. Glucose stabilizes collagen sterilized with gamma irradiation. **J Biomed Mater Res A.** 2003;67:1188–95.
118. Papapanou PN, Madianos PN, Dahlén G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. **Eur J Oral Sci.** 1997;105(5 Pt 1):389-96.
119. Park SW, Driscoll CF, Romberg EE, Siegel S, Thompson G. Ceramic implant abutments: Cutting efficiency and resultant surface finish by diamond rotary cutting instruments. **J Prosthet Dent.** 2006; 95(6):444-9.
120. Passos SP, Gressler May L, Faria R, Özcan M, Bottino MA. Implant-abutment gap versus microbial colonization: Clinical significance based on a literature review. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 2013;101(7):1321-8.
121. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. **Implant Dent Relat Res.** 2014;16(6):783-93.
122. Pita MS, do Nascimento C, Dos Santos CGP, Pires IM, Pedrazzi V. Experimental conical-head abutment screws on the microbial leakage through the implant-abutment interface: an *in vitro* analysis using target-specific DNA probes. **Clin Oral Implants Res.** 2017;28(7):68-75.

123. Pjetursson BE, Asgeirsson AG, Zwahlen M, Sailer I. Improvements in implant dentistry over the last decade: comparison of survival and complication rates in older and newer publications. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2014;29 Suppl:308-24.
124. Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Brägger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and observation period of at least 5 years. **Clin Oral Implants Res**. 2004;15:667-76.
125. Pjetursson BE, Thoma D, Jung R, Zwahlen M, Zembic A. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. **Clin Oral Implants Res**. 2012;23 Suppl 6:22-38.
126. Priest G. Virtual-designed and computer-milled implant abutments. **J Oral Maxillofac Surg**. 2005. 63(9):22-32.
127. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. **J Clin Periodontol**. 1995;22(1):1-14.
128. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. **Clin Oral Implants Res**. 2002;13(1):1-19.
129. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. **Clin Oral Implants Res**. 2006; 17(1):25-37.
130. Raffaini FC, Freitas AR, Silva TSO, Cavagioni T, Oliveira JF, Albuquerque Junior RF, Pedrazzi V, Ribeiro RF, do Nascimento C. Genome analysis and clinical implications of the bacterial communities in early biofilm formation on dental implants restored with titanium or zirconia abutments. **Biofouling**. 2018;34(2):173-182.
131. Rakic M, Grusovin MG, Canullo L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2016;31(2):359-68.
132. Rams TE. Susceptibility of spirochetes and motile rods colonizing human dental implants to inorganic salts: therapeutic implications. **J Oral Implantol**. 1984;11(3):341-7.
133. Rausch-Fan X, Qu Z, Wieland M, Matejka M, Schedle A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. **Dent Mater**. 2008; 24:102-10
134. Reese S, Guggenheim B. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in vitro biofilms. **Microsc Res Tech**. 2007;70:816-822.

135. Renvert S, Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. **Clin Oral Implants Res.** 2007;18(4):509–16.
136. Renvert S, Quirynen M. Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. **Clin Oral Implants Res.** 2015 Sep;26 Suppl 11:15-44.
137. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an *in vitro* and *in vivo* study. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2002; 17(6):793-8.
138. Rimondini, L., Fare, S., Brambilla, E., Felloni, A., Consonni, C., Brossa, F., Carrasi A. The effect of surface roughness on early *in vivo* plaque colonization on titanium. **J Periodontol.** 1997;68(6),556–62.
139. Roos-Jansåker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. **J Clin Periodontol.** 2006;33:296-301.
140. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. **Microbes and Infection/ Institut Pasteur.** 2000; 2(13), 1599–1607.
141. Rosentritt M1 Hahnel S, Gröger G, Mühlfriedel B, Bürgers R, Handel G. Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 2008;86(1):36-44.
142. Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. **J Biomed Mater Res A.** 2006;76:323-334.
143. Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. **J Prosthodont.** 2008; 17(2):348–56.
144. Sailer I, Philipp A, Zembic A, Pjetursson BE, Hammerle CH, Zwahlen M. A systematic review of the performance of ceramic and metal implant abutments supporting fixed implant reconstructions. **Clin Oral Implants Res.** 2009; 20(4): 4-31.
145. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. **J Periodontal Res.** 2005;40(3):277-85
146. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an *in vivo* human study. **J Periodontol.** 2004; 75(2):292-6.
147. Schmidlin PR, Müller P, Attin T, Wieland M, Hofer D, Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. **J Appl Oral Sci.** 2013;21(1):48-55.

148. Schwartz Z, Raz P, Zhao G, Barak Y, Tauber M, Yao H, Boyan BD. Effect of micrometer-scale roughness of the surface of Ti6Al4V pedicle screws *in vitro* and *in vivo*. **J Bone Joint Surg Am**. 2008; 90(11):2485-98.
149. Schwarz F, Sculean A, Wieland M, Horn N, Nuesry E, Bube C, Becker J. Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. **Mund Kiefer Gesichtschir**. 2007;11(6):333-8.
150. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Schedle A, Broggini N, Bornstein MM, Buser D, Ferguson SJ, Becker J, Boyan BD, Cochran DL. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2009; 88(2):544-57.
151. Setzer FC, Kim S. 2014. Comparison of long-term survival of implants and endodontically treated teeth. **J Dent Res**. 93:19–26.
152. Setzer FC, Kim S. Comparison of long-term survival of implants and endodontically treated teeth. **J Dent Res**. 2014;93(1):19-26.
153. Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, Feres M, Marcantonio E Jr, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surface topography on early osseointegration: A histological study in human jaws. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2007;80(2):377-85.
154. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. **Clin Oral Implants Res**. 2008;19(10):975–82.
155. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**. 1998;25(2):134-44.
156. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol Immunol**. 2004;19(6):352-62.
157. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000**. 2002;28:12-55.
158. Spratt D, Pratten J. Biofilms and the oral cavity. **Rev. Environ Sci Bio/Technology**. 2003;2:109-20.
159. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2009;24(4):616-26.
160. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2000; 15(5):675-90.

161. Tavares WL, Neves de Brito LC, Teles RP, Massara ML, Ribeiro Sobrinho AP, Haffajee AD, Socransky SS, Teles FR. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Int Endod J**. 2011;44(3):225-35.
162. Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an *in vitro* comparative study. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2011;26(1):56-62.
163. Teles FR, Teles RP, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, Haffajee AD. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. **J Periodontal Res**. 2012;47(1):95-104.
164. Teles RP, Patel M, Socransky SS, Haffajee AD. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. **J Periodontol**. 2008; 79(1):784-94.
165. Tenenbaum H, Bogen O, Séverac F, Elkaim R, Davideau JL, Huck O. Long-term prospective cohort study on dental implants: clinical and microbiological parameters. **Clin Oral Implants Res**. 2017;28(1):86-94.
166. Tenovuo J. Antimicrobial function of human saliva—how important is it for oral health? **Acta Odontol Scand**. 1998; 56(5):250-6.
167. Teranaka A, Tomiyama K, Ohashi K. Relevance of surface characteristics in the adhesiveness of polymicrobial biofilms to crown restoration materials. **J Oral Sci**. 2017;60, 129-136.
168. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clin Oral Implants Res**. 2006; 17(Suppl 2):68-81.
169. Thoma DS, Sailer I, Ioannidis A, Zwahlen M, Makarov N, Pjetursson BE. A systematic review of the survival and complication rates of resin-bonded fixed dental prostheses after a mean observation period of at least 5 years. **Clin Oral Implants Res**. 2017;28(11):1421-1432.
170. Triches TC, Zimmermann GS, de Freitas SFT, Ximenes M, Vieira RS, Cordeiro MMR. Efficacy of a single session protocol for endodontic treatment in primary teeth: *in vivo* study. **Eur Arch Paediatr Dent**. 2018;19(1):47-55.
171. Tripathy A, Sen P, Su B, Briscoe WH. Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces. **Adv Colloid Interface Sci**. 2017; 248:85-104.
172. Tsimbouri PM, Holloway N, Fisher L, Holloway N, Sjöström T, Nobbs AH, Meek RM, Su B, Dalby MJ. Osteogenic and bactericidal surfaces from hydrothermal titania nanowires on titanium substrates. **Sci Rep**. 2016;6:36857.
173. Vagkopoulou T, Koutayas SO, Koidis P, Strub JR. Zirconia in Dentistry: Part 1. Discovering the Nature of an Upcoming Bioceramic. The European Journal of Esthetic Dentistry. **Eur J Esthet Dent**. 2009;4(2):130-51.

174. van Steenberghe D1, Lekholm U, Bolender C, Folmer T, Henry P, Herrmann I, Higuchi K, Laney W, Linden U, Astrand P. The applicability of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: a prospective multicenter study on 558 fixtures. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1990;5(3):272-81.
175. van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, Dellemijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. **J Clin Periodontol**. 2000;27(2):79-86.
176. Verran J, Taylor RL, Lees GC. Bacterial adhesion to inert thermoplastic surfaces. **J Mater Sci Mater Med**. 1996;7:597.
177. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts. **Biomaterials**. 2011; 32(1): 665-671.
178. Volz KU, Batsche C. Metal-free reconstruction with zirconia implants and zirconia crowns. **Quintessence J Dent Tech**. 2004;2:324-30.
179. Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells *in vitro*. **Bone**. 2009;45:17-26.
180. Wang F, Zhang Z, Monje A, Huang W, Wu Y, Wang G. Intermediate long-term clinical performance of dental implants placed in sites with a previous early implant failure: a retrospective analysis. **Clin Oral Implants Res**. 2015;26(12):1443-9.
181. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dental materials with antibiofilm properties. **Dent Mater**. 2014;30(2):e1-16.
182. Wassmann T, Kreis S, Behr M2, Buegers R. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. **Int J Implant Dent**. 2017;3(1):32.
183. Weerkamp AH, Uyen HM, Busscher HJ. Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. **J Dent Res**. 1988;67:1483-7.
184. Weerkamp AH, van der Mei HC, Busscher HJ. The surface free energy of oral streptococci after being coated with saliva and its relation to adhesion in the mouth. **J Dent Res**. 1985;64:1204-10.
185. Wei-Shao L, Harris BT, Zandinejad A, Martin WC, Morton D. Use of prefabricated titanium abutments and customized anatomic lithium disilicate structures for cement retained implant restorations in the esthetic zone. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. 2014; 111(3) 181-85.
186. Welander M, Abrahamsson I, Berglundh T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. **Clin Oral Implants Res**. 2008;19(7):635-41.

187. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res.** 2009;20(Suppl 4):172-84.
188. Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2000;15(3):331-44.
189. Wennerberg A, Galli S, Albrektsson T. Current knowledge about the hydrophilic and nanostructured SLActive surface. **Clin Cosmet Investig Dent.** 2011; 3(1):59-67.
190. Wennerberg A, Jimbo R, Stübinger S, Obrecht M, Dard M, Berner S. Nanostructures and hydrophilicity influence osseointegration: a biomechanical study in the rabbit tibia. **Clin Oral Implants Res.** 2014;25(9):1041-50.
191. Wilson TG Jr, Miller RJ, Trushkowsky R, Dard M. Tapered Implants in Dentistry: Revitalizing Concepts with Technology: A Review. **Adv Dent Res.** 2016;28(1):4-9.
192. Wittneben J-G, Millen C, Brägger U. Clinical Performance of Screw- Versus Cement Retained Fixed Implant-Supported Reconstructions— A Systematic Review. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2014; 29(Suppl):84–98.
193. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson CJ. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. **Dent Res.** 2000;79(1):21-7.
194. Wu Y, Zitelli JP, TenHuisen KS, Yu X and Libera MR. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. **Biomaterials.** 2011;32(4):951-60.
195. Xiao J, Zhou H, Zhao L, Sun Y, Guan S, Liu B, Kong L. The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep. **Osteoporos Int.** 2011;22(6):1907-13.
196. Yamane K, Ayukawa Y, Takeshita T, Furuhashi A, Yamashita Y, Koyano K. Bacterial adhesion affinities of various implant abutment materials. **Clin Oral Implants Res.** 2013;24(12):1310-5.
197. Zaugg LK, Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Zitzmann NU. Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. **Clin Oral Implants Res.** 2017;28(4):469-475.
198. Zhao B, van der Mei HC, Subbiahdoss G, de Vries J, Rustema-Abbing M, Kuijter R, Busscher HJ, Ren Y. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. **Dent Mater.** 2014;30(7):716-27.
199. Zhuang LF, Watt RM, Mattheos N, Si MS, Lai HC, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. **Clin Oral Implants Res.** 2016 Jan;27(1):13-21.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro da efetividade de diferentes protocolos de descontaminação de implantes associados a pilares metálicos e não metálicos

Pesquisador: OTAVIO MARINO DOS SANTOS NETO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79008917.1.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 07 de Novembro de 2017

Assinado por:

Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)